

## Thèse de Doctorat

Benjamin NAVET

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : ED 502 – Biologie Santé

Discipline : Biologie – Médecine - Santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Unité de recherche : INSERM UMR957, Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives

Soutenue le 9 novembre 2016

## Homéogènes *Dlx*, signalisation RANK/RANKL et ostéosarcomes

### JURY

Présidente du jury :	<b>Claudine BLIN</b>	Directeur de recherche, INSERM, Université Nice Sophia Antipolis
Rapporteurs :	<b>Giovanni LEVI</b> <b>Christopher MUELLER</b>	Directeur de recherche, CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris Directeur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg
Examineurs :	<b>Valérie GEOFFROY</b> <b>Dominique HEYMANN</b>	Directeur de recherche, INSERM, Université Paris Diderot – Paris 7 Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, INSERM, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	<b>Frédéric LEZOT</b>	Chargé de recherche, INSERM, Université de Nantes



# REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du :

**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs  
osseuses primitives**

**INSERM UMR957 – Université de Nantes – CHU de NANTES**



Avec le soutien financier de :





Dans le cadre de la réalisation de cette thèse, je tiens à remercier plusieurs personnes qui ont participé de près ou de loin à son élaboration et à son bon déroulement :

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur **Dominique HEYMANN**, directeur de l'UMR957 « Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives (LPRO) » pour m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 ainsi que ma thèse au sein de son laboratoire. Merci également pour ses conseils et les différentes discussions que nous avons eues au cours de ces travaux.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur **Frédéric LEZOT**, chargé de recherche INSERM, qui a été un directeur de thèse remarquable, ayant toujours le mot pour rire et ce, quel que soit la situation. Il a su me transmettre ses connaissances aussi bien théoriques que pratiques, avec des techniques parfois sorties d'un autre âge, comme le suggèrent de nombreuses personnes (cf. Northern-Blot). Ses idées « farfelues » et son optimisme à toute épreuve ont su contrebalancer les résultats négatifs que j'apportais de temps à autre à son bureau. Merci pour ces longues discussions sur de nombreux sujets ainsi que l'opportunité que tu m'as donnée d'assister au congrès de l'AACR à Philadelphie. Ce fut une expérience très enrichissante qui m'a permis de découvrir de nombreux champs de recherche en cancérologie, de nouvelles technologies, mais également une nouvelle culture. Mon premier repas américain restera dans mes souvenirs... Merci pour ces trois années et demie de bons moments.

Monsieur **Giovanni LEVI** et Monsieur **Christopher MUELLER** qui me font un grand honneur en acceptant d'être rapporteurs de mon travail. Dans le même temps, je tiens à remercier Christopher MUELLER pour les conseils et les outils qu'il m'a fournis au cours de ces travaux concernant l'axe RANK/RANKL.

Madame **Claudine BLIN**, Madame **Valérie GEOFFROY** ainsi que Monsieur **Dominique HEYMANN** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Monsieur **Thierry DINTINGER** ainsi que **Bénédictte BROUNAIS (Béné)** pour m'avoir permis d'enseigner au sein du département de Biochimie de l'UFR de Sciences. Ces deux années d'enseignement m'ont été très enrichissantes. Béné, je te remercie également pour l'aide apportée au laboratoire, notamment en biologie moléculaire pour la PCR et la production des particules lentivirales.

Madame **Claire PECQUEUR**, pour l'aide apportée sur l'étude du métabolisme énergétique, axe de recherche que nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion d'approfondir. Merci également d'avoir fait partie des membres de mon comité de suivi de thèse.

Monsieur **Fabrice FLEURY**, pour avoir fait partie des membres de mon comité de suivi de thèse en m'apportant notamment son expertise sur la production des protéines taguées Histidine. Merci pour le prêt de protéines 6xHis qui m'ont grandement servi dans la mise au point de mes Western-Blot.

Madame **Françoise REDINI**, pour les différentes discussions que nous avons eues. Bon courage pour la reprise de l'unité. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

**François LAMOUREUX**, pour ses nombreux conseils scientifiques ou non (recherche postdoctorale, conseils sur certaines expériences, bons plans et astuces pour voyager...). Ce fut un immense plaisir de faire une escapade à New York avec toi après le congrès. Dommage que Frédéric n'ait pas pu se joindre à nous. Grâce à toi, j'ai pu découvrir la culture américaine avec l'envie d'y retourner pour quelques semaines, mois ou années...l'avenir nous le dira.

Le personnel technique des différents plateformes ou services auxquels j'ai eu recours durant de ma thèse : Mme **Audrey RODALLEC** du laboratoire de virologie du CHU de Nantes pour l'accès à la structure L3 ; Mme **Juliette DESFRANCOIS** pour le tri cellulaire sur la plateforme de cytométrie de la SFR santé ; et surtout, le personnel de l'animalerie, **Guyène, Julie et Pierre** pour l'entretien de nos petites bêtes à poil (ou non). Merci pour l'aide et les conseils apportés.

Je ne peux pas finir mes remerciements sans avoir une pensée pour l'ensemble des membres du laboratoire, avec qui j'ai passé de bons moments. Tout d'abord, les anciens « thésards » : **Béregère, Aude, Lidia, Anne-Laure, Pierre, Romain** (ton aide et ton dévouement sont aussi précieux que ceux de Régis), **Audrey** ; mes camarades de thèse : **Marie-Astrid** (pour tes macarons maison, et tous les bons mets délicieux que tu cuisines si bien, ainsi que pour ta sympathie), **Camille** (pour les bons moments passés en salle 123) et **Nathalie** ; ainsi que les futurs « thésards » **Geoffroy et Brice**, bon courage pour les trois prochaines années qui, je l'espère, s'annoncent pour vous riches en résultats. Je remercie également mes collègues de bureau, **Aude** et **Mathilde** pour les bons moments passés lors des « pauses bureautiques » :

commandes, articles, analyse des résultats... Il est également important de remercier les ingénieurs et techniciens qui sont toujours là pour donner un coup de main. En commençant bien entendu par le plus serviable des Vendéens de la région ligérienne : **Régis** !!!! Un grand merci pour tout (tes conseils, ton aide, tes vannes plus ou moins réussies, ta générosité...). je poursuis en remerciant particulièrement pour leur aide : **Rachel** (pour l'aide en histologie), **Kevin, Mathias, Julie C., Céline, Éric, Martine, Jérôme, Séverine**. Sans oublier **Laurent**, notre intendant, et les secrétaires : **Sandrine, Marie-Hélène et Annie** pour la gestion administrative et des commandes... En conclusion, merci à toutes les personnes travaillant au sein de l'unité et également aux différents étudiants stagiaires rencontrés aux cours de ces dernières années, en particulier les étudiants que j'ai encadrés : **Charly, Tsing-Lee, Cécile, Floriane**. Je remercie aussi les différents chercheurs de l'unité : **Franck, Fred B, Benjamin O., Marco, Valérie, Pierre L, Thibault**.

Mes anciens maîtres de stage : **Émilie DENIS, Frédéric PLEWNIAC** et **Catherine MURA**, ainsi que mes anciens professeurs, en particulier **Mylène SALINI** et **Evelyne LE-GROS** pour m'avoir transmis le goût pour la biochimie, la biologie et les biotechnologies.

Enfin, je remercie ma famille (mes parents et mes deux frères) pour m'avoir soutenu et aidé au cours de ces dernières années. Pour avoir toujours été là dans les moments plus ou moins difficiles. Je remercie également ma chère et tendre **Éléonore**, pour m'avoir soutenu et supporté durant ces deux dernières années de thèse, pour le prêt de son ordinateur quand le mien a montré des signes de faiblesse en début de rédaction. Je remercie également sa mère, **Christine**, pour avoir corrigé de façon extrêmement précise ce manuscrit. Les gènes *Dlx* et la signalisation RANK/RANKL ne doivent plus avoir de secrets pour elle.

Je termine par remercier mes ami(e)s : **Caroline, Aurélien, David** ... pour leur amitié, les bons moments passés en leur compagnie... Toutes ces personnes ont contribué de près ou de loin à mon parcours. J'espère n'avoir oublié personne...

# **SOMMAIRE**

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	XVII
CONTEXTE.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	4
<b>I- LE TISSU OSSEUX : UN TISSU DYNAMIQUE ET HAUTEMENT SPECIALISE .....</b>	<b>5</b>
1. <i>Organisation et architecture du tissu osseux</i> .....	6
1.1. Organisation macroscopique .....	6
1.1.1. L'os cortical .....	6
1.1.2. L'os trabéculaire.....	7
1.1.3. Le périoste .....	7
1.2. Organisation microscopique .....	9
1.2.1. La matrice extracellulaire.....	9
1.2.2. Fraction cellulaire.....	11
1.2.2.1. L'ostéoblaste.....	11
1.2.2.2. L'ostéoclaste.....	18
2. <i>Le remodelage osseux</i> .....	21
2.1. Les étapes du remodelage osseux.....	22
2.2. La régulation du remodelage osseux.....	24
<b>II- LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES : DES TUMEURS RARES .....</b>	<b>25</b>
1. <i>Les tumeurs osseuses primitives</i> .....	25
2. <i>L'ostéosarcome</i> .....	26
2.1. Définition, origine et épidémiologie.....	26
2.2. Localisation de l'ostéosarcome .....	28
2.3. Étiologie .....	29
2.3.1. Croissance et ostéosarcome .....	29
2.3.2. Pathologie prédisposant au développement des ostéosarcomes .....	29
2.3.3. Ostéosarcomes et anomalies cellulaires .....	31
2.4. Manifestation et diagnostic clinique .....	31
2.5. Prise en charge de l'ostéosarcome.....	33
3. <i>Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome : cibler le cercle « vicieux »</i> .....	37
<b>III- SIGNALISATION RANK/RANKL/OPG.....</b>	<b>39</b>
1. <i>Les membres de la triade RANK/RANKL/OPG</i> .....	39
1.1. RANK.....	39
1.1.1. Généralités et structure .....	39
1.1.2. Expression .....	41
1.2. RANK .....	41
1.2.1. Généralités et structure .....	41
1.2.2. Expression .....	42
1.3. L'OPG.....	43
1.3.1. Généralités et structures .....	43
1.3.2. Expression .....	44
2. <i>Mutations de RANK/RANKL/OPG en pathologie humaine</i> .....	45
3. <i>Fonction physiologique de l'axe RANK/RANKL/OPG</i> .....	47
3.1. RANK/RANKL et le remodelage osseux .....	48
3.2. RANK/RANKL et immunité.....	50
4. <i>Signalisation RANK/RANKL et cancer</i> .....	52
4.1. Implication générale en cancérologie .....	52
4.1.1. Données cliniques .....	52
4.1.2. Effet direct de la signalisation RANK/RANKL sur les cellules tumorales et rôles de l'OPG.....	54
4.1.3. Expression de RANKL par les cellules tumorales : rôle dans le micro-environnement .....	56
4.2. Implication dans les tumeurs osseuses primitives .....	59
5. <i>LGR4 un nouveau récepteur pour RANKL</i> .....	60

6.	<i>Approches thérapeutiques ciblant la signalisation RANK /RANKL/OPG en cancérologie</i> .....	61
<b>IV-</b>	<b>LES HOMEOGENES DLX</b> .....	<b>63</b>
1.	<i>Généralités sur les homéogènes</i> .....	63
1.1.	Découverte des homéogènes.....	63
1.2.	Structure et propriétés biochimiques des homéogènes .....	64
1.2.1.	Structure .....	64
1.2.2.	Propriétés biochimiques .....	64
2.	<i>Les homéogènes de la famille HOX</i> .....	65
3.	<i>Les homéogènes n'appartenant pas à la famille HOX : homéogènes divergents</i> .....	67
4.	<i>La famille des homéogènes Dlx</i> .....	68
4.1.	Les gènes <i>Dlx</i> au cours de l'évolution.....	68
4.2.	Localisation et organisation des gènes <i>Dlx</i> .....	69
4.3.	Structure des gènes <i>Dlx</i> .....	69
4.3.1.	Structure des protéines DLX .....	69
4.3.2.	Propriétés biochimiques des DLX.....	70
4.4.	Fonctions de l'homéogène <i>Dlx</i> au cours du développement du squelette .....	70
4.4.1.	Au cours de l'embryogenèse.....	70
4.4.2.	Au cours de la croissance osseuse .....	74
4.4.2.1.	<i>Dlx</i> et formation osseuse .....	74
4.4.2.2.	<i>Dlx</i> et résorption osseuse .....	80
4.5.	Homéogènes <i>Dlx</i> et pathologies.....	81
4.5.1.	Pathologies non-cancéreuses .....	81
4.5.2.	Pathologies cancéreuses.....	82
4.5.2.1.	Expression des <i>Dlx</i> dans les cancers non-osseux .....	82
4.5.2.2.	Expression des <i>Dlx</i> dans les cancers osseux.....	82
	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>84</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>86</b>
<b>I-</b>	<b>MODELES CELLULAIRES</b> .....	<b>87</b>
1.	<i>Lignées cellulaires</i> .....	87
2.	<i>Entretien et passage des cultures</i> .....	87
<b>II-</b>	<b>EXPERIMENTATION IN VIVO</b> .....	<b>88</b>
1.	<i>Modèles murins</i> .....	88
1.1.	Modèles conventionnels .....	88
1.2.	Modèles spécifiques pour l'étude de la triade RANK/RANKL/OPG .....	88
2.	<i>Génotypage des animaux</i> .....	89
3.	<i>Induction des tumeurs in vivo</i> .....	90
4.	<i>Suivi expérimental</i> .....	90
5.	<i>Injections de molécules</i> .....	91
6.	<i>Nécropsie</i> .....	91
7.	<i>Histologie</i> .....	91
7.1.	Préparation des échantillons.....	91
7.2.	Coloration histologique .....	92
7.3.	Immunohistologie .....	93
8.	<i>Remise en culture à partir de la pièce tumorale</i> .....	94
9.	<i>Analyse par microtomographie 3D (µCT)</i> .....	94
<b>III-</b>	<b>TECHNIQUES</b> .....	<b>95</b>
1.	<i>Génie génétique : modulation de l'expression des gènes</i> .....	95
1.1.	Induction de gènes par méthode chimique .....	95
1.1.1.	Clonage du gène <i>Dlx4</i> murin .....	95
1.1.1.1.	Amplification de l'ADNc de <i>Dlx4</i> par PCR.....	95
1.1.1.2.	Clonage par « TA Cloning » .....	96
1.1.1.3.	Transformation et sélection des bactéries .....	96
1.1.1.4.	Mini-préparation d'ADN plasmidique.....	96
1.1.1.5.	Maxi-préparation d'ADN plasmidique .....	97
1.1.1.6.	Vérification des séquences .....	97
1.1.2.	Transfection chimique au jetPEI .....	97
1.2.	Induction ou inhibition de gène par méthode lentivirale.....	98
1.2.1.	Etapes de préparation communes à la préparation des lentivirus .....	98

1.2.1.1.	Production des particules lentivirales.....	98
1.2.1.2.	Titration des particules lentivirales.....	98
1.2.1.3.	Transduction des lignées cellulaires d'ostéosarcomes .....	99
1.2.2.	Surexpression de RANK.....	99
1.2.3.	Inhibition de l'expression de <i>Dlx4</i> (des <i>Dlx</i> ) par shARN .....	99
1.2.3.1.	Design des séquences shRNAs.....	100
1.2.3.2.	Préparation de la cassette d'expression .....	100
1.2.3.3.	Insertion de la cassette H1-shARN dans le plasmide pFG12.....	102
2.	<i>Identification de nouveaux transcrits</i> .....	103
2.1.	RACE-PCR .....	103
2.2.	Northern-blot .....	104
2.3.	PCR « glissante » .....	104
3.	<i>Production de protéine taguée</i> .....	105
3.1.	Clonage dans le plasmide pcDNA3.1 c-myc/6xHis .....	105
3.2.	Production et purification de la protéine taguée .....	107
3.3.	Analyse des protéines par western-blot .....	107
4.	<i>Activité des protéases MMP2 et MMP9 : zymographie</i> .....	107
5.	<i>Migration cellulaire</i> .....	108
6.	<i>Etude de la prolifération cellulaire in vitro</i> .....	108
7.	<i>Analyse transcriptionnelle</i> .....	108
7.1.	Extraction des ARN totaux.....	108
7.2.	Reverse transcription (RT).....	109
7.3.	PCR quantitative en temps réel – technologie SYBR green (qPCR) .....	109
7.3.1.	Approche expérimentale .....	110
7.3.2.	Exploitation des résultats.....	110
8.	<i>Etude de l'expression protéique</i> .....	111
8.1.	Extraction des protéines .....	111
8.2.	Western-blot .....	111
9.	<i>Cytométrie en flux</i> .....	112
10.	<i>Etude du métabolisme énergétique</i> .....	113
10.1.	Etude de la phosphorylation .....	113
10.2.	Etude de la glycolyse .....	114
<b>IV-</b>	<b>STATISTIQUES .....</b>	<b>115</b>
<b>PARTIE I : ETUDE DE L'IMPLICATION DES <i>DLX</i> DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OSTEOSARCOME.....</b>		<b>116</b>
<b>I-</b>	<b>CARACTERISATION DU SYSTEME <i>DLX4</i> CHEZ LA SOURIS .....</b>	<b>120</b>
1.	<i>Identification de nouveaux transcrits de <i>Dlx4</i> chez la souris</i> .....	122
1.1.	Race-PCR .....	122
1.2.	PCR glissante .....	124
1.3.	Northern Blot .....	128
1.4.	Prédictions bioinformatiques de l'organisation des transcrits.....	129
2.	<i>Screening de tissus et de lignées cellulaires pour l'expression de BP1 et BP2</i> .....	130
3.	<i>Confirmation de l'existence d'une protéine pour BP2</i> .....	131
<b>II-</b>	<b>MODULATION DU SYSTEME <i>DLX4</i> DANS DES OSTEOSARCOMES MURINS.....</b>	<b>133</b>
1.	<i>Etude de l'implication de <i>Dlx4</i> dans la prolifération tumorale</i> .....	133
1.1.	Surexpression de <i>Dlx4</i> .....	133
1.2.	Inhibition de <i>Dlx4</i> par shRNA .....	136
1.3.	Etude de l'implication de BP2 dans la prolifération cellulaire.....	141
2.	<i>Etude du métabolisme énergétique dans la cellule ostéosarcomateuse en liaison avec l'expression de <i>Dlx4</i></i> .....	144
<b>III-</b>	<b>REGULATION GENIQUE MEDIEE PAR LES TRANSCRITS DE <i>DLX4</i> .....</b>	<b>147</b>
1.	<i>Impact de la surexpression de <i>Dlx4</i> et de BP2</i> .....	147
2.	<i>Impact de l'inhibition de <i>Dlx4</i> par shARN</i> .....	150
<b>PARTIE II : IMPLICATION DE LA SIGNALISATION RANK/RANKL DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES OSTEOSARCOMES .....</b>		<b>152</b>
<b>I-</b>	<b>EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DES ELEMENTS DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG.....</b>	<b>153</b>
<b>II-</b>	<b>CREATION DE LIGNEES MODIFIEES POUR EXPRIMER RANK.....</b>	<b>154</b>
<b>III-</b>	<b>EFFET DE L'EXPRESSION DE RANK SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE .....</b>	<b>157</b>

1.	<i>Analyse de la viabilité cellulaire</i> .....	157
2.	<i>Etude de la croissance tumorale in vivo</i> .....	158
2.1.	<i>Croissance tumorale au sein d'individus immunocompétents</i> .....	158
2.2.	<i>Croissance tumorale au sein d'individus immunodéficients</i> .....	159
3.	<i>Effet du blocage de RANKL sur la croissance tumorale</i> .....	161
<b>IV-</b>	<b>EFFET DE L'EXPRESSION DE RANK SUR LA MIGRATION CELLULAIRE ET LA DISSEMINATION METASTATIQUE.....</b>	<b>162</b>
1.	<i>Analyse de la migration cellulaire in vitro</i> .....	162
2.	<i>Dissémination métastatique in vivo</i> .....	163
2.1.	Effet de l'expression de RANK sur la dissémination métastatique chez des individus immunocompétents.....	163
2.2.	Effet de l'expression de RANK sur la dissémination métastatique chez des individus immunodéficients .....	163
3.	<i>Effet du blocage de RANKL sur la dissémination métastatique</i> .....	164
<b>V-</b>	<b>EFFET DES MODULATIONS DE LA SIGNALISATION RANK /RANKL CHEZ LA SOURIS HOTE .....</b>	<b>165</b>
1.	<i>Effet de l'inactivation de RANKL dans les lymphocytes T</i> .....	165
2.	<i>Effet de la surexpression de RANK dans le lignée monocytes/macrophages</i> .....	166
<b>VI-</b>	<b>EFFET DE L'EXPRESSION DE RANK SUR L'OSTEOLYSE ET L'OSTEOFORMATION TUMORALE .....</b>	<b>168</b>
<b>VII-</b>	<b>EFFETS TRANSCRIPTIONNELS LIES A LA SUREXPRESSION DE RANK DANS LA CELLULE OSTEOSARCOMATEUSE ET A LA STIMULATION PAR RANKL.....</b>	<b>171</b>
1.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur les transcrits de la triade RANK/RANKL/OPG</i> .....	171
2.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur l'apoptose et la prolifération cellulaire</i> .....	171
3.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur la différenciation cellulaire</i> .....	172
4.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur la migration cellulaire</i> .....	172
5.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur des gènes impliqués dans l'oncogenèse</i> .....	173
6.	<i>Effet de l'addition de RANKL sur d'autres cibles transcriptionnelles</i> .....	173
<b>VIII-</b>	<b>ANALYSE DE L'ACTIVITE DES METALLOPROTEASES MMP2 ET MMP9.....</b>	<b>175</b>
<b>PARTIE III : RELATION ENTRE LA SIGNALISATION RANK/RANKL ET LES HOMEOMES DLX .....</b>		<b>176</b>
<b>I-</b>	<b>EFFET DE LA SUREXPRESSION TRANSITOIRE DES GENES <i>Dlx</i> SUR LES GENES RANK/RANKL/OPG .....</b>	<b>177</b>
<b>II-</b>	<b>EFFET DE LA SUREXPRESSION STABLE DE <i>Dlx4</i> SUR LES GENES RANK/RANKL/OPG .....</b>	<b>178</b>
<b>III-</b>	<b>EFFET DE L'INHIBITION DE <i>Dlx4</i> SUR L'EXPRESSION DES MEMBRES DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG .....</b>	<b>180</b>
<b>DISCUSSIONS.....</b>		<b>181</b>
<b>I-</b>	<b>IMPLICATION DES HOMEOMES <i>Dlx</i>, EN PARTICULIER <i>Dlx4</i>, DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OSTEOSARCOME</b>	<b>182</b>
<b>II-</b>	<b>IMPLICATION DE RANK DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE EN ENVIRONNEMENT IMMUNODEFICIENT ..</b>	<b>190</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>196</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>198</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>233</b>
ANNEXE 1   EVALUATION DE LA PURETE DES LYMPHOCYTES T EXTRAITS DE LA RATE A L'AIDE DU KIT DYNABEADS® FLOWCOMP .....		
		234
ANNEXE 2   LISTE DES AMORCES DE QPCR UTILISEES POUR LES ANALYSES CHEZ LA SOURIS.....		
		234
ANNEXE 3   LISTE DES AMORCES DE QPCR UTILISEES POUR LES ANALYSES CHEZ L'HOMME.....		
		234
ANNEXE 4   ARTICLES ET REVUES PUBLIES AU COURS DE LA THESE.....		
		234



# **LISTE DES FIGURES**

FIGURE 1   ORGANISATION STRUCTURALE D'UN OS LONG.....	8
FIGURE 2   COUPE TRANSVERSALE DU SYSTEME DE HAVERS OU OSTEON.....	8
FIGURE 3   DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES.....	11
FIGURE 4   OSTEOLASTOGENESE .....	12
FIGURE 5   PRINCIPAUX MARQUEURS EXPRIMES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION OSTEOLASTIQUE ....	14
FIGURE 6   OSTEOCYTE EMMURE DANS SA LACUNE.....	17
FIGURE 7   OSTEOLASTOGENESE .....	19
FIGURE 8   L'OSTEOCLASTE .....	20
FIGURE 9   LES DIFFERENTES ETAPES DU REMODELAGE OSSEUX .....	21
FIGURE 10   PREPARATION HISTOLOGIQUE D'OSTEOSARCOMES COLORES A L'HEMATOXYLINE .....	27
FIGURE 11   FREQUENCE DE LOCALISATION DES OSTEOSARCOMES .....	28
FIGURE 12   L'OSTEOSARCOME EN IMAGERIE MEDICALE .....	32
FIGURE 13   ÉVALUATION DU NOMBRE DE CELLULES TUMORALES NECROTIQUES SUR UNE PIECE DE RESECTION.....	34
FIGURE 14   PRINCIPALES CIBLES THERAPEUTIQUES DE L'OSTEOSARCOME EN FONCTION DES CAPACITES TUMORALES.....	36
FIGURE 15   LE CERCLE VICIEUX.....	38
FIGURE 16   STRUCTURES DES TROIS ISOFORMES DE RANKL .....	40
FIGURE 17   STRUCTURE DU RECEPTEUR RANK.....	42
FIGURE 18   STRUCTURE DE L'OPG .....	43
FIGURE 19   SIGNALISATION INDUITE PAR LA FIXATION DE RANKL AU RECEPTEUR RANK.....	49
FIGURE 20   SIGNALISATION RANK/RANKL DANS LES CELLULES CANCEREUSES .....	56
FIGURE 21   IMPLICATION DE LA SIGNALISATION RANK/RANKL DANS LES DIFFERENTS STADES DE LA TUMORIGENESE .....	62
FIGURE 22   MUTATIONS HOMEOTIQUES .....	63
FIGURE 23   ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE L'HOMEODOMAINE D'ANTENNAPEPIA DE PLUSIEURS ESPECES .....	64
FIGURE 24   REPRESENTATION DU PRINCIPE DE COLINEARITE SPATIO-TEMPORELLE .....	66
FIGURE 25   REPARTITION DES HOMEOGENES DANS LE GENOME HUMAIN .....	67
FIGURE 26   ORGANISATION DE LA FAMILLE <i>DLX</i> AVEC DES GENES TRANS-PARALOGUES .....	68
FIGURE 27   MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION D'HOMEOGENES.....	71
FIGURE 28   REPRESENTATIONS DES DIFFERENTS CHAMPS MORPHOGENETIQUES FORMES PAR LA COMBINATOIRE D'EXPRESSION DES HOMEOGENES .....	72
FIGURE 29   PHENOTYPE SQUELETTIQUE DE LA SOURIS DOUBLEMENT INVALIDEE POUR <i>DLX5</i> ET <i>DLX6</i> ..	73
FIGURE 30   EXPRESSION DES DIFFERENTS <i>DLX</i> AU COURS DE L'OSTEOBLASTOGENESE .....	75
FIGURE 31   EXPRESSIONS RELATIVES DES HOMEOGENES <i>DLX</i> , DE LEURS PARTENAIRES <i>MSX2</i> , <i>RUNX2</i> , <i>OSX</i> ET DES MARQUEURS PHENOTYPIQUES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION OSTEOLASTIQUE .....	76
FIGURE 32   FACTEURS DE CROISSANCE, FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET MOLECULES MATRICIELLES EXPRIMES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES OS LONGS .....	78
FIGURE 33   REGULATION DE LA MATURATION DES CELLULES CARTILAGINEUSES LORS DE L'OSSIFICATION ENDOCHONDRALE .....	80
FIGURE 34   STRATEGIE DE CLONAGE DANS LE PLASMIDE pSUPER PERMETTANT LA RECUPERATION DU PROMOTEUR H1 .....	101
FIGURE 35   SEQUENCE D'EXPRESSION LENTIVIRALE DU PLASMIDE pFG12 .....	102
FIGURE 36   PRINCIPE GENERAL DE LA REACTION DE RACE-PCR .....	103
FIGURE 37   PRINCIPE GENERAL DE LA REACTION DE PCR « GLISSANTE » .....	105
FIGURE 38   STRATEGIE DE CLONAGE DES INSERTS DANS LE PLASMIDE PERMETTANT L'AJOUT D'UN TAG C-MYC/6xHis.....	106

FIGURE 39   EXEMPLE DE RESULTATS POUR L'ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE (A) ET DE LA GLYCOLYSE (B).....	113
FIGURE 40   EXPRESSION DES GENES DE LA FAMILLE <i>DLX</i> DANS LES DIFFERENTES LIGNEES D'OSTEOSARCOMES DU LABORATOIRE.....	117
FIGURE 41   EXPRESSION RELATIVE DES GENES DE LA FAMILLE <i>DLX</i> DANS DEUX LIGNEES DE REFERENCES D'OSTEOSARCOMES DU LABORATOIRE.....	118
FIGURE 42   DONNEES PRELIMINAIRES CONCERNANT L'IMPLICATION DE <i>DLX4</i> DANS LA PROLIFERATION TUMORALE.....	119
FIGURE 43   ANNOTATIONS DES GENES <i>DLX4</i> HUMAIN ET MURIN PRESENTES DANS LA BASE DE DONNEES DU NCBI.....	120
FIGURE 44   EXPRESSION DE <i>DLX4</i> ET DE <i>BP1</i> DANS DES LIGNEES ET CULTURES PRIMAIRES D'OSTEOSARCOMES ET DE GLIOBLASTOMES.....	121
FIGURE 45   CLONES OBTENUS A L'ISSUE DE L'EXPERIENCE DE 5' RACE.....	122
FIGURE 46   CLONES OBTENUS A L'ISSUE DE L'EXPERIENCE DE 3' RACE.....	123
FIGURE 47   PRODUITS OBTENUS A L'ISSUE DE LA PCR GLISSANTE EN 5'.....	125
FIGURE 48   PRODUITS OBTENUS A L'ISSUE DE LA PCR GLISSANTE EN 3'.....	126
FIGURE 49   SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES TRANSCRITS <i>BP1</i> ET <i>BP2</i> .....	127
FIGURE 50   NORTHERN BLOT REVELE AVEC DES SONDAS RECONNAISSANT TOUTES LES FORMES DE <i>DLX4</i> .....	128
FIGURE 51   STRUCTURES DES TRANSCRITS <i>BP1</i> ET <i>BP2</i> ET DES PROTEINES CODEES.....	129
FIGURE 52   ANALYSE DE LA PRESENCE DES TRANSCRITS DE <i>BP1</i> ET <i>BP2</i> DANS DIVERS TISSUS ET CELLULES PAR PCR STANDARD.....	130
FIGURE 53   ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES TRANSCRITS <i>DLX4</i> , <i>BP1</i> ET <i>BP2</i> DANS DIVERS TISSUS ET CELLULES.....	131
FIGURE 54   DETECTION DE LA PROTEINE <i>BP2</i> MARQUEE A L'AIDE D'UNE SEQUENCE C-MYC/6XHIS.....	132
FIGURE 55   ANALYSE DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE <i>DLX4</i> DANS LES CELLULES A3N LE SUREXPRIMANT.....	134
FIGURE 56   VIABILITE CELLULAIRE DES CLONES A3N SUREXPRIMANT <i>DLX4</i> .....	134
FIGURE 57   EFFET DE LA SUREXPRESSION DE <i>DLX4</i> SUR LA VITESSE DE PROLIFERATION DES CLONES A3N <i>IN VIVO</i> .....	135
FIGURE 58   ANALYSE DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE <i>DLX4</i> DANS LES CELLULES PG1 TRANSDUITES PAR LES SHARN ANTI- <i>DLX4</i> .....	136
FIGURE 59   ETUDE DE L'EFFET DE L'INHIBITION DE <i>DLX4</i> SUR LA VITESSE DE PROLIFERATION DU CLONE PG1 <i>IN VIVO</i> .....	137
FIGURE 60   VIABILITE CELLULAIRE DES CLONES ISSUES DES CELLULES PG1 TRANSDUITES PAR LES SHARN ANTI- <i>DLX4</i> .....	138
FIGURE 61   ANALYSE DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE <i>DLX4</i> DANS LES CELLULES ISSUES DES PIECES TUMORALES REMISES EN CULTURE.....	139
FIGURE 62   COURBE DE CROISSANCE DES TUMEURS INDUITES A L'AIDE DES CULTURES ISSUES DE LA PREMIERE EXPERIENCE D'INHIBITION DE <i>DLX4</i> PAR SHARN.....	140
FIGURE 63   ANALYSE DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE <i>BP2</i> DANS LES CELLULES TRANSFECTEES POUR SUREXPRIMER <i>BP2</i> .....	141
FIGURE 64   VIABILITE CELLULAIRE DES CLONES SUREXPRIMANT <i>BP2</i> .....	142
FIGURE 65   EFFET DE LA SUREXPRESSION DE <i>BP2</i> SUR LA VITESSE DE PROLIFERATION DES CLONES A3N ET PG1 <i>IN VIVO</i> .....	143
FIGURE 66   ETUDE DE LA GLYCOLYSE CHEZ LES CELLULES A3N, PG1 ET SH207.....	145
FIGURE 67   ETUDE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE CHEZ LES CELLULES A3N, PG1 ET SH207.....	146
FIGURE 68   EFFET DES SUREXPRESSIONS DE <i>DLX4</i> ET DE <i>BP2</i> SUR L'EXPRESSION DES GENES <i>DLX</i> .....	148
FIGURE 69   EFFET DES SUREXPRESSIONS DE <i>DLX4</i> ET DE <i>BP2</i> SUR L'EXPRESSION DE <i>BCL-2</i> , <i>C-MYC</i> , <i>p21</i> ET <i>p53</i> .....	149

FIGURE 70   EFFET DE L'INHIBITION DE <i>DLX4</i> PAR LES SHARN 207 ET 1128 SUR LES GENES <i>DLX</i> .....	150
FIGURE 71   EFFET DE L'INHIBITION DE <i>DLX4</i> PAR LES SHARN 207 ET 1128 SUR LES GENES <i>BCL-2</i> , <i>C-MYC</i> , <i>p21</i> ET <i>p53</i> .....	151
FIGURE 72   EXPRESSION RELATIVE DES TRANSCRITS RANK, RANKL ET OPG DANS LES LIGNEES HUMAINES D'OSTEOSARCOMES.....	153
FIGURE 73   EXPRESSION RELATIVE DES TRANSCRITS RANK, RANKL ET OPG DANS LES LIGNEES MURINES D'OSTEOSARCOMES.....	154
FIGURE 74   VALIDATION DE LA SUREXPRESSION DE hRANK DANS LA LIGNEE HOS.....	155
FIGURE 75   VALIDATION DE LA SUREXPRESSION DE hRANK DANS LES TUMEURS INDUITES PAR LA LIGNEE HOSRK.....	155
FIGURE 76   VALIDATION DE LA SUREXPRESSION DE mRANK DANS LES CELLULES A3N ET PG1.....	156
FIGURE 77   VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES SUREXPRIMANT OU NON RANK.....	157
FIGURE 78   INJECTION DES CELLULES PG1 SUREXPRIMANT RANK OU NON CHEZ DES SOURIS IMMUNOCOMPETENTES.....	158
FIGURE 79   INJECTION DES CELLULES A3N SUREXPRIMANT RANK OU NON CHEZ DES SOURIS IMMUNOCOMPETENTES.....	159
FIGURE 80   INJECTION DES CELLULES MURINES D'OSTEOSARCOMES SUREXPRIMANT RANK OU NON CHEZ DES SOURIS IMMUNODEFICIENTES.....	160
FIGURE 81   INJECTION DES CELLULES HOS SUREXPRIMANT RANK OU NON CHEZ DES SOURIS IMMUNODEFICIENTES.....	161
FIGURE 82   ETUDE DE LA MIGRATION IN VITRO DES CELLULES HOS ET PG1 MODIFIEES OU NON POUR L'EXPRESSION DE RANK.....	162
FIGURE 83   GENOTYPAGE ET VALIDATION DE LA RECOMBINAISON DES SOURIS RANKL <sup>At</sup> .....	165
FIGURE 84   INJECTION DES CELLULES PG1 SUREXPRIMANT RANK CHEZ DES SOURIS INVALIDEES OU NON POUR RANKL DANS LES LYMPHOCYTES T.....	166
FIGURE 85   INJECTION DES CELLULES PG1 SUREXPRIMANT RANK CHEZ LES SOURIS RANK TRANSGENE .....	167
FIGURE 86   VUES EN 3 DIMENSIONS DES TIBIAS DES SOURIS INJECTEES AU COURS DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DE RANK PAR LES OSTEOSARCOMES.....	168
FIGURE 87   ANALYSE DES PARAMETRES OSSEUX DES TIBIAS ISSUS DES EXPERIMENTATIONS DE L'ETUDE SUR RANK.....	169
FIGURE 88   VUE EN 3D ET ANALYSE DES PARAMETRES OSSEUX DES TIBIAS ISSUS DE L'EXPERIMENTATION REALISEE CHEZ LA SOURIS RANKL <sup>At</sup> .....	170
FIGURE 89   ANALYSE DE L'ACTIVITE DES METALLOPROTEASES MMP2 ET MMP9.....	175
FIGURE 90   ANALYSE DE L'EXPRESSION DES TRANSCRITS DE RANKL, OPG ET LGR4 AU SEIN DES LIGNEES A3N MODIFIEES.....	179
FIGURE 91   ANALYSE DE L'EXPRESSION DES TRANSCRITS DE RANKL, OPG ET LGR4 AU SEIN DES LIGNEES PG1 TRANSDUITES PAR LES SHARN ANTI- <i>DLX4</i> .....	180
FIGURE 92   REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX MODES DE FONCTIONNEMENT DE LA SIGNALISATION RANKL/RANK DANS L'OSTEOSARCOMES.....	190
FIGURE 93   ANALYSE COMPARATIVE DE L'INJECTION DES CELLULES PG1 CHEZ LES SOURIS SAUVAGES ET RANKL KO (N=4).....	192

# **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1   COMPOSITION D'UN OS LONG .....	10
TABLEAU 2   LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES .....	25
TABLEAU 3   PRINCIPAUX TYPES D'OSTEOSARCOMES.....	27
TABLEAU 4   PATHOLOGIES PREDISPOSANT AU DEVELOPPEMENT D'UN OSTEOSARCOME .....	30
TABLEAU 5   PRINCIPAUX AGENTS DE CHIMIOTHERAPIE UTILISES DANS LE TRAITEMENT DES OSTEOSARCOMES.....	35
TABLEAU 6   MUTATIONS HUMAINES DES GENES DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG.....	46
TABLEAU 7   PHENOTYPES DES SOURIS INVALIDES POUR LES MEMBRES DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG .....	47
TABLEAU 8   EXPRESSION DE RANK ET RANKL DANS LES CANCERS .....	53
TABLEAU 9   LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DES QUATRE SERIES DE GENES HOX CHEZ L'HUMAIN ET LA SOURIS.....	65
TABLEAU 10   LIGNEES D'OSTEOSARCOMES UTILISEES AU COURS DE CES ETUDES.....	87
TABLEAU 11   AMORCES DE GENOTYPAGE DES SOURIS RANK <sup>Tg</sup> , RANKL <sup>F/F</sup> ET ICRe.....	89
TABLEAU 12   PROTOCOLE DU TRICHOME DE MASSON .....	92
TABLEAU 13   LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN IMMUNOHISTOLOGIE .....	93
TABLEAU 14   AMORCES DE CLONAGE POUR DLX4.....	96
TABLEAU 15   SEQUENCES DES SHARNS CIBLANT SPECIFIQUEMENT <i>DLX4</i> .....	100
TABLEAU 16   LISTES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN WESTERN-BLOTTING .....	112
TABLEAU 17   LISTES DES AMORCES UTILISEES POUR LA PCR GLISSANTE EN 5'.....	124
TABLEAU 18   LISTES DES AMORCES UTILISEES POUR LA PCR GLISSANTE EN 3'.....	126
TABLEAU 19   SEQUENCES PROTEIQUES DE BP1 ET BP2.....	129
TABLEAU 20   ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE DES EFFETS DE L'ADDITION DE RANKL SUR LES CELLULES HOS ET HOSRK .....	174
TABLEAU 21   ANALYSE DES EFFETS DE L'EXPRESSION TRANSITOIRE DE <i>DLX2</i> , <i>DLX4</i> ET <i>DLX5</i> SUR LES MEMBRES DE LA TRIADE RANK/RANKL/OPG .....	178
TABLEAU 22   CORRESPONDANCE ENTRE LES FORMES MURINES ET HUMAINES DE <i>DLX4</i> .....	184
TABLEAU 23   RESUME DES EFFETS DE <i>DLX4</i> SUR L'EXPRESSION DES AUTRES GENES <i>DLX</i> .....	185
TABLEAU 24   LISTE NON EXHAUSTIVES DES CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES CONNUES POUR LES DIFFERENTS GENES <i>DLX</i> D'APRES NAVET ET AL., 2014 [461]. .....	186
TABLEAU 25   RESUME DES EFFETS DE <i>DLX4</i> OBSERVES SUR CERTAINS FACTEURS IMPLIQUES DANS LA TUMORIGENESE .....	187
TABLEAU 26   PARTENAIRES PROTEIQUES DES <i>DLX</i> .....	188

# **LISTE DES ABBREVIATIONS**

- **µg** : microgramme
- **µL** : microLitre
- **µm** : micromètre
- **Aa** : Acides aminés
- **ACTB** : β-actine
- **ADAM** : **A** Disintegrin and metalloproteinase
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ALP** : Alkaline Phosphatase
- **AP-1** : Activating protein-1
- **ARNm** : acide ribonucléique messenger
- **Bax** : Bcl-2-associated X protein
- **Bcl-2** : B cell lymphoma-2
- **BMP** : Bone Morphogenetic Proteins
- **BP1** : Beta-Protein 1
- **BSP** : Bone Sialoprotein ou sialoprotéine osseuse
- **CD** : Cluster Differentiation
- **CDK4** : Cyclin-Dependent Kinase 4
- **cDNA** : équivalent d'ADN complémentaire
- **CEEA-PdL** : Comité d'Ethique en Expérimentation Animale-Pays de la Loire
- **CFU-GM** : Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage
- **Coll1A** : Collagène de type 1
- **CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques
- **CSM** : Cellules Souches Mésenchymateuses
- **CXCL** : chemokine ligand
- **CXCR** : chemokine receptor
- **DAB** : Diaminobenzidine
- **DD** : Death Domain homologous
- **DIG** : Digoxygénine
- **Dll** : Distal-less
- **Dlx** : Distal-less Homeobox
- **ECAR** : Extracellular Acidification rate
- **EHD** : Extensions de l'homéodomaine
- **EMT** : Epithelial-mesenchymal transition
- **ERK** : Extracellular signal-regulated kinases
- **FAD** : Flavine adénine dinucleotide
- **Fc** : *Fragment cristallisable*
- **FEO** : Familial expansile osteolysis
- **FGF** : Fibroblast growth factor ou facteur de croissance des fibroblastes
- **FOXP1** : Forkhead Box N1
- **GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- **GEMM** : Genetically Engineered Mouse Model
- **GFP** : Green Fluorescence Protein
- **GSK** : Glycogen synthase kinase
- **HE** : Hématoxyline et éosine
- **Hh** : Hedgehog
- **His** : Histidine
- **HRP** : Horseradish peroxidase
- **IGF** : Insulin Growth Factor
- **Il** : Interleukines
- **INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
- **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique
- **IRS-2** : Insulin receptor substrat 2
- **JNK** : c-Jun N-terminal kinases
- **Kb** : kilobase
- **kDa** : kiloDaltons
- **LGR4** : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4
- **LTR** : Long terminal repeats
- **MAGE** : Melanoma-associated antigen
- **MAPK** : Mitogen-activated protein kinases
- **M-CSF** : Macrophage monocyte-Colony Stimulating Factor
- **MDM2** : Murine Double Minute 2
- **MITF** : Microphthalmia-associated transcription factor
- **MMPs** : Matrix Metalloproteinases
- **Msx2** : Msh homeobox 2
- **mTOR** : mammalian target of rapamycin
- **NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NCBI** : National Center for Biotechnology Information
- **Nfatc1** : nuclear factor of activated T-cells 1
- **NF-κB** : Nuclear Factor Kappa B
- **OC** : Ostéocalcine
- **OCR** : Oxygen consumption rate
- **OMIM** : Online Mendelian Inheritance in Man
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **OP** : ostéopontine
- **OPG** : Ostéoprotégerin



- **OPN** : **O**stéopontine
- **Osx** : **O**stérix
- **PAL** : **P**hosphatase **a**lcaline
- **pb** : paires de **b**ases
- **PBS** : **P**hosphate **B**uffer **S**aline
- **PCR** : **P**olymerase **C**hain **R**eaction (q : quantitative)
- **PDGF** : **P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor
- **PFA** : **P**araformaldehyde
- **PGE2** : prostaglandine **E2**
- **pH** : potentiel **H**ydrogène
- **PI3K** : **P**hosphoinositide **3**-kinase
- **PLC** : **P**hospholipase **C**
- **PPAR $\gamma$ 2** (**P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctived **R**eceptor  $\gamma$ 2)
- **PTH** : **P**arathyroïd hormone ou hormone parathyroïdienne
- **RACE-PCR** : **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds-**P**CR
- **RANK(L)** : **R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear **F**actor **k**appa **B** (**L**igand)
- **Rcf** : relative centrifugal force
- **REG** : **R**éticulum **e**ndoplasmique **g**ranuleux
- **RGD** : séquence Arginine, Glycine, Acide Aspartique
- **RHD** : **R**égions d'homologie des *Dlx*
- **RT** : **R**everse **t**ranscription
- **Runx2** : (Runt-related transcription factor 2)
- **S1P** : Sphingosine 1 **P**hosphate
- **SD** : **S**tandard **d**eviation
- **SEM** : **S**tandard **e**rror of **m**ean
- **shARN** : short-hairpin-**A**RN
- **SNP** : **S**ingle-**N**ucleotide **P**olymorphism
- **STAT** : **S**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription
- **SVF** : **S**érum de veau **f**œtal
- **TA** : **T**empérature **a**mbiante
- **TACE** : **T**NF **a**lpha **c**onverting **e**nzyme
- **TAM** : **T**umor **a**ssociated **m**acrophages
- **TCR** : **T** cell **r**eceptor
- **TDM** : **T**omodensitométrie
- **TDO** : **T**richo-**D**ento-**O**sseux
- **TEM** : **T**ransition **é**pithélio-mésenchymateuse
- **TGF** : **T**ransforming **G**rowth **F**actor
- **TNF $\alpha$**  : **T**umor **N**ecrosis **F**actor **a**lpha
- **TRAF** : **T**NF **r**eceptor **a**ssociated **f**actor
- **TRAIL** : **T**NF **r**elated **a**poptosis **i**nducing **l**igand
- **TRAP** : **T**artrate-resistant **a**cid **p**hosphatase
- **U/mL** : **U**nités par **m**illi**L**itre
- **UTR** : **u**ntranslated **r**egion
- **VEGF** : **V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor

# **CONTEXTE**

En préambule de ce mémoire, il me semblait important de resituer le contexte dans lequel s'inscrivent les travaux de recherche que j'ai menés durant ces trois dernières années. Vous trouverez donc ci-dessous le préambule à ce mémoire.

Malgré une meilleure prise en charge et une efficacité accrue des traitements durant cette dernière décennie, le cancer reste une des maladies les plus fréquentes et meurtrières dans le monde. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait, en 2012, à environ 14 millions le nombre de nouveaux cas de cancer par an et à 8,2 millions le nombre de décès liés à cette maladie par an (site de l'OMS) dans le monde. De même, l'OMS estime que le nombre de nouveaux cas devrait progresser d'environ 70 % dans les deux prochaines décennies. Cette progression peut être expliquée par l'allongement de la durée de vie, mais aussi, sans doute par les nombreuses pollutions qui nous entourent.

Parmi les nombreux types de cancers, les cancers pédiatriques sont rares et représentent seulement 0,5% à 4,6% de l'ensemble des cas de cancers (OMS). Ils diffèrent généralement de ceux retrouvés chez l'adulte, et sont parfois presque exclusivement retrouvés chez l'enfant, par exemple les neuroblastomes et les tumeurs osseuses primitives. Au sein des cancers de l'enfant, les trois quarts sont des leucémies (30%), suivis des tumeurs du système nerveux central (24,1%) et des lymphomes (11,4%). Enfin, parmi les quelques pour cent restants, sont retrouvées les tumeurs osseuses primitives (environ 6% des cancers de l'enfant et moins de 1% de tous les cancers).

Le laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, INSERM UMR957, a fait des tumeurs osseuses primitives l'un de ses sujets de recherche principaux. Au sein de ce laboratoire, plusieurs axes de recherches sont explorés, notamment les relations entre microenvironnement tumoral et cellule cancéreuse, mais aussi les relations entre agressivité tumorale et modulation de voies de signalisation et/ou de facteur de transcription.

C'est dans ce contexte que s'intègrent mes travaux de thèse portant sur l'implication des facteurs de transcription *Dlx* (Distal-Less Homeobox), et de la voie de signalisation RANK/RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B (/Ligand)) dans la physiopathologie de l'ostéosarcome. En effet, les gènes de la famille *Dlx* sont connus pour leurs interventions au cours du développement précoce et dans le processus d'ostéoblastogenèse [1]. Les tumeurs osseuses primitives étant des tumeurs du squelette en développement, il est apparu tout naturel de s'intéresser à l'implication potentielle de ces gènes. De plus, bien que ces tumeurs puissent

être d'origines cellulaires variées (ostéoclastique, ostéoblastique, stromale ou encore mésenchymateuse), elles ont la caractéristique commune de perturber le remodelage osseux en induisant localement un déséquilibre de l'homéostasie osseuse. Cette perturbation du microenvironnement favorise ainsi la progression tumorale et l'apparition de métastases dans l'organisme. L'homéostasie osseuse étant majoritairement contrôlée par la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG [2], un intérêt particulier s'est porté sur les différents partenaires de cette voie de signalisation dans la physiopathologie de l'ostéosarcome.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## **I- Le tissu osseux : un tissu dynamique et hautement spécialisé**

Le tissu osseux, d'origine mésenchymateuse (mésodermique) dans la majorité du squelette à l'exception de la partie antérieure du crâne et de la face qui dérivent des crêtes neurales céphaliques elles-mêmes d'origine ectodermique [3], est un tissu conjonctif dynamique et hautement spécialisé jouant un rôle capital au sein de l'organisme. Il est composé à la fois d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent sa rigidité et son élasticité. Ces propriétés lui attribuent plusieurs fonctions aussi bien mécaniques, hématopoïétiques, que métaboliques.

Par ses fonctions mécaniques, le squelette constitue une véritable « charpente » pour l'organisme en permettant le soutien et la protection des organes (la cage thoracique pour le cœur et les poumons, la boîte crânienne pour le cerveau). Il constitue également un point d'ancrage au système musculaire, via les tendons, ce qui permet ainsi à l'être vivant de se mouvoir.

D'autre part, à ces fonctions « mécaniques », s'ajoute un rôle dans le métabolisme. En effet, le squelette est le principal réservoir d'ions minéraux (en particulier calcium et phosphore) dans l'organisme, ce qui lui confère un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et dans la régulation de la composition ionique des fluides extracellulaires (sang, lymphe...).

Enfin, ce tissu joue un rôle majeur dans la production et le renouvellement des cellules sanguines puisqu'il renferme, dans les espaces médullaires des os, la moelle osseuse qui est le siège de l'hématopoïèse (cette moelle osseuse est aussi un réservoir de cellule souche mésenchymateuse).

Comme le suggèrent ses différentes fonctions physiologiques, le tissu osseux (squelette) n'est pas un système figé comme pourrait le laisser croire sa rigidité apparente. En effet, tout au long de la vie, ce tissu est en perpétuel remaniement, c'est-à-dire qu'il est constamment détruit puis reconstruit suivant les différentes phases d'un processus appelé remodelage osseux. Ce processus permet ainsi à l'organisme de réparer les fractures, de libérer des minéraux, et d'allonger ou de modifier les os.

## 1. Organisation et architecture du tissu osseux

Le squelette humain est constitué de 206 os qui peuvent être de trois types différents : les os plats (omoplates, sternum, etc.) les os longs (fémurs, humérus, tibias, etc.) ainsi que les os courts (phalanges, vertèbres, etc.) Ces différents types d'os sont issus de processus d'ossification (primaires) différents : l'ossification endochondrale et l'ossification membranaire. Ainsi, les os courts et les os longs sont formés par ossification endochondrale (remplacement progressif des maquettes cartilagineuses, déposées par les chondrocytes, par une matrice ostéoïde sécrétée par les ostéoblastes), alors que les os plats sont préférentiellement issus de l'ossification membranaire (apposition directe d'une matrice extracellulaire, par les ostéoblastes, sous une membrane qui est progressivement minéralisée). Il existe d'autres processus d'ossification (primaires et secondaires) qui ne seront pas abordés dans ce mémoire. Afin de décrire l'organisation générale des os, les os longs seront pris ici comme exemple, car ils sont les plus représentatifs.

### 1.1. Organisation macroscopique

Chez l'adulte, les os longs sont constitués d'une partie centrale cylindrique nommée la diaphyse et de deux extrémités plus larges et arrondies appelées épiphyses (**Figure 1**). Les épiphyses sont recouvertes de cartilage afin de former les articulations en s'associant aux os voisins. Enfin des régions coniques, nommées métaphyses, relient chaque diaphyse aux épiphyses (**Figure 1**). Au cours de la croissance, une plaque de cartilage sépare les métaphyses des épiphyses et est appelée plaque de croissance [2].

D'un point de vue histologique, deux structures de base distinctes sont observées, l'os cortical (ou os compact) situé en périphérie et l'os trabéculaire (ou spongieux) situé dans la cavité intérieure de l'os (**Figure 1**). L'ensemble, à l'exception des zones de cartilage et de fixation des tendons et ligaments, est entouré par une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste. C'est la porosité qui permet de faire la distinction entre l'os trabéculaire et l'os cortical. Ce degré de porosité représente respectivement entre 30 et 90 % pour l'os trabéculaire et 5 et 30 % pour l'os cortical.

#### 1.1.1. L'os cortical

L'os cortical, également nommé os compact, est un os dense et poreux situé sous le périoste. Il représente entre 80 et 85% du tissu osseux et est composé d'une matrice minéralisée

de type lamellaire. L'os cortical est formé par la juxtaposition d'unités structurales cylindriques, de 200 à 300 micromètres ( $\mu\text{m}$ ) de diamètre, appelées ostéons qui lui confèrent sa résistance (**Figure 1, Figure 2**). Chaque ostéon est composé d'une trentaine de lamelles de fibre de collagène concentriques, orientées selon l'axe principal de l'os, et disposées autour d'un canal central permettant l'acheminement des flux nourriciers de l'os. Ce dernier, appelé canal de Harvers est large de 40 à 50  $\mu\text{m}$  et permet le passage des vaisseaux sanguins, des fibres nerveuses et des prolongements cytoplasmiques (**Figure 1, Figure 2**). Largement ouvert dans les ostéons primaires, il est ensuite délimité par des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes qui se retrouvent, par la suite, emmurés dans la matrice extracellulaire. Ces cellules assurent ainsi le comblement du canal durant la maturation des ostéons et deviennent alors des ostéocytes. Par ailleurs, la jonction entre les structures de Harvers est assurée par d'autres canaux transversaux, les canaux de Volkmann qui permettent la communication entre la vascularisation du périoste et les vaisseaux de la moelle osseuse [4].

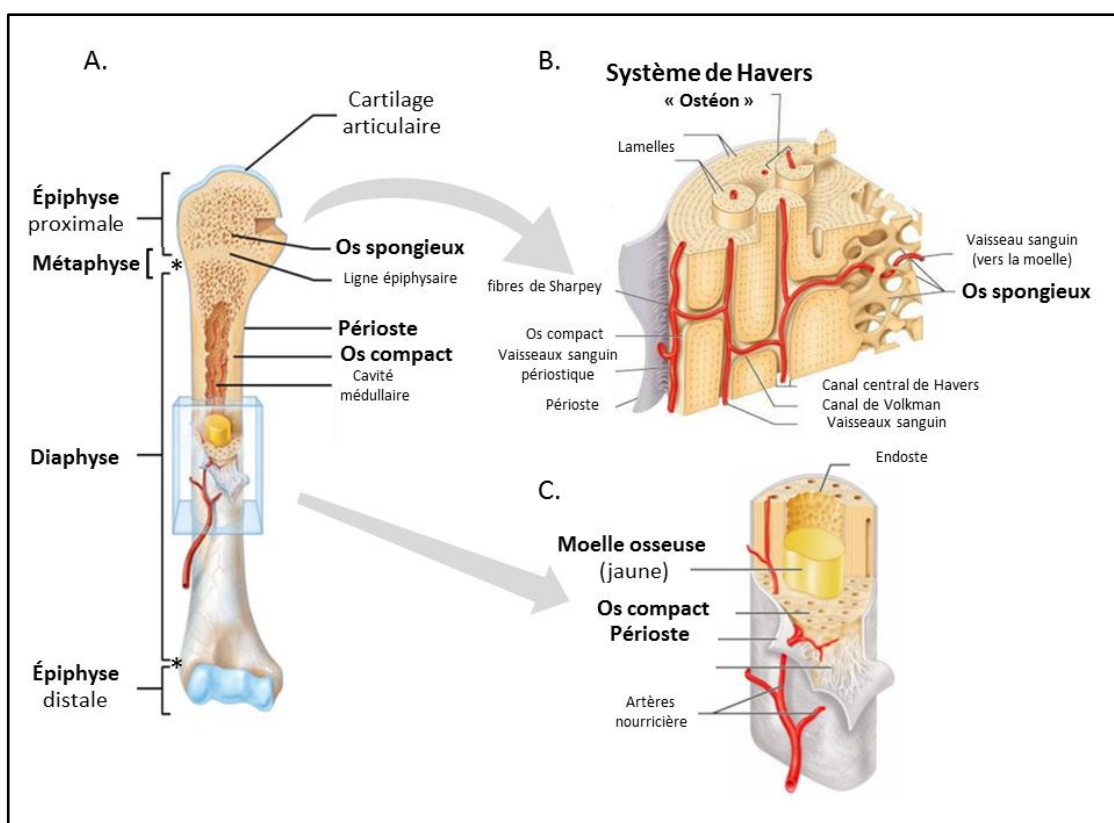
#### 1.1.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire, également nommé os spongieux en raison de sa structure en éponge, est un os peu calcifié, peu dense et très poreux qui représente seulement 20 % du tissu osseux. Il est situé principalement au niveau des épiphyses et des métaphyses des os longs, et on le retrouve également au niveau des os plats et courts. L'os trabéculaire est constitué d'un réseau tridimensionnel de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches (**Figure 1**). Ainsi, l'os trabéculaire représente une surface d'échange considérable notamment avec la moelle osseuse qui s'insère dans les travées osseuses et représente 75% de son volume [2]. Enfin, à l'interface entre la moelle osseuse et le tissu minéralisé de nombreuses cellules ostéoblastiques jouent un rôle essentiel dans les échanges entre ces deux structures.

#### 1.1.3. Le périoste

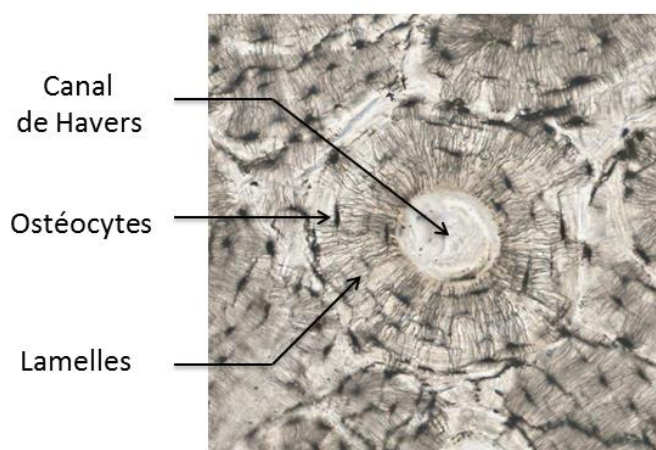
Le périoste est une fine membrane qui recouvre l'os sur sa quasi-totalité à l'exception des zones cartilagineuses des articulations et des zones d'accroche des tendons où il est absent (**Figure 1**). Il est constitué d'une couche externe conjonctive fibreuse et d'une couche interne constituée de cellules souches et de cellules pré-osteoblastiques. Parmi ses fonctions, le périoste assure la croissance en longueur et circonférentielle des os, mais également la transmission d'informations en cas de douleurs ou de fractures. Enfin par sa très forte vascularisation, il assure l'apport des nutriments à l'os.





**Figure 1 | Organisation structurale d'un os long**

(A) Structure générale ((\*) emplacement de la métaphyse) ; (B) vue éclatée d'une épiphyse, constituée à la fois d'os compact et d'os spongieux ; (C) vue éclatée de la diaphyse, contenant en son cœur la moelle osseuse. Adapté de Pearson Education Inc (2004-2006), Benjamin Cummings



**Figure 2 | Coupe transversale du système de Havers ou ostéon**

Adaptée de :

<http://virtualmicroscope.iime.cloud/v/1300/?lat=42.65820178455672&lng=5.108642578125&zoom=6>

## 1.2. Organisation microscopique

Le tissu osseux est constitué de plusieurs éléments cellulaires : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les cellules quiescentes, auxquels s'ajoute une matrice extracellulaire qui représente 92 à 95 % du volume tissulaire [2]. La fraction cellulaire ne représente ainsi que 5 % du volume de l'os (**Tableau 1**).

### 1.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est composée à la fois d'une fraction organique (25-35%) et d'une fraction minérale (65-75%) qui lui confèrent ses propriétés physiques (rigidité et élasticité). Sa teneur en eau, d'environ 10%, est très variable en fonction de la pièce osseuse, du degré de minéralisation, et de l'âge des individus.

La fraction organique, ou fraction (matrice) ostéoïde est constituée essentiellement par une protéine fibreuse : le collagène de type I. Cette protéine associée à deux autres protéines de structure, la fibronectine et l'élastine forment la substance fibrillaire (90%). Outre ces protéines fibreuses, la fraction organique est composée d'une substance interfibrillaire (10%) comprenant plus de 200 protéines différentes en grande partie synthétisées par les cellules osseuses. Parmi ces protéines sont retrouvés de nombreux composants tels que des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse...), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phospholipides, des phosphoprotéines ou encore des protéoglycans (**Tableau 1**). Au sein de ces protéines non collagéniques, l'ostéocalcine (OC), qui est la protéine non collagénique la plus abondante (10 à 20%) est spécifique de la matrice extracellulaire. Elle constitue un marqueur de l'activité ostéoblastique et joue un rôle dans la minéralisation et l'attraction des ostéoclastes au niveau des foyers de résorption [5-7]. D'autres protéines revêtent un caractère important, comme la sialoprotéine osseuse (BSP) intervenant dans les processus de différenciation cellulaire, de minéralisation et de résorption [8,9]. Cette protéine, ainsi que l'ostéopontine (OPN) participent à l'adhérence des cellules osseuses aux cristaux d'hydroxyapatite. En effet, une grande partie de ces protéines possèdent des motifs conservés de liaisons aux intégrines, motif : RGD soit Arginine (R), Glycine (G), Acide aspartique (D). Ainsi les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettent l'attachement à la matrice extracellulaire via ces motifs [10]. Des cytokines et des facteurs de croissance (Transforming Growth factor (TGF), interleukines (IL), Bone Morphogenetic Proteins (BMP),...) sont également présents dans cette matrice en petite quantité [11]. Ces facteurs protéiques jouent un rôle

important dans l'activation et la différenciation des cellules osseuses ainsi que dans le couplage entre résorption et formation osseuses [4,12].

			Fonctions	
Fraction cellulaire (≈5%)	Ostéoclastes		Remodelage osseux	
	Ostéoblastes			
	Ostéocytes		Synthèse des protéines de la fraction organique de la MEC	
	Ostéoprogéniteurs			
Matrice Extra-cellulaire (≈95%)	Eau (≈10%)			
	Fraction organique (≈25%)	Partie Fibrillaire (≈90%)	Collagène I	structural
			Fibronectine	adhérence cellules / matrice
			Elastine	structural
		Partie inter fibrillaire (≈10%)	protéoglycanes glycosaminoglycanes	diffusion des nutriments
			glycoprotéines ostéocalcine ostéopontine	minéralisation adhérence
			sialo-protéines osseuses	minéralisation
	Fraction minérale (≈65%)	hydroxyapatites Ions		

**Tableau 1 | Composition d'un os long**

La fraction cellulaire de l'os long représente environ 5 % du volume total, alors que la matrice extracellulaire composée d'une fraction organique, et d'une fraction minérale représente à elle seule environ 95 % du volume de l'os long. D'après Pierre Guihard (Thèse du laboratoire).

Concernant la fraction minérale, elle représente entre 50 à 70 % de la masse osseuse et est composée essentiellement de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  disposés dans les espaces interfibrillaires (**Tableau 1**). Cette fraction confère au tissu osseux sa résistance et sa rigidité. En plus du calcium et du phosphore présents dans ces cristaux, de grandes quantités de magnésium et de sodium y sont également retrouvées. De ce fait, l'os représente une réserve minérale importante (99% du calcium, 85% du phosphore, et entre 40 et 60 % du sodium et du magnésium) qui pourra être sollicitée grâce au processus de remodelage osseux afin de maintenir l'homéostasie.

### 1.2.2. Fraction cellulaire

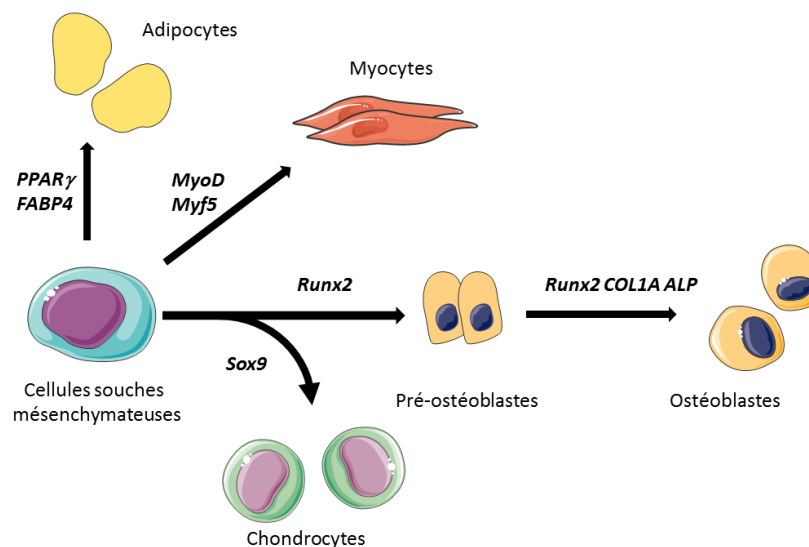
La fraction cellulaire de l'os qui représente 5 % du volume total est constituée principalement de deux types cellulaires qui sont l'ostéoblaste et l'ostéoclaste.

#### 1.2.2.1. L'ostéoblaste

##### a. Genèse de l'ostéoblaste (ou ostéoblastogenèse)

L'ostéoblaste est issue de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en cellules ostéoprogénitrices puis en ostéoblastes au cours d'un processus appelé ostéoblastogenèse [13,14]. Ces CSM, d'origine mésodermique, sont principalement retrouvées dans la moelle osseuse et dans la zone médullaire du périoste. Ces cellules souches, qui possèdent une grande plasticité et une capacité de prolifération élevée, peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires : les ostéoblastes, les adipocytes, les myocytes et les chondrocytes [15,16]. L'orientation des CSM dans une voie ou dans une autre dépendra de l'expression temporelle de facteurs de transcription spécifiques (**Figure 3**) présentés, pour les principaux, ici :

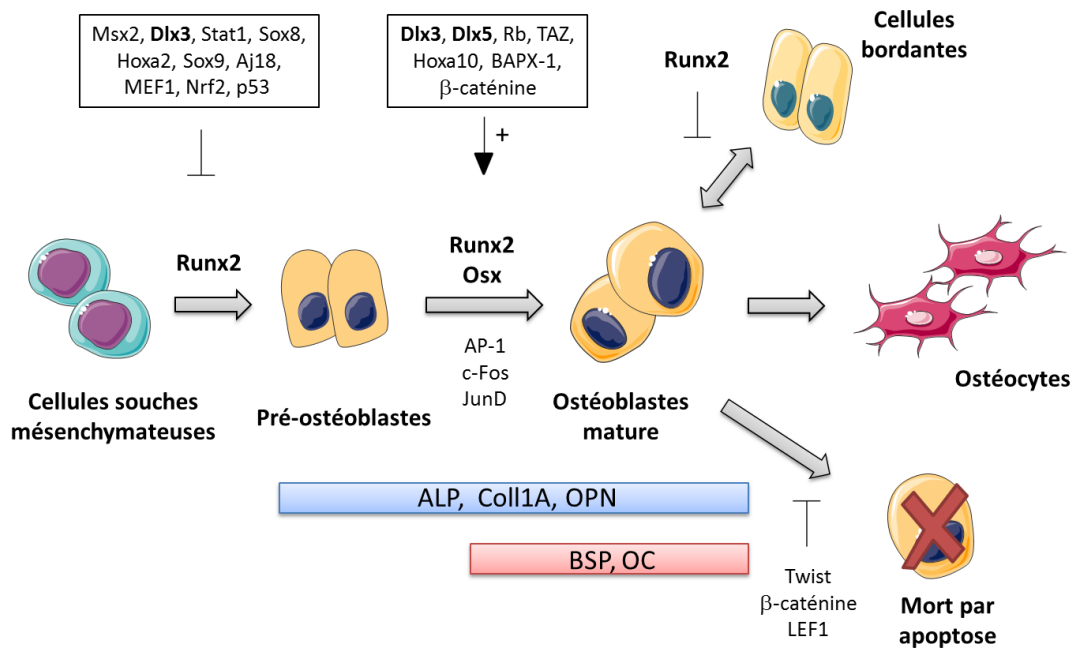
- Myo-D qui engage les CSM dans la différenciation myoblastique,
- PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ 2) qui conduit vers la voie adipocytaire,
- Sox-9 qui contrôle la voie chondroblastique,
- Runx2 (Runt-related transcription factor 2) et Ostérix (OSX/SP7) qui conduisent vers la voie ostéoblastique.



**Figure 3 | Différenciation des cellules souches mésenchymateuses**

Sous l'effet de l'expression de différents facteurs de transcription, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en plusieurs types cellulaires : chondrocytes (Sox9), ostéoblastes (Runx2), adipocytes (PPAR $\gamma$ 2) et myocytes (MyoD). Images issues de la banque d'images ServierMedical Art.

De façon plus précise l'engagement vers la voie de différenciation ostéoblastique, l'ostéoblastogenèse (**Figure 4**), est contrôlée majoritairement par l'expression du facteur de transcription Runx2 (ou Cbfa1/AML3). Ce facteur permet d'initier la différenciation des CSMs vers le stade pré-ostéoblastique via sa fixation sur le promoteur de nombreux gènes (par exemple le Collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine ou encore l'ostéopontine). S'ensuit une expression temporelle d'une large variété de facteurs de transcription comme Ostérix (OSX), le complexe AP-1 (Activating protein-1), et les homéoprotéines Distal-less Homeobox 3 et 5 (*Dlx3* et *Dlx5*) qui participent activement aux contrôles du processus d'ostéoblastogenèse en inhibant ou activant le processus de différenciation (**Figure 4**). L'expression de ces différents facteurs est contrôlée par de nombreuses cytokines, facteurs de croissance et hormones comme les BMPs, les oestrogènes, les androgènes, le fibroblast growth factor (FGF), le TGF- $\beta$ , etc.



**Figure 4 | Ostéoblastogenèse**

Les ostéoblastes sont issus des cellules souches mésenchymateuses. Plusieurs facteurs de transcription sont nécessaires à la différenciation et à la maturation des ostéoblastes. Parmi ces facteurs, les gènes *Dlx3* et *Dlx5* jouent un rôle important dans le contrôle du gène maître Runx2 (D'après P. Marie [13]).

Pour la plupart de ces facteurs de transcription, leur implication a été établie ou confirmée en grande partie par l'utilisation de modèle murin présentant une surexpression ou une absence (délétion) de ces gènes [17].

Par exemple, l'invalidation *in vivo* de Runx2 chez la souris conduit à une absence totale d'ostéoblaste, autrement dit d'ostéoformation. Les maquettes des os sont présentes et de formes normales, mais sont uniquement constituées de cartilage [18].

De la même façon, des souris invalidées pour Ostérix (Osx) présentent un phénotype similaire aux souris Runx2<sup>-/-</sup>, c'est-à-dire une absence d'ostéoblaste et de formation osseuse [19]. Le fait que Runx2 soit exprimé correctement chez ces souris a permis de déterminer que le gène Osx se situe en aval de Runx2 [20]. Il a été démontré qu'Osx favorise le passage du pré-ostéoblaste vers l'ostéoblaste mature et fonctionnel. L'expression d'Osx est stimulée par Runx2.

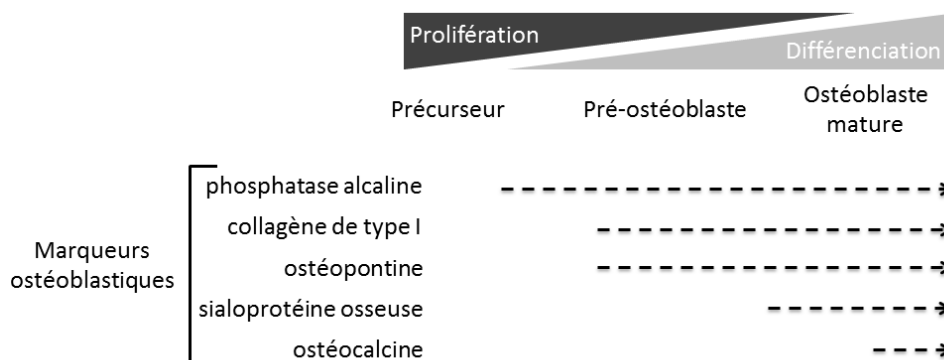
Un autre facteur, *Dlx5*, lorsqu'il est invalidé chez la souris conduit à un retard d'ossification sans toutefois modifier la morphogénèse des os [21]. En effet, *Dlx5* interagirait avec *Msx2* (Msh homeobox 2), conduisant à une levée de l'inhibition du promoteur de l'ostéocalcine par *Msx2* [22]. Concernant *Msx2*, lorsque ce dernier est surexprimé, il accélère l'ossification membranaire et son activation retarde la différenciation ostéoblastique [23].

Par ailleurs, grâce à des expériences *in vivo*, il a aussi été clairement établi que le complexe AP-1, constitué d'homo ou d'hétérodimères de facteurs de transcription de la famille c-Jun/c-Fos, est primordial dans le processus de différenciation des ostéoblastes [24]. En effet, dans un modèle murin présentant une surexpression ubiquitaire de c-Fos, la présence accrue de cette protéine la rend largement disponible pour former AP-1, ce qui conduit à la transformation des ostéoblastes et à l'apparition de tumeurs osseuses (ostéosarcome) dans 100 % des individus [25,26]. À l'inverse, des souris invalidées pour Fos (souris Fos<sup>-/-</sup>) présentent des retards de croissance, des défauts dans le processus de remodelage osseux, une hématopoïèse altérée et une ostéoporose avancée [27].

En résumé, l'ostéoblastogenèse est un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs de transcription s'exprimant de façon temporelle afin de réguler la formation des ostéoblastes.

## b. Marqueurs de la différenciation ostéoblastique

Au cours de sa vie, l'ostéoblaste passe par différents stades de différenciation (**Figure 4**) : pré-ostéoblaste, ostéoblaste mature, cellules bordantes et/ou ostéocytes. Ces différents stades sont définis par rapport aux propriétés morphologiques et aux fonctions de ces cellules, mais également en fonction de l'expression de différents marqueurs spécifiques (**Figure 5**).



**Figure 5 | Principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique**

Ainsi dans ses stades de différenciation précoce, l'ostéoblaste commencera par exprimer le collagène de type I puis l'ostéopontine [28]. Après quoi, dans ses stades plus avancés, les ostéoblastes matures exprimeront la sialoprotéine osseuse ou encore l'ostéocalcine. Il existe néanmoins une grande variabilité dans l'expression de ces marqueurs par les ostéoblastes. En effet, Candelière et *coll.* [29] ont montré que des ostéoblastes histologiquement identiques, mais issus de différentes zones chez le rat expriment des taux variables de ces différents marqueurs. Seule la phosphatase alcaline semble être exprimée de façon ubiquitaire (**Figure 5**). Le rôle de ces différents marqueurs est détaillé ci-dessous :

- La phosphatase alcaline (PAL) ou Alkaline Phosphatase (ALP) est une protéine enzymatique exprimée en surface de la membrane cellulaire. Cette enzyme a pour rôle d'hydrolyser les pyrophosphates inorganiques (ester phosphorique), inhibiteurs de la calcification, pour en libérer du phosphate inorganique qui lui au contraire va favoriser la minéralisation en s'intégrant dans les cristaux d'hydroxyapatite [30,31] ;
- Le collagène de type I est une protéine constituée d'une triple hélice de chaînes polypeptidiques. Il est produit par le réticulum endoplasmique puis est sécrété dans la matrice extracellulaire où il représente 90 % des constituants ;

- La sialoprotéine osseuse (ou Bone sialoprotein (BSP)) et l'ostéopontine (OPN) sont les deux protéines non collagéniques les plus exprimées dans le tissu osseux. Ces protéines possèdent des motifs répétés RGD qui leur permettent de se lier aux intégrines. Ces liaisons permettent ainsi aux cellules osseuses d'adhérer à la matrice extracellulaire afin de la minéraliser. Plus spécifiquement, la BSP est impliquée dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite et est considérée comme un marqueur tardif de l'ostéoblastogenèse [32,33], alors que l'OPN participe plutôt à la modulation de la minéralisation et de la résorption osseuse en liant à la fois le calcium, mais également des protéines acides (par ex. : la fibronectine, le collagène). Concernant son expression, l'OPN est exprimé de façon cyclique en fonction de l'avancement de la différenciation ;
- L'ostéocalcine est une protéine vitamine-K dépendante qui est spécifique du tissu osseux. Elle y est exprimée en grande quantité et représente ainsi entre 10 à 20 % des protéines non-collagéniques de l'os. Elle contient des résidus acides carboxyglutamiques (gla) dont l'état de carboxylation est dépendant de la vitamine K. Cette protéine, exprimée tardivement par l'ostéoblaste mature, semble jouer un rôle clef dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique [6]. De même, cette protéine lorsqu'elle est libérée de la matrice osseuse deviendrait une hormone importante capable d'augmenter la production et la sensibilité à l'insuline, favorisant ainsi l'utilisation du glucose et la dépense d'énergie. Cette découverte a mis en évidence l'existence de liens entre le métabolisme énergétique et le tissu osseux [34].

### c. Les différents stades de différenciation de la cellule ostéoblastique

Les **pré-ostéoblastes**, de morphologie allongée, sont des cellules précurseurs déjà engagées dans la voie ostéoblastique. Elles possèdent la capacité de se diviser, mais ne synthétisent pas de matrice extracellulaire. Toutefois, elles expriment un certain nombre de marqueurs précoces du tissu osseux tels que la phosphatase alcaline ou encore l'ostéonectine [28]. Ces cellules sont généralement situées à proximité des foyers de formation osseuse, c'est-à-dire à proximité des ostéoblastes matures.

Les **ostéoblastes différenciés** ou matures sont des cellules mononucléées de forme cubique et d'une taille d'environ 20 µm qui font suite aux pré-ostéoblastes. La présence de ces cellules dans le tissu osseux est très importante. En effet les ostéoblastes sont chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse au cours de la croissance (modelage), du



renouvellement de la matrice osseuse chez l'adulte (remodelage) et de la réparation osseuse tout au long de la vie [14].

Après plusieurs étapes de différenciation et de prolifération, les ostéoblastes matures sont retrouvés à la surface de l'os sous forme de couche monocellulaire. L'aspect morphologique de ces cellules est typique avec un corps cellulaire polarisé et un noyau situé au pôle basal. Autre particularité morphologique des ostéoblastes, du fait d'une synthèse protéique élevée pour produire la matrice osseuse, le réticulum endoplasmique granuleux (REG), les mitochondries et l'appareil de Golgi de ces cellules sont très développés. Par ailleurs, le cytoplasme renferme de nombreuses vésicules de calcium qui permettront la minéralisation de la matrice osseuse préalablement synthétisée par ces mêmes cellules (chez l'homme, l'étape de minéralisation débute environ 10 à 20 jours après le dépôt de la matrice).

Outre, la production des protéines osseuses spécifiques (matrice ostéoïde, ALP, BSP, OPN, OC, collagène de type 1 (Coll1A),...), les ostéoblastes sécrètent de nombreuses molécules relarguées dans la matrice telles que des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , FGFs, BMPs), des molécules régulatrices (RANKL, OPG, cytokines (IL-6, IL-11, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )) ou encore des métalloprotéases matricielles (MMPs). L'ensemble de ces facteurs concourt à réguler finement le processus de remodelage osseux. En plus de ces facteurs sécrétés par l'ostéoblaste, la régulation de la formation osseuse fait aussi intervenir d'autres molécules non sécrétées par les ostéoblastes comme les hormones sexuelles ou encore l'hormone parathyroïdienne (PTH).

À l'issue de la période de formation, environ 65 % des ostéoblastes meurent par apoptose, la fraction restante peut se transformer en cellules bordantes ou en ostéocytes (**Figure 4**)[35].

Les **cellules bordantes** sont des ostéoblastes quiescents, qui à l'issue de leur période de formation osseuse restent à la surface de l'os en réduisant leurs activités de synthèse protéique [36]. D'un point de vue morphologique, il s'agit de cellules aplaties possédant un cytoplasme pauvre en organites, en particulier en mitochondries et REGs, due à la diminution des fonctions de synthèse. Leur principal rôle est d'assurer la communication entre la surface osseuse, l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Ces cellules pourront néanmoins être réactivées, au besoin, pour redevenir des ostéoblastes actifs [37]. En-

fin, ces cellules joueraient un rôle dans l'initiation du remodelage osseux en libérant la surface osseuse sous l'effet de certains stimuli, laissant ainsi la place aux ostéoclastes [38].

Les **ostéocytes** proviennent de la différenciation terminale d'une partie des ostéoblastes matures ne mourant pas par apoptose (10 à 20 % des ostéoblastes deviennent des ostéocytes). Après la minéralisation de la matrice osseuse, les ostéocytes se retrouvent emmurés, dans la matrice, au sein de lacunes périostéocytaires nommées ostéoplastes (**Figure 6**). Au cours de la transformation des ostéoblastes en ostéocytes, les ostéoblastes matures perdent progressivement une grande partie de leur marqueur (ALP, Coll1A, BSP,...) ainsi que de leurs organites (REG, mitochondrie, etc.) [28,39]. De même, le volume du cytoplasme décroît d'environ 70 % tout en conservant de longs prolongements cytoplasmiques, conférant à l'ostéocyte une forme étoilée.



**Figure 6 | Ostéocyte emmuré dans sa lacune**

Observation au microscope électronique à transmission d'un ostéocyte emmuré dans un ostéoplaste.

Image de Carter Rowley, Micron BioSystems, Denver, CO 80222

<http://medpics.ucsd.edu/index.cfm?curpage=image&course=hist&mode=browse&lesson=31&img=558>

Par ailleurs, les ostéocytes jouent un rôle essentiel dans la transmission des signaux mécano-sensoriels, et dans les échanges entre les cellules et le micro-environnement au cours du processus de remodelage osseux [40]. En effet, les ostéocytes interagissent avec les fibres de collagène tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrines. Ils fonctionnent ainsi comme des mécano-récepteurs capables de percevoir les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os, permettant à ce dernier de s'adapter via l'intermédiaire du remodelage osseux. Les informations étant transmises par des jonctions communicantes établies entre les ostéocytes, les ostéoblastes et les cellules bordantes [41]. Le rôle des ostéocytes dans le remodelage osseux est renforcé par la sécrétion d'un marqueur spécifique de cette cellule, la sclérostine. Cette molécule, inhibiteur de la voie Wnt, contrôle et régule négativement

l'activité des ostéoblastes [42]. De la même façon, les ostéocytes sont la source majeure de RANKL, molécule indispensable à l'ostéoclastogenèse [43]. Enfin l'apoptose des ostéocytes pourrait être un facteur déclenchant de l'ancrage des ostéoclastes à la surface osseuse [44].

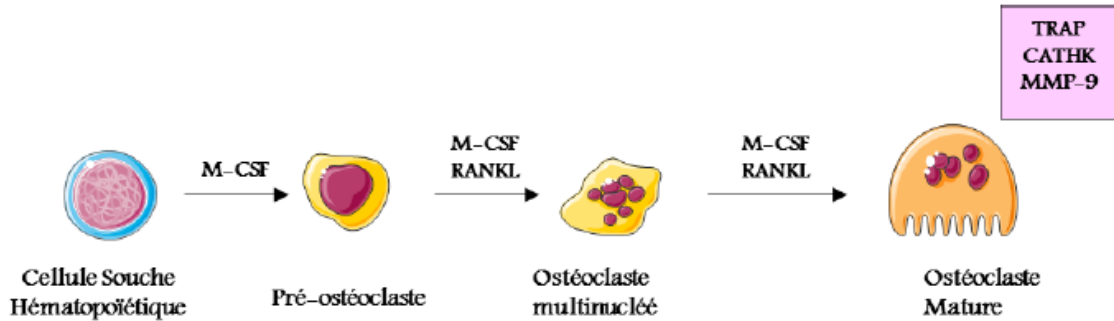
En résumé, les cellules de la lignée ostéoblastique ont deux fonctions majeures qui consistent d'une part en la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse, et d'autre part en l'activation des précurseurs ostéoclastiques.

#### 1.2.2.2. L'ostéoclaste

##### a. Genèse de l'ostéoclaste (ou ostéoclastogenèse)

À la différence des ostéoblastes qui dérivent des cellules souches mésenchymateuses, les ostéoclastes dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) par un processus nommé ostéoclastogenèse (**Figure 7**) [45,46]. Les CSH, dans un premier temps, donnent naissance à des cellules circulantes mononucléées appelées CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage). Ces cellules circulantes sont maintenues en prolifération et en survie par la présence de M-CSF (macrophage monocyte-colony stimulating factor) qui se lie sur son récepteur c-fms. Cela permet de conserver un pool de précurseurs mononucléés pouvant se différencier en ostéoclastes. Ces précurseurs, qui n'expriment aucun marqueur spécifique de l'ostéoclaste, vont être attirés par chimiotactisme vers les sites de résorption. À leur arrivée, ces précurseurs se fixent à la matrice osseuse et commencent à se différencier en ostéoclastes sous l'action de facteurs synthétisés et sécrétés par les cellules stromales ou par les ostéoblastes, mais également par contacts directs entre ces différents types cellulaires. Les ostéoclastes se mettent alors à exprimer des marqueurs spécifiques : la phosphatase acide tartare résistante (ou TRAP) et le récepteur à la calcitonine. Parmi les facteurs stimulant la différenciation des ostéoclastes, le M-CSF et RANKL sont indispensables pour induire les ostéoclastes [47,48]. En effet, RANKL est le ligand du récepteur RANK exprimé à la surface des précurseurs ostéoclastiques. Sa fixation permet la poursuite du processus d'ostéoclastogenèse en induisant de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription (PU-1, c-Fos, nuclear factor of activated T-cells 1 (Nfatc1)...). Enfin, toujours sous l'influence de M-CSF et de RANKL, ces précurseurs ostéoclastiques fusionnent pour former des ostéoclastes multinucléés. De même, l'activation de ces cellules est due à RANKL qui va stimuler la formation d'une bordure en brosse rendant l'ostéoclaste mature et polarisé. Ce dernier se retrouve alors dans une lacune de résorption appelée lacune de Howship. Afin de réguler la différenciation ostéoclastique, un récepteur leurre

de RANKL est également sécrété par les ostéoblastes : l'ostéoprotégérine (OPG). Cette protéine agit ainsi comme un facteur anti-résorptif en prévenant la formation, la maturation et l'activation des ostéoclastes.

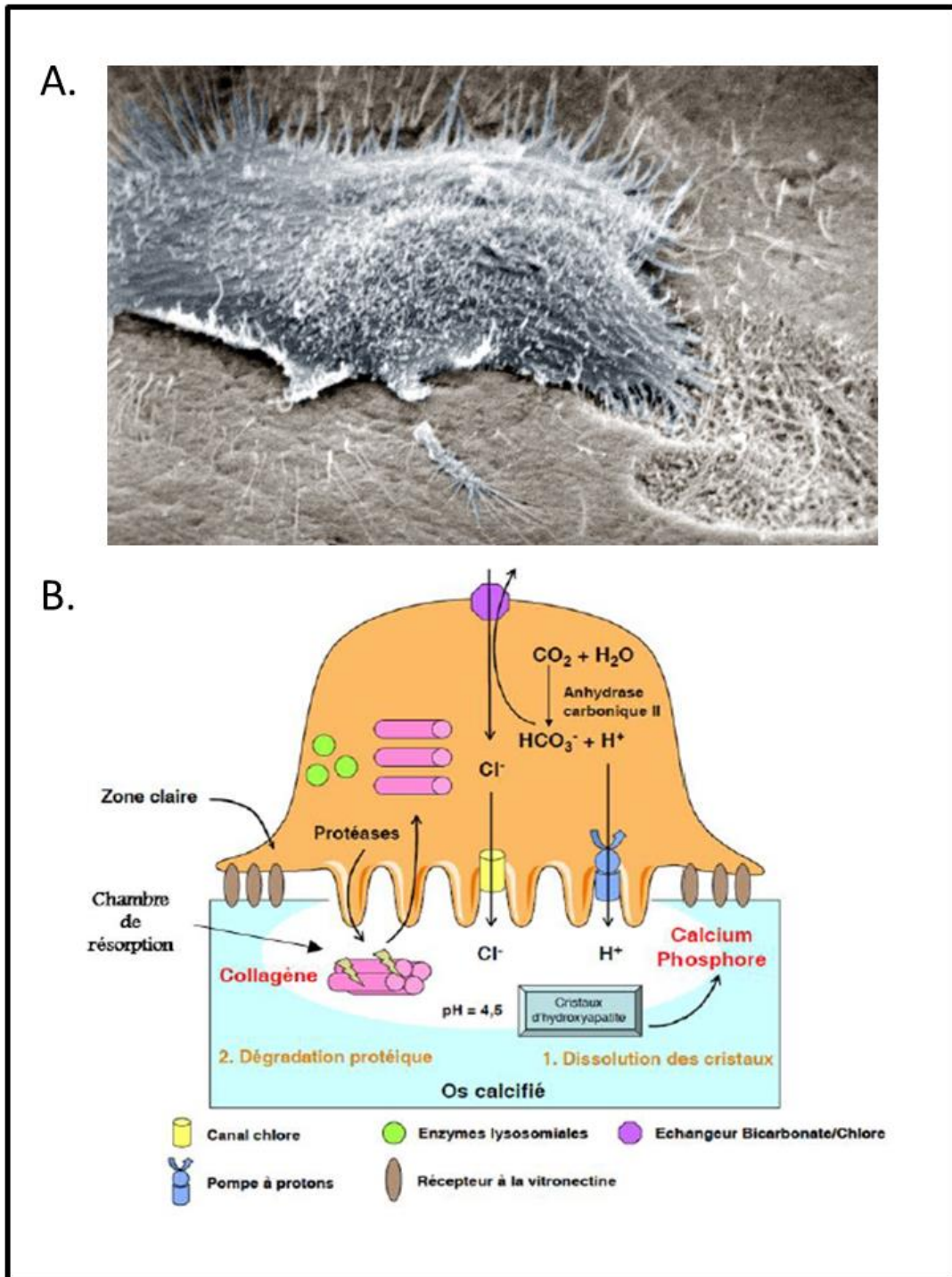


**Figure 7 | Ostéoclastogénèse**

Sous l'effet du M-CSF et de RANKL, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en ostéoclastes multinucléés. Images issues de la banque d'images ServierMedical Art.

#### b. Fonction de l'ostéoclaste

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes multinucléées pouvant atteindre une taille de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, et renfermant de 2 à 30 noyaux. Ces cellules sont chargées de la résorption de l'os et possèdent une bordure en brosse caractéristique (**Figure 8**) [49]. Ainsi compte-tenu de cette activité, les ostéoclastes possèdent de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi très développé ainsi que de nombreuses vésicules lysosomales riches en enzymes. Parmi ces enzymes, la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP), la cathepsine K, ou les collagénases (MMP2, MMP9) nécessaires à son activité de dégradation sont les plus retrouvés chez les ostéoclastes [4,50]. Par ailleurs, les nombreuses mitochondries présentes dans ces cellules permettront de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes à protons chargées d'acidifier le milieu cellulaire durant la phase de résorption.

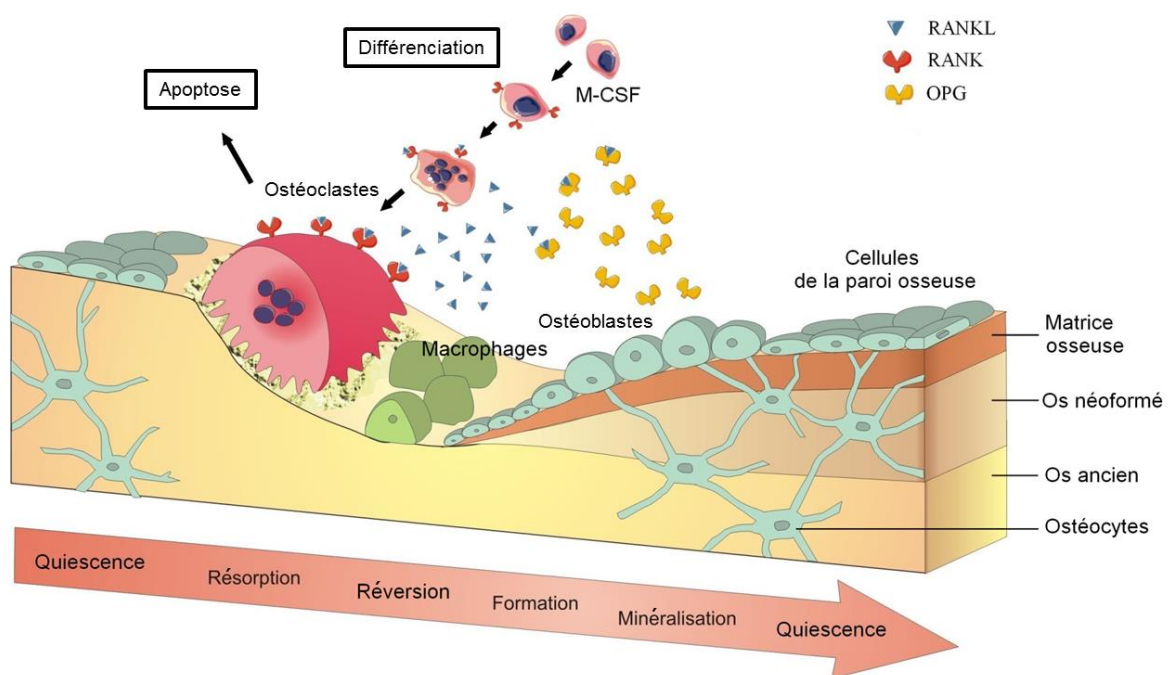


**Figure 8 | L'ostéoclaste**

(A) Observation au microscope électronique à transmission d'un ostéoclaste résorbant la matrice osseuse. Image coloré de Tim Arnett, University College of London. <http://boneresearchsociety.org/resources/gallery/20/>  
 (B) Schéma représentatif d'un ostéoclaste actif. D'après Rousselle et Heymann [49].

## 2. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est dans un état de renouvellement perpétuel, de l'ordre de 10 % par an, grâce au remodelage osseux qui est une alternance finement orchestrée entre résorption et formation osseuse. Ce processus long (4 à 6 mois) et complexe permet à ce tissu de s'adapter aux contraintes mécaniques, d'assurer la cicatrisation des fractures [51] et de maintenir l'homéostasie minérale [52]. Ce remodelage se déroule selon une séquence précise d'événements, résultant de l'activité de certaines cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes majoritairement), qui s'organise en quatre étapes : la phase d'initiation, la phase de remodelage, la phase de réversion et enfin la phase de formation/minéralisation (**Figure 9**) [53].



**Figure 9 | Les différentes étapes du remodelage osseux**

Adapté de Biomedical Tissue Research, University of York,  
<http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/boneremodelling.html>.

## 2.1. Les étapes du remodelage osseux

**La phase d'initiation ou d'activation** : cette séquence débute en un point de la surface osseuse quiescente recouverte par des cellules bordantes. C'est la perception d'un signal mécanique (fracture, prise de poids, etc.), hormonal (ménopause, etc.) ou nerveux, par ces cellules qui induiraient le processus de remodelage [51,52,54]. La perception de ce signal associé à la présence de facteur pro-résorptifs (PTH, prostaglandine E2 (PGE2), vitamine D3) conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située entre l'os et les cellules bordantes, ainsi qu'à la rétraction de ces cellules. De cette façon, la matrice minéralisée se retrouve exposée, ce qui permet l'adhésion de précurseurs ostéoclastiques et d'ostéoclastes.

**La phase de résorption** : cette phase, qui dure environ 30 jours, débute par le recrutement de précurseurs ostéoclastiques mononucléés (monocytes), qui vont se différencier et s'activer sous l'influence de facteurs libérés par les ostéoblastes. Parmi ces facteurs, le M-CSF permet le recrutement des précurseurs alors que l'interaction de RANK ligand avec son récepteur RANK, exprimé à la surface des précurseurs ostéoclastiques, permet la différenciation et l'activation de ces derniers. Après quoi, dès son adhésion à la matrice osseuse, l'ostéoclaste mature commence la résorption (ou dégradation) de la matrice osseuse en formant une chambre de résorption via des interactions moléculaires avec la matrice. Concrètement, cette phase débute par la formation de podosomes entre la matrice osseuse et l'ostéoclaste, via des interactions entre des intégrines de la membrane ostéoclastiques et des protéines de la matrice osseuse, pour former une poche hermétique entre la cellule et la matrice. Cette poche hermétique est appelée bordure en brosse (**Figure 8**). S'ensuit un relargage massif d'ions H<sup>+</sup>, grâce aux pompes à protons, qui permet d'acidifier le milieu afin de dissoudre la matrice minérale. Cette phase est alors suivie d'un relargage d'enzymes lysosomiales qui nécessite un potentiel hydrogène (pH) acide pour fonctionner. Ces enzymes vont alors terminer la digestion de la matrice osseuse en dégradant la matière organique, en particulier le collagène.

**La phase de réversion** : elle suit la phase de résorption et correspond à la phase de transition permettant le couplage entre résorption et formation osseuse. Au cours de la phase de résorption, la dégradation de la matrice osseuse entraîne une augmentation de la concentration en calcium dans l'environnement. Cette augmentation, associée à une profondeur importante de la lacune de résorption, conduirait à la déstabilisation des podosomes [55]. En conséquence la chambre de résorption est rompue, obligeant l'ostéoclaste à se détacher de la matrice osseuse. Ainsi, les ostéoclastes qui se détachent peuvent migrer vers un autre foyer de résorp-

tion ou mourir par un processus d'apoptose, vraisemblablement médié par la voie Fas/Fas ligand [56]. De cette façon, les ostéoclastes laissent leur place à des cellules de types monocytes-macrophages chargés d'éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de lacune. En parallèle, les ostéoblastes commencent leurs processus de différenciation qui s'accompagne de la sécrétion de facteurs anti-résorptif tel que l'OPG.

Par ailleurs, certains facteurs intégrés à la matrice osseuse sont libérés par les ostéoclastes au cours des phases de résorption [57]. Ces facteurs, comme les insulin growth factor (IGFs), le TGF- $\beta$ , les BMPs, ou encore le platelet-derived growth factor (PDGF), stimulent la formation osseuse en recrutant et activant les ostéoblastes. De même, les ostéoclastes semblent pouvoir recruter de façon directe des pré-ostéoblastes via l'expression de S1P (sphingosine 1 phosphate) et de BMP6. Ils pourraient également stimuler la formation osseuse par l'activation de la voie Wnt/BMP [58].

**La phase de formation** : elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship. Après quoi les ostéoblastes se différencient et sécrètent les constituants nécessaires à la formation et à la minéralisation de la nouvelle matrice osseuse. Après 10 à 15 jours, le tissu osseux se minéralise par apposition de cristaux d'hydroxyapatite entre les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation se décompose en deux temps : une phase rapide appelée minéralisation primaire, puis une phase plus lente de durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de cette dernière phase est liée à la fréquence de remodelage et peut ainsi se dérouler sur une période de 4 à 5 mois.

Au cours de ce processus de minéralisation, les besoins en minéraux (calcium et phosphore) sont très élevés. Ces derniers vont parvenir aux sites de nucléation présents dans les fibres de collagène soit par diffusion passive à partir du milieu extracellulaire, soit par du transfert actif à l'aide de pompes à calcium présentes dans la membrane des ostéoblastes. Le phosphate est transporté de façon similaire, mais son transport actif par l'ostéoblaste sera assuré par un système de transport dépendant du sodium. De même, un second système existe dans l'ostéoblaste, impliquant la phosphatase alcaline qui sera capable de fournir du phosphate inorganique en hydrolysant des pyrophosphates inorganiques. L'importance de la phosphatase alcaline dans la minéralisation a été prouvée par son invalidation chez la souris. En effet, ces dernières présentent une anomalie de la minéralisation [31]. Par ailleurs, de nombreuses protéines



osseuses (BSP, OPN, etc.) possèdent des domaines de liaison au calcium. Ces protéines pourront également favoriser la minéralisation osseuse.

Une fois les phases de formation et de minéralisation achevées, les ostéoblastes peuvent soit mourir par apoptose, soit s'intégrer à la matrice osseuse sous forme d'ostéocytes ou rester quiescents à la surface en devenant des cellules bordantes. Après une période de quiescences plus ou moins variable, le cycle de remodelage reprend.

## 2.2. La régulation du remodelage osseux

Le processus de remodelage osseux est étroitement régulé par l'action de nombreux facteurs locaux et systémiques (cytokines, hormones, facteurs de croissance, etc.) [59], ce afin d'orchestrer l'intervention des différents partenaires cellulaires au sein de la lacune de résorption. Ces facteurs vont contrôler la prolifération, la différenciation ou l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ainsi, la moindre perturbation du remodelage osseux conduit à des situations pathologiques (ostéoporose, ostéopétrose, etc.).

Au cours de la dernière décennie, la découverte de l'OPG et l'identification consécutive de son ligand RANKL et de RANK ont révolutionné les connaissances des mécanismes moléculaires à la base de la régulation du remodelage osseux [60]. Bien qu'encore mal connue, au vu de la découverte récente d'un nouveau récepteur pour RANKL [61], la triade RANK/RANKL/OPG est considérée comme la voie majeure de contrôle du processus de remodelage osseux. La présentation de cette voie de signalisation et de ces différents acteurs fera l'objet d'un chapitre particulier dans ce manuscrit au vu de l'importance qu'elle revêt dans mes travaux de thèse.

## II- Les tumeurs osseuses primitives : des tumeurs rares

### 1. Les tumeurs osseuses primitives

Comme énoncé précédemment, les tumeurs osseuses primitives représentent moins de 1% des cancers. Elles peuvent être divisées en deux catégories : les tumeurs bénignes (tumeurs à cellules géantes, ostéomes, chondromes, etc.) et les tumeurs malignes (ostéosarcomes, tumeurs d'Ewing, chondrosarcomes, fibrosarcomes, etc.). Ces tumeurs, qu'elles soient bénignes ou malignes, sont généralement classées en fonction de la nature du tissu qu'elles produisent (**Tableau 2**)[62]. De plus, ces dernières sont souvent ostéocondensantes ou ostéolytiques, voire dans certains cas hétérogènes comme pour l'ostéosarcome [63,64].

	Production de matrice osseuse	Production de matrice conjonctive indifférenciée	Production de matrice cartilagineuse	Autres types de tumeurs
Tumeurs bénignes	Ostéome Ostéoblastome Ostéoïde	Fibrome non-ossifiant	Chondrome Ostéochondrome	Tumeur à cellules géantes
Tumeurs malignes	<u>Ostéosarcome</u>	Fibrosarcome	Chondrosarcome	Sarcome d'Ewing Myélome multiple Lymphosarcome osseux

**Tableau 2 | Les tumeurs osseuses primitives**

A l'exception de quelques tumeurs (autres types de tumeurs) néanmoins dérivées de cellules de la moelle osseuse, les tumeurs osseuses sont en grande partie classées en fonction de la nature de la matrice qu'elles produisent.

En Europe, l'incidence annuelle des tumeurs osseuses primitives est estimée à environ 20 cas par an et par million d'habitants [65]. Les tumeurs bénignes sont les plus fréquentes et peuvent être observées à tout âge alors que les tumeurs malignes sont très rares et touchent une population plutôt jeune (environ 300 cas par an en France pour les tumeurs malignes). Toutefois, un second pic d'incidence intervient autour de 60 ans pour des tumeurs osseuses primitives malignes qui peuvent survenir suite à une pathologie du remodelage osseux, telle que la maladie de Paget. Ainsi, les formes malignes les plus fréquentes sont représentées par les ostéosarcomes et les tumeurs d'Ewing qui constituent environ 90% de ces tumeurs [63].

Dans notre étude, les investigations se sont portées uniquement sur l'ostéosarcome pour des raisons de commodité. En effet, le choix de cette maladie comme modèle d'étude des tumeurs osseuses a été encouragé par sa prévalence, sa grande hétérogénéité, mais surtout par la disponibilité de modèles syngéniques chez la souris.

## 2. L'ostéosarcome

### 2.1. Définition, origine et épidémiologie

L'ostéosarcome est une maladie rare référencée par Orphanet [66] et définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales » [62]. Cependant, cette tumeur est souvent associée à des plages d'ostéolyse péri-tumorales.

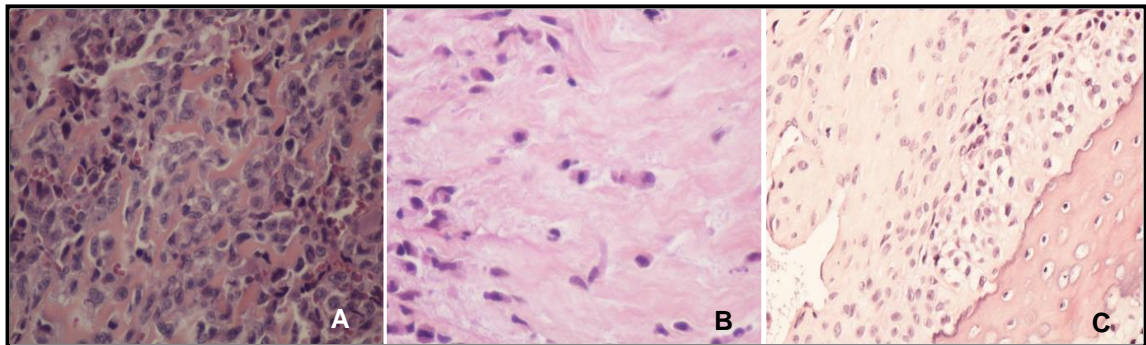
Cette pathologie dérive principalement du mésoderme et est issue des cellules souches mésenchymateuses [67]. L'ostéosarcome résulterait ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des CSM. De ce fait, selon le stade de différenciation de la cellule souche affectée par la transformation tumorale, les cellules ostéosarcomateuses seront plus ou moins différenciées et agressives. De manière plus générale, une corrélation inverse semble exister entre agressivité et différenciation de ces tumeurs [68].

En fait, le terme « ostéosarcome » désigne le nom générique d'une famille de tumeurs présentant une grande variété de lésions distinctes par leur présentation clinique et radiographique, leur aspect microscopique et leur évolution. Ces nombreux profils conduisent à définir l'ostéosarcome comme une tumeur très hétérogène. Pour illustrer cette hétérogénéité, l'OMS définit 3 sous-types d'ostéosarcomes conventionnels (**Figure 10**) bien qu'il en existe de nombreuses formes bien plus rares et variées [69,70] (**Tableau 3**) :

- L'ostéosarcome ostéoblastique : formé de cellules tumorales de type ostéoblastique produisant une matrice ostéoïde, il est le plus fréquent des ostéosarcomes ;
- L'ostéosarcome fibroblastique : formé de cellules indifférenciées de morphologie fibroblastique ;
- L'ostéosarcome chondroblastique : il est formé par des amas de cellules peu différenciées produisant une matrice cartilagineuse.

D'un point de vue épidémiologique, l'ostéosarcome représente la moitié des cas de tumeurs osseuses primitives malignes diagnostiquées, et son incidence annuelle est évaluée à environ 7,4 cas par million d'enfants de moins de 15 ans [65]. En France, les dernières données épidémiologiques ne sont pas encore rendues, néanmoins le réseau ResOS qui prend en charge les sarcomes osseux estimait la prévalence de l'ostéosarcome à environ 125 cas en 2012.

L'ostéosarcome touche en majorité des enfants ou jeunes adultes avec un pic d'incidence vers 18 ans (75% des ostéosarcomes diagnostiqués le sont entre 8 et 25 ans), et avec une proportion plus élevée chez les garçons (sex-ratio : 1,4 :1). Il est rare avant 10 ans, et exceptionnel avant 5 ans. De même, il peut survenir chez l'adulte, avec un pic d'incidence à 60 ans, mais il sera dans la majorité des cas consécutif à une autre maladie (maladie de Paget, tumeurs à cellules géantes, etc.) ou à une radiothérapie [71,72].



**Figure 10 | Préparation histologique d'ostéosarcomes colorés à l'hématoxyline**

Aspect typique d'un ostéosarcome ostéogénique (grossissement x 40) (A), d'un ostéosarcome fibroblastique (grossissement x 20) (B), et d'un ostéosarcome chondroblastique (grossissement x 20) (C) (Dr MF Heymann, CHU de Nantes, INSERM UMR957).

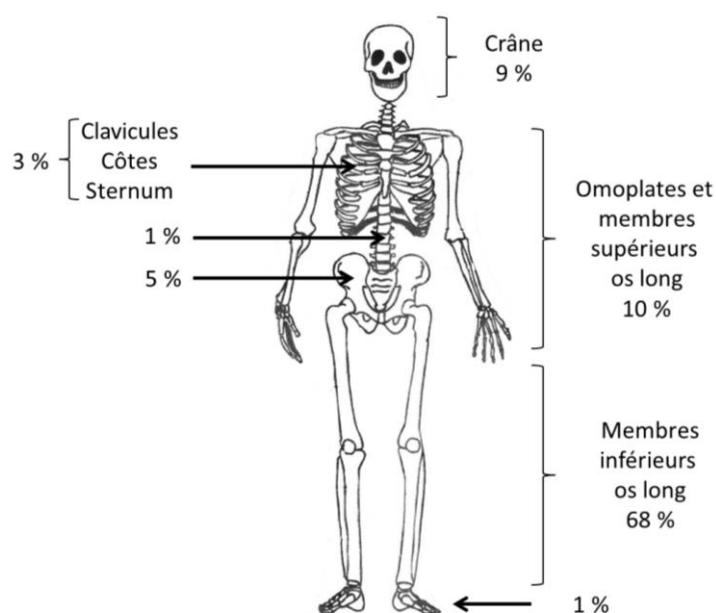
Ostéosarcomes	centraux		juxtacorticaux	intracorticaux
	conventionnels	non conventionnels		
sous-types	ostéoblastique	télangiectasique	périosté	cas isolés
	chondroblastique	à petites cellules rondes	parostéal	
	gibroblastique	à cellules géantes	conventionnel de haut grade	
		bien différencié		
pronostic	?	très mauvais en général	bon	?
occurrence	les plus fréquents	2 à 10 %	?	rares

**Tableau 3 | Principaux types d'Ostéosarcomes**

Liste non exhaustive des principaux types d'ostéosarcomes définis selon leur localisation et leur forme microscopique.

## 2.2. Localisation de l'ostéosarcome

Les sites d'apparition de cette tumeur se situent généralement à l'extrémité des os longs (**Figure 11**), au niveau des métaphyses, qui correspondent aux zones de croissance des os. En effet, les localisations diaphysaires représentent moins de 10 % des cas, et les localisations épiphysaires sont encore plus rares. Ainsi, il touche en grande partie les extrémités des os longs des membres inférieurs (68%) et des membres supérieurs (10%). Les os plats, courts, et du crâne sont beaucoup moins touchés, respectivement 3%, 1 % et 9 %.



**Figure 11 | Fréquence de localisation des ostéosarcomes**

L'ostéosarcome se développe préférentiellement sur les os en croissance, en particulier au niveau des régions métaphysaires des os longs.

Toutefois, des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les os sésamoïdes<sup>1</sup> [70]. En fonction de leur localisation au sein du tissu osseux, les ostéosarcomes peuvent être classés en différents groupes (**Tableau 3**) :

- les ostéosarcomes de surface (juxtacorticaux)
- les ostéosarcomes intracorticaux, extrêmement rares, seules des observations isolées sont rapportées,

---

<sup>1</sup> : Petits os situés près des tendons ou des articulations

- les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux, les plus fréquents, ils regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité.

Enfin, l'ostéosarcome est capable de métastaser avec comme site préférentiel les poumons. Néanmoins, des cas de métastases osseuses et hépatiques ont déjà été mis en évidence dans cette pathologie.

### 2.3. Étiologie

Bien que l'origine cellulaire des ostéosarcomes semble connue, il existe néanmoins très peu de connaissances sur les causes et les facteurs induisant le développement des ostéosarcomes. Plusieurs hypothèses sur les causes et les facteurs de prédispositions ont été émises à partir d'observations expérimentales ou cliniques : d'une part les hypothèses reposant sur la relation entre la croissance et l'ostéosarcome, d'autre part celles portant sur le développement de l'ostéosarcome suite à une précédente pathologie et enfin celles sur les anomalies cytogénétiques ou épigénétiques.

#### 2.3.1. Croissance et ostéosarcome

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation préférentielle de ces tumeurs, ainsi qu'une incidence élevée de l'ostéosarcome chez les individus de grande taille suggèrent une forte corrélation entre croissance osseuse et ostéosarcome [70].

#### 2.3.2. Pathologie prédisposant au développement des ostéosarcomes

Des prédispositions au développement des ostéosarcomes semblent exister chez des patients atteints de syndromes impactant le remodelage osseux, ou ayant subi une radiothérapie. Parmi ces pathologies, beaucoup sont à tendance pédiatrique ou congénitale telle que le rétinoblastome [73], les tumeurs à cellules géantes [74,75], la dysplasie fibreuse des os [76] et les syndromes de Li-Fraumeni [77] ou de Rothmund-Thomson [78] (**Tableau 4**). Chez les adultes, la maladie de Paget est également associée à un risque accru de développer un ostéosarcome [79]. Par ailleurs, aucune prédisposition génétique familiale n'a été mise en évidence à ce jour.

	Causes	Conséquences	Références
Syndrome de Li-Fraumeni	mutation d'un des allèles du gène TP53	développement de nombreuses tumeurs	(Varley, Evans, et Birch 1997)
Syndrome de Rothmund-Thomson	mutation du gène RECQL4	troubles cutanés, anomalies osseuses	(Leonard et al., 1996)
Dysplasie fibreuse	mutation du gène GNAS 1	ostéogenèse immature	(Ruggieri et al., 1994)
Tumeurs à cellules géantes	inconnue	tumeur bénigne	-
Rétinoblastome	mutation du gène RB1	tumeur maligne de la rétine, ostéosarcome dans 50 % des cas	(Chauveinc et al. 2001)
Maladie de Paget	inconnue	dérèglement du remodelage osseux	(Hansen et al, 2006)

**Tableau 4 | Pathologies prédisposant au développement d'un ostéosarcome**  
 Liste non exhaustive des pathologies pouvant favoriser le développement d'un ostéosarcome.

### 2.3.3. Ostéosarcomes et anomalies cellulaires

Actuellement aucune anomalie moléculaire (génétique) spécifique n'est associée au diagnostic de l'ostéosarcome contrairement à d'autres cancers comme le sarcome d'Ewing, qui correspond à une recombinaison chromosomique [80].

En effet, l'analyse des caryotypes de ces tumeurs révèle une grande complexité et hétérogénéité dans les altérations génétiques pouvant toucher l'ostéosarcome, comme des duplications ou des réarrangements chromosomiques. Cependant, bien qu'aucun profil type n'ait pu être établi, des altérations récurrentes touchent des gènes impliqués notamment dans le contrôle du cycle cellulaire (phase G1-S en particulier)[81].

Parmi ces altérations, les plus courantes touchent les loci des gènes TP53 (50% des cas) et RB1 (70% des cas)[82,83]. D'autres gènes sont également touchés dans une moindre mesure, c'est le cas des gènes MDM2 (Murine Double Minute 2) et CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4) qui sont amplifiés, et qui accélèrent ainsi la transition G1-S. Enfin, un certain nombre de « proto-oncogènes » peuvent être surexprimés comme les gènes c-Myc (85% des ostéosarcomes), AP-1 (70%) et c-Kit (80%) [84,85]. L'ensemble de ces dégénéralions conduit à des modifications des capacités prolifératives et de différenciation des cellules tumorales. De façon générale, la présence de ces différentes altérations, comme celle de TP53 [86], est corrélée avec l'agressivité des tumeurs et la survie des patients.

En plus des altérations chromosomiques et cytogénétiques, de nombreuses modifications épigénétiques ont été observées dans l'ostéosarcome [82,87]. Ces modifications sont principalement des hyper- ou hypo-méthylations des promoteurs de gènes impliqués dans des processus tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation ou le cycle cellulaire.

Pour résumer, l'ostéosarcome ne résulte pas d'une anomalie génétique particulière, mais est la conséquence d'une multitude de facteurs qui restent encore à préciser.

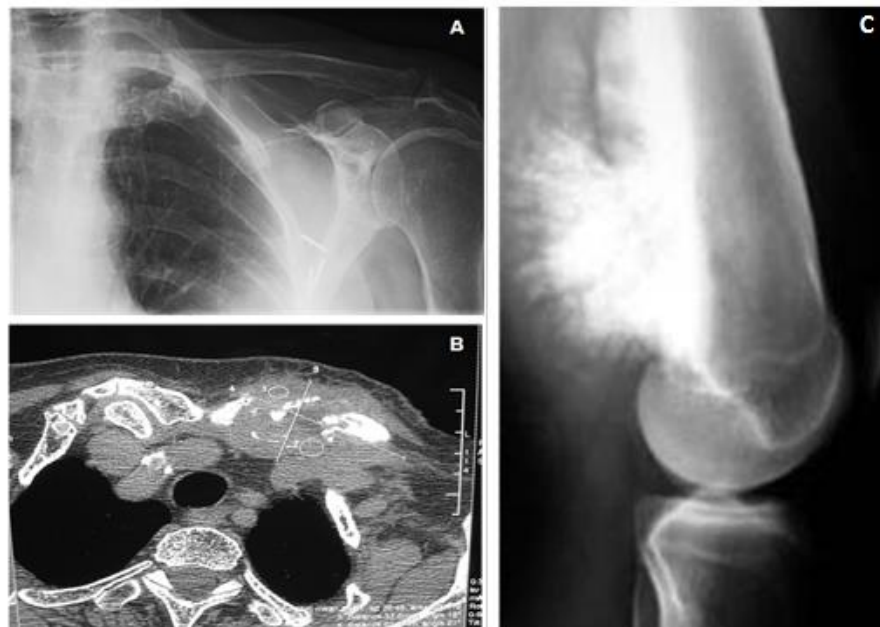
## 2.4. Manifestation et diagnostic clinique

Le diagnostic de ces tumeurs est relativement difficile puisqu'il s'agit de tumeurs en profondeur dont le principal signe d'appel clinique sera la douleur d'intensité et de fréquence variable (au niveau du site tumoral et des articulations voisines). L'intensification de la douleur amènera le patient à consulter, mais cette douleur sera souvent attribuée (à tort) par le patient



(ou le médecin) à un traumatisme mineur. Néanmoins, la perception d'une masse sensible à la palpation ou d'une gêne dans le mouvement permet de favoriser le diagnostic. Par ailleurs, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles à un stade avancé de la maladie. Le délai entre l'apparition des premiers symptômes et la consultation médicale est en moyenne de 6 semaines, celle-ci ne permet d'établir le diagnostic que dans un tiers (1/3) des cas [88].

En effet, le véritable diagnostic repose essentiellement sur les techniques d'imagerie (radiographie, Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), scintigraphie) qui permettent de mettre en évidence la présence de liaisons tumorales et de les identifier (**Figure 12**). À ce niveau la radiographie conventionnelle offre la possibilité de révéler les liaisons ostéocondensantes ou ostéolytiques et permet d'évaluer leurs gravités. Sur ces clichés, l'ostéosarcome présente généralement un aspect typique dit en feu d'herbe (**Figure 12**). Après quoi, la réalisation d'une scintigraphie osseuse au technétium 99 permet de rechercher la présence de lésions multiples notamment pour écarter le risque de métastases. Enfin, l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomodensitométrie (TDM) permet de déterminer la nature « précise » de la tumeur, son extension locale au niveau des différents tissus, et la présence de métastases pulmonaires ou osseuses. À noter qu'au moment du diagnostic, 15 à 20 % des patients présentent un développement métastatique détectable par imagerie [89,90].



**Figure 12 | L'ostéosarcome en imagerie médicale**

Radiologie conventionnelle peu informative (A) et coupe transversale d'une IRM (B) d'un ostéosarcome radique claviculaire. Aspect typique en feu d'herbe d'un ostéosarcome du genou (C).

Néanmoins, le tableau clinique et les données d'imagerie ne sont pas suffisants pour identifier le phénotype de la tumeur. C'est pourquoi la réalisation d'un examen histologique, après biopsie, est indispensable pour identifier le phénotype de ces tumeurs (nature et grade).

D'autres marqueurs, notamment sériques, pourront être utilisés pour confirmer ou préciser le diagnostic. Par exemple, le taux de phosphatase alcaline sérique est augmenté en raison de l'activité ostéoblastique de la tumeur. Ce marqueur n'est cependant pas toujours corrélé au taux mesuré dans celle-ci. Néanmoins, après exérèse, le taux de PAL doit chuter pour revenir à la normale, dans le cas contraire sa persistance traduira une excision incomplète ou la présence de métastases.

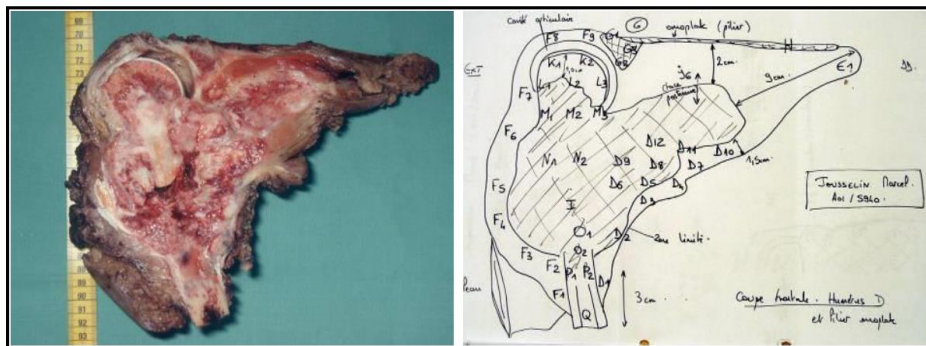
## 2.5. Prise en charge de l'ostéosarcome

La prise en charge thérapeutique des ostéosarcomes a énormément évolué au cours des dernières décennies. En effet jusqu'aux années 70, le traitement des ostéosarcomes était purement local et consistait en une amputation chirurgicale du membre touché [91]. Ce traitement de la tumeur primitive, bien que radical, avait pour effet d'augmenter la survenue de métastases chez les patients dans 80 % des cas. L'apparition de ces métastases, quelques semaines ou mois après l'amputation, conduisait à une forte mortalité. Ainsi, la survie à 5 ans était seulement de 12 % et trois patients sur quatre décédaient dans les deux ans.

Au cours des dernières décennies, les progrès des techniques de chirurgie conservatrice ainsi que le développement de chimiothérapie néo-adjuvante a permis d'améliorer efficacement la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome.

A l'heure actuelle, la prise en charge de l'ostéosarcome est multidisciplinaire et s'effectue généralement en trois étapes. La première consiste en une chimiothérapie néo-adjuvante d'une durée de trois mois. Cette phase qui précède l'acte chirurgical a un double objectif : diminuer la taille de la tumeur primitive afin d'en faciliter la chirurgie d'une part, et évaluer la réponse histologique de la pièce opératoire à la chimiothérapie afin d'ajuster la chimiothérapie d'autre part (**Figure 13**). Suite à cela, la résection chirurgicale de la tumeur est réalisée en conservant des marges d'exérèse plus ou moins importantes en fonction du cloisonnement de la tumeur. Ainsi la conservation du membre est possible dans 90 % des cas, néanmoins l'amputation reste la seule solution lorsque la tumeur est trop volumineuse, hors d'atteinte ou qu'elle envahit les tissus mous avoisinants. La prise en charge se termine par une chimiothéra-

pie adjuvante post-opératoire de six mois. Cette dernière sera identique à celle administrée en traitement néo-adjuvant seulement si le patient est « bon répondeur », c'est-à-dire qu'au moins 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection [92]. Dans le cas contraire, le patient recevra une autre chimiothérapie associée dans de rares cas à de la radiothérapie afin d'en augmenter les effets. En effet, la radiothérapie n'est pas utilisée en routine dans le traitement de l'ostéosarcome car celui-ci y est très peu sensible [66]. Néanmoins, elle est utilisée lorsque la tumeur ne peut être totalement excisée ou en présence de métastases osseuses multiples.



**Figure 13 | Évaluation du nombre de cellules tumorales nécrotiques sur une pièce de résection**

En France, plusieurs agents de chimiothérapie sont couramment utilisés dans le traitement de cette pathologie (**Tableau 5**) [92–94] : le méthotrexate, la doxorubicine, le cisplatine, et l'ifosfamide. Afin d'augmenter le taux de réponse des tumeurs aux agents de chimiothérapie, ces molécules sont dans la majorité des cas associées sous forme de poly-chimiothérapie. La combinaison de ces différentes molécules, leurs doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie.

Ainsi, cette nouvelle approche thérapeutique a permis d'améliorer grandement la prise en charge et le pronostic des patients [95]. Actuellement, la survie à 5 ans est évaluée à environ 70%, mais chute énormément chez les patients à haut risque. En effet, les patients présentant des métastases au moment du diagnostic ou bien mauvais répondeurs aux chimiothérapies voient leur survie diminuer à 30 % dans les 5 ans suivant le diagnostic. Malgré ces chiffres encourageants, d'énormes progrès restent à faire, puisque les traitements chimiothérapeutiques restent encore relativement toxiques, lourds et mal supportés par les patients. De plus, de nombreux ostéosarcomes restent peu sensibles voir insensibles à ces traitements. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouvelles cibles thérapeutiques en améliorant les connaissances sur les mécanismes moléculaires inhérents au développement des ostéosarcomes.

Drogue	Mécanisme d'action	Doses et Adjuvants (Hattinger et al., 2010)
Méthotrexate (MTX)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent cytotoxique anti-métabolite</li> <li>✓ Inhibiteur de la dihydrofolate réductase (enzyme clé de la synthèse de la thymidine) et d'enzymes impliquées dans la synthèse des purines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Efficacité à doses élevées (12 g/m<sup>2</sup>/cycle) ; Dose cumulative = 48 à 168 g/m<sup>2</sup></li> <li>✓ Administration d'acide folinique (antidote du MTX) (Blackwell et al, 1995) + hyperhydratation alcaline</li> </ul>
Doxorubicine / Adriamycine (DOX / AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent cytotoxique</li> <li>✓ Agent intercalant</li> <li>✓ Inhibiteur des topo-isomérases de type II (enzymes impliquées dans le désenroulement de l'ADN)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 60 à 90 mg/m<sup>2</sup>/cure ; Dose cumulative = 240 à 480 mg/m<sup>2</sup></li> </ul>
Cisplatine (CP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent cytotoxique alkylant</li> <li>✓ Formation de « ponts inter et intrabrins » dans les chaînes d'ADN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 100 à 120 mg/m<sup>2</sup>/cure ; Dose cumulative = 480 à 600 mg/m<sup>2</sup></li> <li>✓ Administration d'une hyperhydratation saline</li> </ul>
Ifosfamide (IFO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agent cytotoxique alkylant, ne dépend pas du cycle cellulaire</li> <li>✓ Formation de ponts inter-brin et intra-brin en se fixant sur le N7 des guanines.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 6 à 14 g/m<sup>2</sup>/cure ; Dose cumulative = 30 à 69 g/m<sup>2</sup></li> <li>✓ Administration conjointe de MESNA + hyperhydratation</li> </ul>

**Tableau 5 | Principaux agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement des ostéosarcomes**

D'après la thèse de Bérengère Gobin (thèse du laboratoire)

Parmi les pistes envisagées ou les molécules en phase d'essai clinique, plusieurs sont dirigées directement contre les fonctions des cellules tumorales (prolifération, apoptose) ou bien envers le microenvironnement tumoral [91,96] (**Figure 14**). En effet, une des spécificités du développement de l'ostéosarcome, et des autres tumeurs osseuses primitives, est l'existence d'un cercle « vicieux » entre les cellules tumorales et le remodelage osseux.

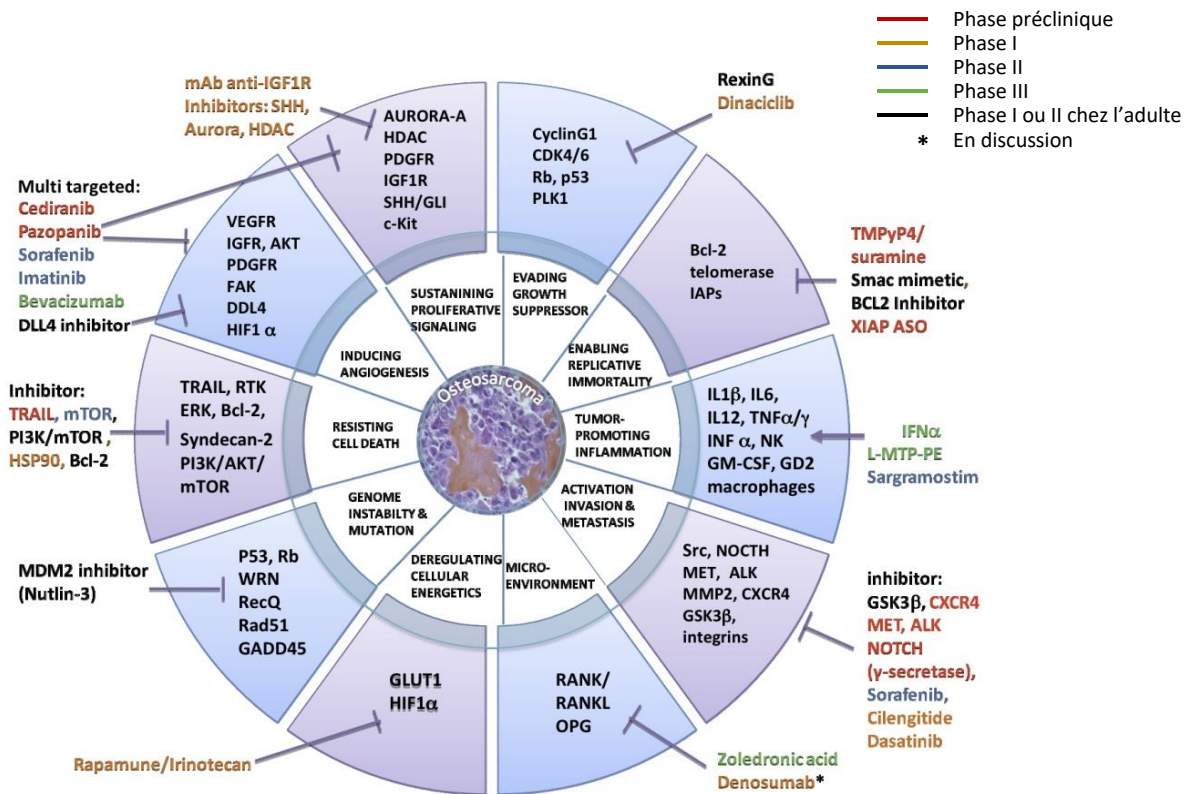


Figure 14 | Principales cibles thérapeutiques de l'ostéosarcome en fonction des capacités tumorales

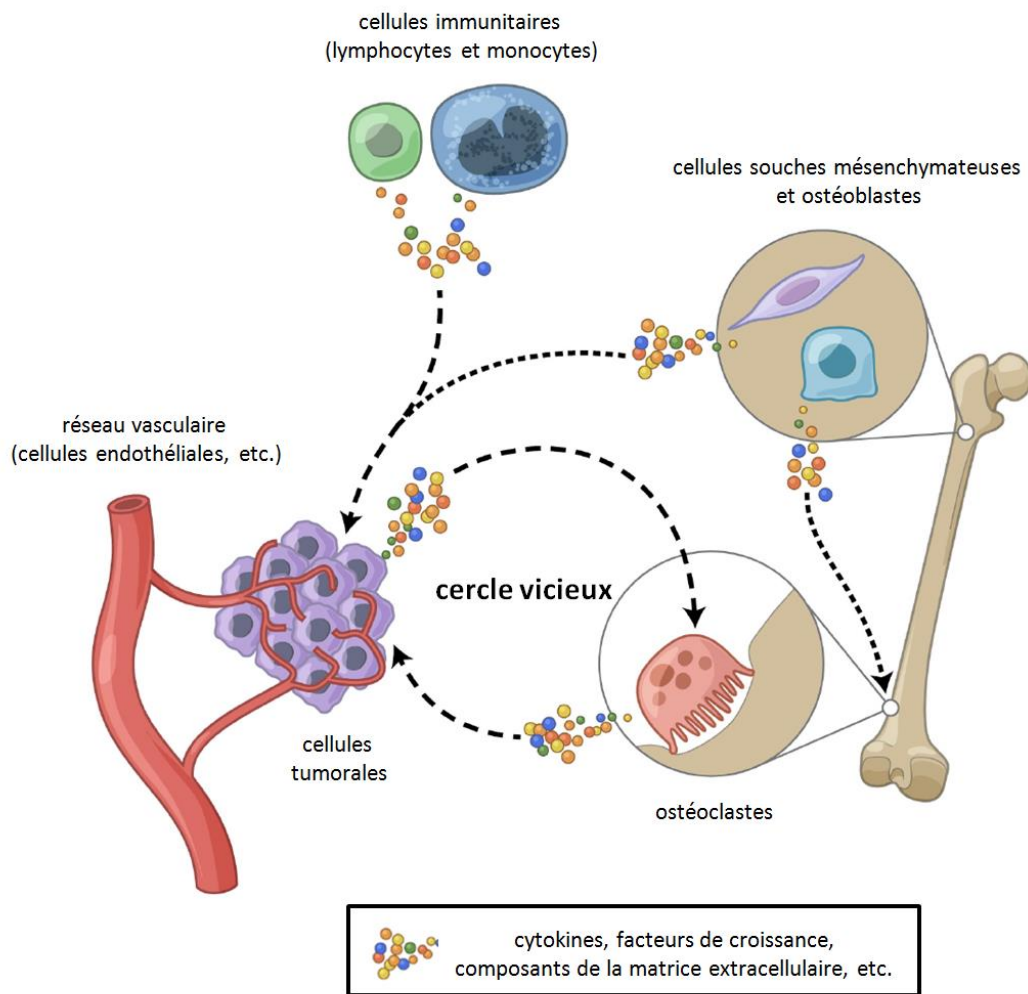
Récapitulatif des différents essais cliniques en cours dans l'ostéosarcome (en orange : phase I, en bleu : phase II, en vert : phase III et en noir : phase I et II uniquement chez l'adulte). D'après Nadège Corradini (CHU de Nantes, UMR957).

### 3. Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome : cibler le cercle « vicieux »

La cible des nouvelles approches thérapeutiques est principalement la cellule tumorale. Néanmoins, depuis quelques années, il est clairement établi que le caractère invasif d'une tumeur n'est pas lié uniquement à son génotype, mais que celui-ci est lié à un ensemble constitué par la tumeur elle-même et son micro-environnement. En effet, le micro-environnement tumoral contribue à la progression des tumeurs par l'apport de nombreux facteurs (facteur de croissance, nutriments, etc.) nécessaires à la survie et à la prolifération de la cellule tumorale. De plus, l'interaction entre la cellule tumorale et les cellules du micro-environnement module ses capacités de développement. La théorie du « seed and soil », c'est-à-dire de la graine et du sol, établit par Paget dans les années 1889 conduit à définir la notion de « niche tumorale » qui serait un environnement propice au développement des cellules tumorales et au maintien d'un pool de cellules souches cancéreuses. Dans cette niche, la cellule tumorale détourne l'immunité locale, la vascularisation et de nombreux facteurs à son profit.

Cette notion est particulièrement vraie dans le cas des tumeurs osseuses primitives où un cercle « vicieux » se met en place entre les cellules du remodelage osseux (ostéoblastes et ostéoclastes notamment), les cellules tumorales et les cellules immunitaires (**Figure 15**) [97]. En effet dans l'environnement osseux, il est établi que les cellules tumorales, en plus de détourner l'immunité locale et l'angiogenèse, entraînent une dérégulation de l'activité des cellules osseuses en sécrétant de nombreux facteurs qui activent directement les ostéoclastes (comme le  $TNF\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1), mais également des facteurs ostéoblastiques (BMPs, IGFs, Wnts, etc.) qui activent indirectement les ostéoclastes en favorisant la production de RANKL par les ostéoblastes. L'activation des ostéoclastes conduit alors à la résorption de la matrice osseuse, ce qui libère des facteurs protumoraux (IGF-1, TGF- $\beta$ , etc.), qui vont eux-mêmes activer la prolifération tumorale, relançant le cercle vicieux. Dans cet environnement, les cellules immunitaires en maintenant une inflammation contribuent également au maintien de ce cercle vicieux.

Par ailleurs, les ostéosarcomes étant de type ostéoblastique, une surexpression de RANKL est souvent décrite dans ces derniers, expliquant ainsi les lésions ostéolytiques et la formation osseuse anarchique observées.



**Figure 15| Le cercle vicieux**

Les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques dont des cytokines qui vont activer directement ou indirectement les ostéoclastes. En retour, la dégradation de la matrice osseuse libère des facteurs pro-tumoraux (facteurs de croissance, calcium...) qui induisent la prolifération tumorale. Ces déséquilibres participent également à l'implication des cellules immunitaires et des ostéoblastes sains dans ce cercle. Adapté de Heymann D et *al.*, 2011 [97].



### III- Signalisation RANK/RANKL/OPG

Comme introduit précédemment, le remodelage osseux est un processus complexe faisant intervenir de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires afin de maintenir l'homéostasie osseuse. Parmi ces facteurs, la triade RANK/RANKL/OPG semble être la voie principale de régulation du remodelage osseux. Cette triade découverte il y a deux décennies, a été depuis largement caractérisée à l'aide de modèles animaux transgéniques. RANKL appartient à la superfamille du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) qui se compose de plus de 40 membres chacun associé à autant de récepteurs membranaires ou solubles. RANKL se lie à un récepteur membranaire nommée RANK, membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Les interactions entre RANKL et RANK, qui sont modulées par un récepteur leurre pour RANKL appelé OPG (pour ostéoprotégérine), conduisent à une transduction de signal intracellulaire spécifique via de nombreuses voies de signalisation et peuvent impacter la plupart des processus cellulaires.

#### 1. Les membres de la triade RANK/RANKL/OPG

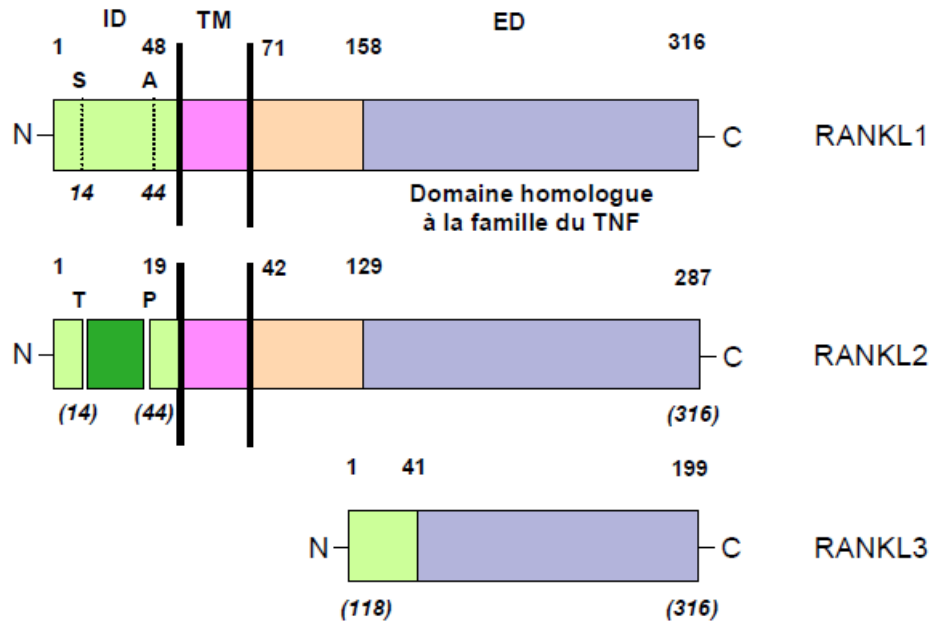
##### 1.1. RANKL

###### 1.1.1. Généralités et structure

RANKL [98] a été découvert par plusieurs équipes simultanément et a été nommé alternativement TRANCE [99], OPGL [47], et ODF [100]. Bien que RANKL soit le nom communément utilisé pour cette cytokine, sa nomenclature officielle est le TNFSF11.

Le gène codant RANKL humain est situé sur le chromosome 13 en 13q14 et le gène murin est placé sur le chromosome 14. Le produit de ce gène est une protéine homotrimerique membranaire de type 2 qui ne possède pas de peptide signal [101]. Cette protéine partage une homologie de 30 % avec le cluster de différenciation 40 (CD40) et le TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), et d'environ 20 % avec FAS-Ligand [99]. Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, RANKL existe sous trois isoformes issues d'un épissage alternatif (**Figure 16**) [102,103].





**Figure 16 | Structures des trois isoformes de RANKL**

RANKL1 et RANKL2 possèdent tous deux un domaine intracellulaire (ID), un domaine transmembranaire (TM) et un domaine extracellulaire (ED). RANKL3 est une forme soluble qui ne possède pas de domaine transmembranaire et intracellulaire. D'après Theoleyre et *al.*, 2004 [110].

Parmi ces isoformes, RANKL1 code pour une protéine transmembranaire de 317 acides aminés chez l'homme, et 316 chez la souris, possédant un domaine intracytoplasmique complet et un ectodomaine extracellulaire. Il s'agit de la forme longue de RANKL. La seconde isoforme, RANKL2, est une forme plus courte de RANKL1 qui possède un domaine extracellulaire réduit chez la souris, et qui en est dépourvue chez l'homme. Ainsi, cette protéine fait respectivement 287 Acides aminés (Aa) chez la souris, et 270 Aa chez l'homme. Enfin, RANKL3 est une forme soluble intracellulaire et monomérique de RANKL comptant 199 Aa chez la souris, et 244 Aa chez l'homme. Cette forme n'est pas sécrétée et est réduite dans sa partie N-terminale des acides aminés codant pour les domaines intracytoplasmique et transmembranaire de RANKL.

Les formes membranaires de RANKL peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire suite à leurs clivages par différentes protéases comme la TNF alpha converting enzyme (TACE) [104] ou encore par ADAM-10, MMP-7 et MMP-14 [105,106]. La forme soluble a une taille d'environ 32 kilodaltons (kDa) comparée aux formes membranaires qui ont une taille comprise entre 40 et 45 kDa [107].

### 1.1.2. Expression

RANKL est exprimé dans une large variété de tissus à des taux variables tels que le cerveau, la peau, l'intestin, les muscles squelettiques, le foie, le rein, les poumons et le tissu mammaire. Toutefois, il l'est plus fortement dans le tissu osseux [47,100,108], les organes lymphoïdes et le système vasculaire [109]. De ce fait, RANKL est exprimé par de nombreuses cellules incluant les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules stromales de la moelle, les lymphocytes T et B activés, les cellules épithéliales mammaires et les fibroblastes [99–101,109–111]. Il est notable qu'au sein de la lignée ostéoblastique, RANKL est plus fortement exprimé par les cellules bordantes que par l'ostéoblaste mature. Par ailleurs, RANKL est exprimé dans de nombreuses lignées comme des lignées de cellules stromales (ST2S, MC3T3-E1), ou d'ostéosarcomes (UMR-106, SaOS2, U2OS) [108].

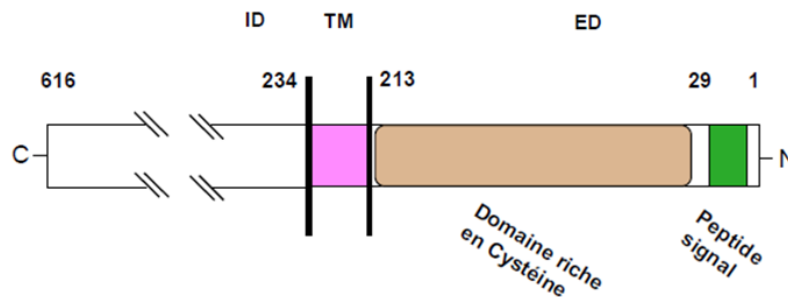
L'expression de RANKL peut être contrôlée par de nombreux facteurs qui peuvent stimuler son expression, c'est le cas de la vitamine D<sub>3</sub>, de l'IL-1, de l'IL-6, de l'IL-11, du TNF- $\alpha$ , de l'oncostatine M, de la PTH et de la prostaglandine E<sub>2</sub> [19,101,110,112,113]. A l'opposé, d'autres facteurs peuvent inhiber son expression comme par exemple le TGF- $\beta$  et l'IL-13 [107,113].

## 1.2. RANK

### 1.2.1. Généralités et structure

RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-B) ou TNFRSF11A, selon la nomenclature officielle est le récepteur de signalisation de RANKL. Ce récepteur qui appartient à la famille des récepteurs au TNF possède environ 40% d'homologie avec CD40, et est codé par le gène TNFRSF11A situé sur le chromosome humain n°18 (chromosome 1 chez la souris) [114]. Chez l'homme, ce gène code pour une protéine transmembranaire de type I constituée de 616 acides aminés et qui possède un peptide signal (**Figure 17**). RANK qui est exprimé à la membrane sous forme trimérique possède un large domaine intra-cytoplasmique en C-terminale ainsi qu'un domaine extracellulaire en N-terminale. Ce domaine extracellulaire contient 4 sites riches en cystéine et 2 sites de N-glycosylation [98,115] qui sont impliqués dans l'interaction avec RANKL et dans la trimérisation du récepteur [116,117]. Par ailleurs, une forme soluble de RANK a déjà été détectée dans des surnageants de cellules activées par RANKL, mais le rôle de cette sécrétion reste pour l'heure inconnue [118]. Enfin, récemment

un nouveau variant murin de RANK issu d'un splicing alternatif a été découvert dans les cellules myélomonocytaires RAW264.7. Ce variant correspondant à une forme largement cytoplasmique est parfois retrouvé à la membrane. Cette forme est capable de réguler négativement l'ostéoclastogenèse [119].



**Figure 17 | Structure du récepteur RANK**

RANK possède un domaine extracellulaire (ED) contenant un peptide signal, un domaine transmembranaire (TM), ainsi qu'un large domaine intracellulaire (ID). D'après Theoleyre et *coll.*, 2004 [110].

### 1.2.2. Expression

L'expression de RANK a été détectée dans de nombreux tissus comme le thymus, le colon, les glandes mammaires, le foie, la prostate, le cerveau, la peau et de façon plus significative dans l'os [114,120–123]. Au niveau cellulaire, RANK est fortement induit dans les ostéoclastes en présence de M-CSF [124]. Il est également exprimé par les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Par ailleurs, son expression a déjà été détectée au niveau des lymphocytes B [125][124], des cellules épithéliales et des fibroblastes.

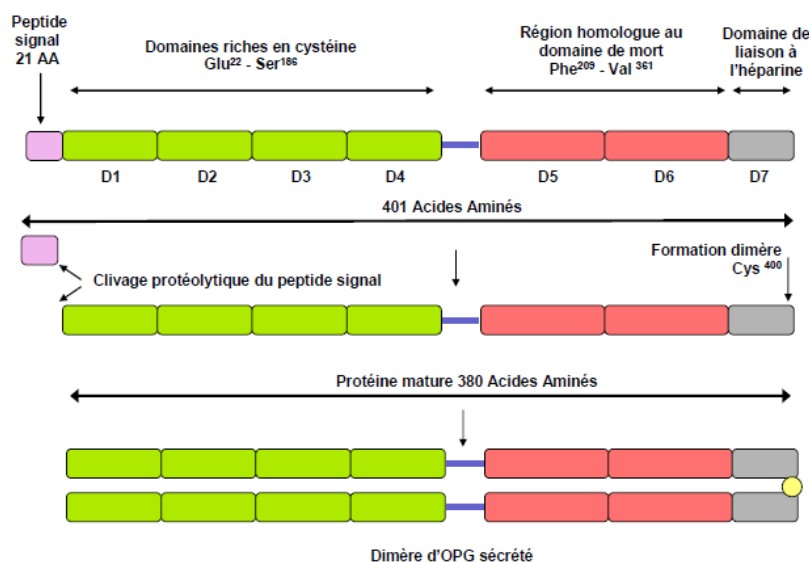
D'une manière générale, l'expression de RANK est très peu modulée par des facteurs exogènes. Son expression peut être induite par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques, et par l'engagement du récepteur aux cellules T (TCR) associée au TGF- $\beta$  et à l'IL-4 sur les lymphocytes T. Par contre, l'expression de RANK sur les cellules de la lignée ostéoclastique ne semble pas être régulée par les principaux agents ostéotropiques [110].

### 1.3. L'OPG

#### 1.3.1. Généralités et structures

L'OPG, ou selon la nomenclature officielle TNFRSF11B, a été initialement nommé de plusieurs façons suite à sa découverte simultanée par des équipes indépendantes : OCIF, TR-1 et FDCR-1 [60,100]. Tout comme RANK, il s'agit d'un récepteur de la superfamille des récepteurs au TNF qui diffère néanmoins des autres membres de cette famille par l'absence d'un domaine transmembranaire. L'OPG est ainsi un récepteur soluble ayant la capacité de se lier à différents ligands incluant RANKL et TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) [126–128]. À noter que la fixation d'OPG à TRAIL inhibe l'effet apoptotique de TRAIL qui en retour bloque l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG. Ainsi, pour se protéger de l'apoptose, certaines tumeurs seront capables de détourner ce mécanisme à leur faveur.

Le gène codant l'OPG est situé chez l'homme sur le chromosome 8 (en 8q24)[129] alors qu'il est situé sur le chromosome 15 de la souris. Chez l'homme, ce gène code pour une glycoprotéine de 401 acides aminés qui possède un peptide signal (de 21 acides aminés) clivé lors de son adressage [114]. L'OPG qui ne contient pas de domaine intramembranaire ni de domaine cytoplasmique est produit exclusivement sous forme d'une protéine extracellulaire soluble. Ainsi, la protéine mature comporte 380 acides aminés, possède une partie N-terminale contenant 4 motifs riches en cystéine (D1-D4) permettant d'induire l'inhibition de l'ostéoclastogenèse (**Figure 18**).



**Figure 18 | Structure de l'OPG**  
D'après Holen et Shipman, 2006 [128]

Son extrémité C-terminale contient quant à elle, deux domaines de mort (D5 et D6, death domain homologous) fonctionnels [129], mais dont la fonction n'est actuellement pas connue pour l'OPG, et un domaine de liaison à l'héparine (D7). Enfin, dans cette partie C-terminale se trouve également un résidu cystéine (Cys400) nécessaire à son homodimérisation. En effet, bien que l'OPG soit synthétisé sous forme monomérique, cette molécule se dimérise via des ponts disulfures afin d'être sécrétée sous forme de protéine homodimérique (110 à 120 kDa) présentant ainsi 4 à 5 sites de N-glycosylation [101].

### 1.3.2. Expression

L'OPG est une molécule ubiquitaire présente dans de nombreux tissus comme le tissu osseux, le foie, le cœur, les reins, les glandes mammaires, le placenta et le cerveau [60,100,109,130]. Physiologiquement, l'OPG est sécrétée en quantité plus importante par plusieurs cellules dérivées de la moelle osseuse, dont les ostéoblastes [131], et les cellules stromales [132]. Cependant, l'OPG est également exprimé dans les cellules endothéliales, les lymphocytes B et les cellules dendritiques [125].

L'expression et la sécrétion d'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes sont modulées par de nombreux facteurs de régulation métabolique. L'IL1, le  $TNF\alpha$ , le  $TGF\beta$ , les œstrogènes augmentent son expression [110,133,134] alors que le PTH, la PGE2, les glucocorticoïdes et la 1,25dihydroxyvitamine D3 la diminuent [110,132,135–138].

## 2. Mutations de RANK/RANKL/OPG en pathologie humaine

Plusieurs mutations des membres de la triade RANK/RANKL/OPG ont été signalées en pathologie humaine et associées à des pathologies osseuses (**Tableau 6**). Ainsi, les modifications génétiques (délétion ou transversion) de RANKL conduiront à l'apparition d'une ostéopétrose autosomique récessive (MIM : 259710) [139], alors que les altérations génétiques (délétion, substitution) d'OPG conduiront à une maladie juvénile de Paget (MIM : 239000)[140–143]. Quant aux altérations de RANK, plus nombreuses et variées, elles pourront être classées en deux catégories en fonction de leurs impacts sur la fonction de RANK. Des mutations par perte de fonction produisant une forme d'ostéopétrose sévère ou maligne avec un nombre réduit d'ostéoclastes (MIM : 612301) [144], alors que les mutations par gain de fonction vont conduire à des pathologies comme l'ostéolyse expansive familiale (MIM : 174810) [145–148] ou la maladie de Paget à initiation précoce (MIM : 602080) [145,149,150]. Dans ces pathologies à gain de fonction, la mutation altère le peptide signal de RANK. En effet, l'ensemble de ces mutations (insertion, duplication) touche l'exon 1 qui correspond à la région contenant le peptide signal de RANK. Ainsi, ces altérations sont à l'origine d'une accumulation intracellulaire d'un peptide anormal qui perturbe le mécanisme normal de régulation du métabolisme osseux au niveau de l'ostéoclastogenèse.

	Mutations	Conséquences / Prédictions	Maladies	Références		
RANK	<u>18-BP DUP, NT83</u> : duplication de 18 pb ; exon 1	ajout de 6 résidus dans le peptide signal, perturbation du clivage de ce peptide	Ostéolyse expansive familiale	Johnson-Pais et al. 2003		
	<u>18-BP DUP, NT84</u> : duplication de 18 pb ; exon 1	ajout de 6 résidus dans le peptide signal, perturbation du clivage de ce peptide		Hughes et al. 2000		
	<u>27-BP DUP, NT75</u> : duplication de 27 pb ; exon 1	-		Hughes et al. 2000		
	<u>15-BP DUP, NT87</u> : duplication de 15 pb ; exon 1	-	Maladie de Paget (initiation précoce)	Whyte et al. 2014		
	<u>ARG170GLY</u> : transition 508A-G	substitution R170G dans le domaine extracellulaire riche en cystéine		Ostéopétrose autosomique récessive	Guerrini et al. 2008	
	<u>CYS175ARG</u> : transition 523T-C	substitution C175R dans le domaine extracellulaire riche en cystéine				
	<u>ARG129CYS</u> : transition 385C-T	substitution R129C dans le domaine extracellulaire riche en cystéine				
	<u>ALA244SER</u> : transversion 730G-T	substitution A244S dans le domaine intracellulaire				
	<u>GLY53ARG</u> : transversion 157G-C	substitution G53R dans le domaine extracellulaire riche en cystéine				
	<u>2-BP DEL, 828CG</u> : délétion de 2 pb dans le dernier exon	apparition codon stop prématuré => perte possibilité trimérisation				Ostéopétrose autosomique récessive
<u>5-BP DEL, IVS7+4</u> : délétion de 5 pb ; l'intron 7	prelèvement pour provoqué saut de l'exon 7					
<u>MET199LYS</u> : transversion 596T-A ; exon 8	perte d'un résidu hautement conservé					
<u>100-KB DEL</u> : délétion de 100-KB	-					
<u>3-BP DEL, 182GAC</u> : délétion 3pb ; exon 3	perte d'un résidu conservé : Asp-182					
<u>CYS87TYR</u> : transition 354G-A ; exon 2	substitution C87Y dans domaine de liaison					
<u>PHE117LEU</u> : transition 443T-C ; exon 2	substitution F117L dans domaine de liaison					
<u>3-BP DEL AND 2-BP INS</u> : délétion 965TGA et insertion 969TT ; exon 5	apparition codon stop prématuré : perte des 79 AA terminaux					
<u>245-KB DEL</u> : délétion de l'exon 4 et 5	protéine sans site de liaison du ligand et peptide signal altéré					
<u>THR76PRO</u> : transversion 226A-C ; exon 2	substitution T76P dans le domaine II riche en cystéine	Maladie juvénile de Paget	Naot et al. 2014			
OPG				Naot et al. 2014		

**Tableau 6 | Mutations humaines des gènes de la triade RANK/RANKL/OPG**

Liste des mutations connues de la triade RANK/RANKL/OPG en juillet 2016 d'après le site Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.omim.org/>)

### 3. Fonction physiologique de l'axe RANK/RANKL/OPG

Les fonctions physiologiques de la triade RANK/RANKL/OPG ont été largement caractérisées par l'utilisation, pour chaque membre, de modèles de souris transgéniques ou invalidées (**Tableau 7**). En effet, ces modèles présentent tous des troubles plus ou moins importants du remodelage osseux (ostéoporose ou ostéopétrose) associés à une absence ou à une suractivation des ostéoclastes. Ces troubles peuvent être compensés dans les souris knock-out par la protéine recombinante correspondante. Ainsi, l'utilisation de ces modèles a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de cette signalisation dans le remodelage osseux. Par ailleurs, ces modèles murins ont permis de soulever l'importance de cette signalisation dans d'autres processus comme le développement des glandes mammaires, la maturation des cellules immunitaires ou encore le contrôle de la calcification vasculaire.

	Observations	Conclusions	Références
RANKL	absence totale d'ostéoclaste fonctionnel : ostéopétrose et absence d'éruption dentaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- activation des ostéoclastes</li> <li>- prolifération des cellules épithéliales mammaires</li> <li>- maturation des lymphocytes T et des chondrocytes</li> </ul>	(Kong et al. 1999) (Fata et al. 2000) (Kim et al. 2000)
	retard de croissance		
	hématopoïèse compensatoire extra médullaire		
	mauvais développement des structures lobulo-alvéolaires des glandes mammaires (mort des nouveaux-nés)		
	absence de maturation des lymphocytes T		
	hypertrophie des chondrocytes		
RANK	absence totale d'ostéoclaste fonctionnel : ostéopétrose et absence d'éruption dentaire	- différenciation des ostéoclastes	(J. Li et al. 2000)
	absence de ganglions lymphatiques : défaut de maturation des lymphocytes T et B ( par contre développement thymique normal)	- développement des ganglions lymphatiques	(Dougall et al. 1999)
OPG	diminution de la densité osseuse associée une porosité accrue	<ul style="list-style-type: none"> <li>- régulation de la masse osseuse</li> <li>- régulation de l'ostéoclastogenèse</li> <li>- calcification vasculaire</li> </ul>	( Bucay et al. 1998) (Mizuno et al. 1998)
	ostéoclastogenèse importante : ostéoporose sévère		
	augmentation des calcifications vasculaires en particulier dans l'aorte et les artères rénales		

**Tableau 7 | Phénotypes des souris invalidés pour les membres de la triade RANK/RANKL/OPG**

Liste non exhaustive des troubles observés chez les souris RANK, RANKL et OPG KO. D'après le site Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.omim.org/>)



Au-delà des rôles mis en évidence par la génération de ces modèles génétiquement modifiés, d'autres études récentes mettent en évidence de nouvelles implications de la triade RANK/RANKL/OPG dans de nombreux processus comme dans : la différenciation des cellules du microfold intestinal [151,152], la régulation de la température corporelle [153,154], la vascularisation [155], le développement des cellules épithéliales de la glande mammaire [123], la protection des neurones [156] et la prolifération des cellules B [157,158]. Cependant, dans ce chapitre, seuls les rôles de la signalisation RANK/RANKL qui intéressent de près le micro-environnement tumoral seront abordés, c'est-à-dire les rôles concernant l'implication de RANK/RANKL dans le remodelage osseux et dans l'immunité.

### 3.1. RANK/RANKL et le remodelage osseux

C'est l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour la triade RANK/RANKL/OPG qui a permis de faire progresser rapidement les connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'homéostasie osseuse. En effet, les observations (phénotypiques) faites chez ces souris (**Tableau 7**), ainsi que des expériences de cultures cellulaires, ont permis de mettre en évidence que l'expression de RANKL, par les cellules stromales et du linéage ostéoblastique, stimule la différenciation [47,100,122,159,160], la maturation [47,122,161,162] et la survie des ostéoclastes [161] via sa fixation sur son récepteur RANK présent à la surface des préostéoclastes [100]. Néanmoins, la présence de M-CSF dans l'environnement cellulaire est requise pour induire les effets biologiques de RANKL [48].

Concernant la fixation de RANKL à RANK, des études complémentaires ont montré que RANKL se fixe avec une grande spécificité aux récepteurs RANK présents à la surface des ostéoclastes, et ce avec une grande affinité (3 nM) [121,163]. Ainsi, la fixation de RANKL à RANK conduit à son activation et à la transduction d'un signal cellulaire par l'intermédiaire de différentes protéines adaptatrices de la famille TNF receptor associated factor (TRAF : TRAF6, TRAF5 et TRAF2) (**Figure 19**). En effet, tout comme les autres récepteurs membres de la superfamille des récepteurs au TNF, RANK est caractérisé par l'absence d'activité tyrosine kinase et nécessite par conséquent des protéines adaptatrices de la famille TRAF afin de transmettre un signal cellulaire. Ainsi, le domaine intracellulaire de RANK possède deux sites de liaison à TRAF qui sont capables d'interagir avec TRAF-2, -3, -5 et -6 [164,165]. Cependant, seule la mutation de TRAF6 conduit à un phénotype ostéopétrotique similaire au phénotype de souris invalidées pour RANK, soulignant ainsi le rôle prédominant de TRAF6, parmi les membres de la famille TRAF, dans la signalisation associée à RANK [164–169].

Consécutivement, TRAF6 conduit à l'activation de différentes voies de signalisation, telles que Src / PLC $\gamma$ , PI3K / Akt / mTOR et MAPK (p38, JNK, ERK1 / 2) qui entraînent la translocation de facteurs de transcription, tel que NF- $\kappa$ B, c-Fos / c-Jun ou encore MITF [170]. S'ensuit la transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et dans l'activation des ostéoclastes matures.

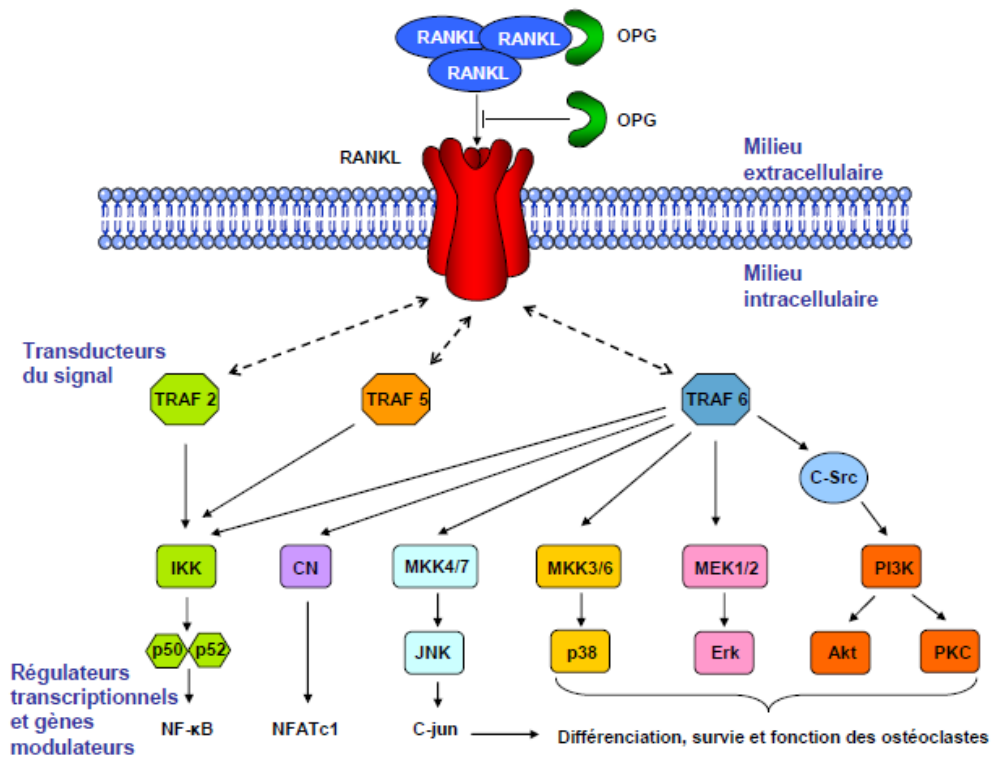


Figure 19| Signalisation induite par la fixation de RANKL au récepteur RANK  
D'après Baud'huin et *al.*, 2007 [170].

Par ailleurs, le blocage de RANKL au cours de la croissance par un anticorps bloquant (IKK22.5) induit un arrêt transitoire de la croissance des os longs et du crâne ainsi qu'un blocage irréversible de l'éruption des dents et de leurs développements [171,172]. Ces travaux réalisés en parallèle de mes sujets principaux de thèse ont fait l'objet des articles précédemment cités dont je suis co-auteurs, et qui sont fournis en **Annexe 4**.

À l'opposé, l'injection de RANKL soluble à des souris naïves induit une hypercalcémie associée à une ostéoporose sévère [47]. Ces résultats confirment l'importance de RANKL dans le remodelage osseux et en particulier dans le recrutement des ostéoclastes.

Plus précisément, c'est le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et de son récepteur leurre, l'OPG, qui semble contrôler la résorption osseuse. En effet, au sein de ce système l'OPG agit comme un récepteur leurre pour RANKL, ce qui lui permet d'inhiber les interactions entre RANKL et RANK, et de moduler la différenciation, la survie et l'activation des ostéoclastes [136,173,174]. Chez des souris transgéniques, la surexpression d'OPG conduit au développement d'une ostéopétrose s'accompagnant d'une diminution de nombres d'ostéoclastes différenciés [60]. Les mêmes effets sont observés lors de l'administration parentérale d'OPG recombinant. À l'opposé, les souris invalidées pour l'OPG développent une ostéoporose sévère. De manière unique parmi les facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme osseux, les seules modifications géniques de l'expression d'OPG conduisent dans un sens à une ostéopétrose, et dans le sens inverse à une ostéoporose.

Néanmoins, la fonction de l'OPG dans le tissu osseux ne se limite pas à l'inhibition indirecte de l'activation de l'ostéoclastogénèse. En effet, Wittrand et *coll.* ont montré que l'OPG pouvait agir directement sur l'activité de l'ostéoclaste mature en inhibant l'expression de certains de ces marqueurs comme la cathepsine K et la TRAP [175]. À l'opposé, l'OPG augmente l'expression de la MMP9 par l'ostéoclaste.

Ainsi, l'ensemble des études menées sur la triade RANK/RANKL/OPG ont toutes confirmé le rôle essentiel de cette dernière dans le maintien et le contrôle de l'homéostasie osseuse à travers le contrôle de l'ostéoclastogénèse.

### 3.2. RANK/RANKL et immunité

La signalisation RANK/RANKL joue un rôle majeur dans le système immunitaire, d'une part par son implication dans le développement des organes lymphoïdes secondaires [176], en particulier des ganglions lymphatiques [174] et d'autre part par son implication dans la maturation des cellules épithéliales du thymus nécessaires au développement des lymphocytes T [177,178]. Par ailleurs, RANKL est aussi impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire en induisant la prolifération des lymphocytes T [98] et la survie des cellules dendritiques [99].

En réalité, les lymphocytes T via l'expression de RANKL stimulent les cellules dendritiques qui expriment RANK afin d'améliorer leur survie et d'augmenter la réponse mémoire des lymphocytes T [179]. Par ailleurs, RANK est présent à la membrane cellulaire des mono-

cytes/macrophages et RANKL agit comme un facteur chimioattractant pour ces cellules [180]. Ainsi dans un environnement tumoral, les macrophages associés aux tumeurs, TAM (tumor associated macrophages), s'accumulent dans l'environnement et en fonction de leur phénotype M1 ou M2 contribuent à la prolifération, l'angiogenèse ou la dissémination des métastases [181]. Parmi ces macrophages, RANK est principalement exprimé par le macrophage de type 2, or de façon intéressante ce dernier est fortement associé au processus angiogénique [182]. Par ailleurs, l'activation de la signalisation RANK/RANKL au sein du macrophage M2 permet de moduler la production de chimiokines promouvant la prolifération des lymphocytes T régulateurs en faveur d'un environnement immunosuppresseur [183].

En résumé, la signalisation RANK/RANKL joue un rôle important dans l'immunité via ses implications dans la modulation de la réponse immunitaire (immunotolérance), la maturation des lymphocytes, l'activation des cellules dendritiques, et le développement des organes lymphoïdes.

## 4. Signalisation RANK/RANKL et cancer

L'expression de RANK/RANKL ne se limite pas aux tissus sains, en effet de nombreuses études ont démontré leur expression dans des tissus néoplasiques. Cette large distribution renforce l'hypothèse de leur implication dans les processus oncogéniques (**Tableau 8**). Ainsi, l'implication fonctionnelle de la signalisation RANK/RANKL dans le développement du cancer a fait l'objet d'une récente revue [[184], en **Annexe 4**]. Cette implication dans les processus oncologiques est probablement dépendante des différentes fonctions importantes que la signalisation RANK/RANKL occupe dans l'immunité, le remodelage osseux, le développement des vaisseaux sanguins, et la prolifération des cellules épithéliales mammaires.

### 4.1. Implication générale en cancérologie

#### 4.1.1. Données cliniques

Une large variété de cellules de carcinomes<sup>2</sup> expriment RANK à des niveaux transcriptionnels ou protéiques très différents [185–187]. En effet, 89% des carcinomes évalués par immunomarquage montrent un marquage positif pour RANK, et environ 60 % présentent un marquage pour 50 % des cellules cancéreuses.

De façon intéressante, l'expression de RANK dans les carcinomes semble être un marqueur de mauvais pronostic comme le témoigne son expression dans le cancer du sein [187,188]. De plus, Pfitzner et *coll.* ont observé qu'une expression élevée de RANK dans les tumeurs primaires du sein est associée à une forte sensibilité à la chimiothérapie, mais aussi à un risque plus élevé de rechute et de décès et ce malgré cette forte sensibilité des tumeurs [188]. Par ailleurs, l'expression de RANK a également été décrite comme étant de mauvais pronostic chez les patients présentant des métastases osseuses, mais pas chez ceux souffrant de métastases des viscères [189].

---

<sup>2</sup> Carcinome : cancer développé à partir de tissu épithélial (ex. : cancer du sein, de la peau)

	<b>Tumeurs exprimant RANK (Références)</b>	<b>Tumeurs exprimant RANKL (Références)</b>
<b>Cancer de la vessie</b>	[186]	-
<b>Cancer du sein</b>	[185–188,190,191]	[192–195]
<b>Cancer du col de l’utérus</b>	[186,196]	[196]
<b>Chondrosarcome</b>	[197]	[197,198]
<b>Cancer colorectal</b>	[186]	-
<b>Tumeur endométriale</b>	[186]	-
<b>Tumeur de l’œsophage</b>	[186,199]	-
<b>Tumeur à cellules géantes</b>	[200]	[198,200,201]
<b>Hépatocarcinome</b>	[186,202]	[202,203]
<b>Cancer du poumon</b>	[186,204]	[204]
<b>Lymphome</b>	[186,205]	[206,207]
<b>Mélanome</b>	[191,208]	-
<b>Myélome</b>	[209]	[209,210]
<b>Neuroblastome</b>	[186]	[211]
<b>Carcinome épidermoïde oral</b>	[212]	[212]
<b>Ostéosarcome</b>	[198,213]	[198,213,214]
<b>Cancer de la prostate</b>	[186,191,215]	[216]
<b>Cancer du rein</b>	[217]	[217]
<b>Tumeur du thymus</b>	[186]	-
<b>Adénocarcinome de la thyroïde</b>	[186,218]	[218]

**Tableau 8 | Expression de RANK et RANKL dans les cancers**

Liste non exhaustive des articles faisant état d’une expression de RANK ou de RANKL dans les cancers.

De façon similaire, les sarcomes<sup>3</sup> expriment RANK ( de 1% à 69% en fonction des séries) et leur expression est corrélée avec les paramètres cliniques [213,219,220]. Trieb et *coll.* ont décrit une corrélation inverse entre l'expression de RANK et le taux de survie global de patients atteints d'ostéosarcome, mais n'ont pas observé de corrélation avec la réponse à la chimiothérapie [219]. Ces auteurs ont également observé un faible taux de survie global ainsi qu'une faible proportion de patients exempts d'autres maladies lorsque les tumeurs expriment RANK. Bago-Horvath et *coll.* ont révélé que l'expression de RANKL est beaucoup plus fréquente dans les ostéosarcomes des extrémités inférieures que dans ceux provenant d'une autre localisation [220]. De plus, ils n'ont pas trouvé de corrélation significative entre l'expression de RANKL et les paramètres cliniques. Cependant, ils ont établi que l'expression de RANK constitue un facteur de pronostic négatif en ce qui concerne la survie sans maladie, confirmant les données obtenues par Trieb et *coll.* [219].

De façon intéressante, en 2012, Papanastasiou et *coll.* ont identifié une nouvelle isoforme de RANK (nommée RANK-c) qui est générée par épissage alternatif [221]. Cette isoforme est exprimée dans certains échantillons de cancer du sein et est corrélée de façon inverse au grade histologique de la tumeur. RANK-c est capable d'inhiber la motilité cellulaire et la migration des cellules du cancer du sein en interférant avec la signalisation RANK [221].

En ce qui concerne les implications cliniques de RANKL, malgré plusieurs études, aucune donnée n'a été corrélée à l'expression de RANKL par les cellules tumorales que ce soit dans les carcinomes ou dans les sarcomes [188,220]. Cependant, dans une série de 40 patients, Lee et *coll.* ont montré que l'expression de RANKL était liée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie préopératoire et à un faible taux de survie [214].

#### 4.1.2. Effet direct de la signalisation RANK/RANKL sur les cellules tumorales et rôles de l'OPG

Sur la base de l'expression de RANK par les cellules tumorales, ces dernières peuvent être la cible de RANKL. En effet, la fonctionnalité de l'expression de RANK, présent au niveau des membranes cellulaires de ces cellules, a été démontrée par sa capacité à se lier à RANKL et à induire les voies de signalisation intracellulaire spécifiques à l'interaction entre

---

<sup>3</sup> Sarcome : tumeurs issues des tissus conjonctifs (ex. : tumeurs osseuses)

RANK et RANKL. Cette activation des voies de signalisation permet d'expliquer les fonctions variées que peuvent détourner les tumeurs.

Ainsi, le RANKL qui stimule les cellules tumorales peut provenir soit de la cellule tumorale elle-même, soit de l'expression de RANKL par d'autres cellules de l'environnement. RANKL exercera ainsi, par l'intermédiaire de RANK, soit une action autocrine, soit une action paracrine ce qui contribue à établir un environnement fertile nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules tumorales.

Cependant, l'interaction entre RANK et RANKL est aussi fortement contrôlée par l'OPG (pouvant être exprimé par la cellule tumorale), qui tout comme RANKL est régulé par des cytokines inflammatoires libérées dans le micro-environnement des cellules cancéreuses. Ainsi l'activité de RANKL se traduira par rapport au niveau et à la cinétique d'expression de ces deux cytokines dans le micro-environnement [110,222]. La biodisponibilité en RANKL sera donc dépendante de l'OPG.

Par ailleurs, l'OPG possède de nombreux autres ligands qui régulent nettement son expression et qui ont un impact sur la disponibilité de RANKL (**Figure 20**) [223]. De cette façon l'OPG, par son domaine héparine, se lie à des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes, tels que le syndécan-1, qui peuvent séquestrer et internaliser l'OPG à la membrane cellulaire des cellules cancéreuses [127,223]. Un exemple de la conséquence fonctionnelle de cette interaction dans le cancer est fourni par les cellules myélomateuses qui surexpriment le syndécan-1 [224], et qui par conséquent vont piéger, internaliser et dégrader l'OPG produite dans le microenvironnement osseux. Ainsi, l'équilibre OPG / RANKL est dérégulé en faveur de RANKL, ce qui stimule la résorption osseuse et peut être aggravé par la production de RANKL par les cellules de myélome.

En séquestrant l'OPG, les cellules de myélome élaborent un microenvironnement qui facilite leur expansion. De même, l'OPG peut être piégé par les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes situés dans la matrice extracellulaire comme cela a été observé dans l'ostéosarcome [225].

Par ailleurs, l'OPG est capable de se lier à TRAIL qui est un facteur clef naturel proapoptotique et "anti-cancer" [126]. De cette manière l'OPG, lorsqu'il est sécrété par les cellules cancéreuses, agit comme un facteur anti-apoptotique et pro prolifératif en bloquant l'acti-



tivité de TRAIL, comme cela a été montré dans le cancer de la prostate [226]. De même, le Complexe VIII (facteur VIII de Willebrand) est également capable de se lier à l'OPG et augmente la complexité de ce système en régulant la mort des cellules cancéreuses induites par le TRAIL [227].

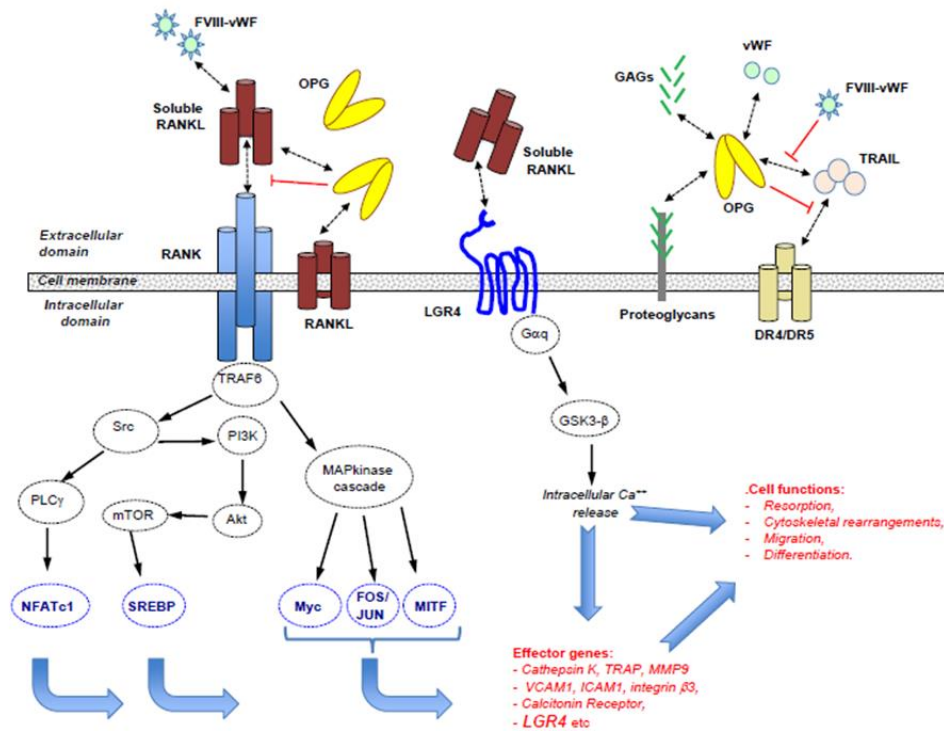


Figure 20 | Signalisation RANK/RANKL dans les cellules cancéreuses

D'après Navet et *al.*, 2016 [184]

#### 4.1.3. Expression de RANKL par les cellules tumorales : rôle dans le micro-environnement

En plus de ses effets directs sur les cellules cancéreuses, RANKL est capable de moduler de façon marquée l'environnement tumoral notamment en agissant sur l'immunité locale et sur la prolifération des cellules épithéliales. Ainsi en dehors de la niche osseuse qui est le premier environnement identifié comme une cible de la signalisation RANK / RANKL, notamment dans le développement des tumeurs osseuses primitives ou des métastases, la signalisation RANK / RANKL au vu de ses fonctions physiologiques est également capable de moduler l'infiltrat immunitaire, la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la néo-angiogenèse. Ces perturbations de l'environnement permettent à la cellule tumorale de s'établir une « niche » propice à son développement.

## **Perturbation des fonctions immunitaires par l'axe RANK/RANKL**

Dans le cancer du sein, RANKL est principalement produit par les lymphocytes T CD4+ CD25+ Foxp3 qui correspondent aux lymphocytes T régulateurs. Dans ce contexte, un cercle vicieux est établi entre les TAMs, les lymphocytes Treg et les cellules tumorales induisant une croissance tumorale, une diffusion des cellules tumorales ainsi qu'une augmentation du processus métastatique [228]. Ainsi, les lymphocytes T semblent être la principale source de RANKL dans les processus de tumorigenèses. Le RANKL produit par ces lymphocytes serait impliqué dans les étapes d'initiation du processus de migration, et induirait l'initiation d'un environnement pré-métastatique permissif [229].

## **Induction de la niche tumorale et stimulation de la migration par l'axe RANK/RANKL**

Jones et *coll.* ont fourni la première preuve d'une activité chimiotactique de RANKL [191]. En effet, ces auteurs ont montré que RANKL produit par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse attire les cellules cancéreuses qui expriment RANK et induit leur migration. Ce mécanisme semble être relativement universel et a été observé dans le cancer de la prostate [191,215,230,231], du sein [191], du poumon [232], du rein [217], de l'endomètre [233] et dans les hépatocarcinomes [202], les mélanomes [191], les carcinomes épidermoïdes oraux [234] et l'ostéosarcome [235,236].

La migration induite par RANKL est associée à des cascades de signalisation spécifiques, en particulier l'activation des voies MAP kinases. L'axe RANK/ RANKL régule ensuite la migration des cellules cancéreuses et RANKL agit en tant qu'agent chimioattractif sur des cellules qui expriment RANK.

Cependant bien qu'initialement considérée comme un facteur pro-métastatique, notre vision de l'implication de RANKL a changé quand ce facteur a été lié au développement de la glande mammaire [123]. En effet, une carence en RANKL entraîne un défaut dans la formation des structures lobo-alvéolaires de la glande mammaire requises pour la lactation [237,238]. Ainsi, RANKL est capable de promouvoir la survie et la prolifération des cellules épithéliales simultanément à la hausse de l'expression de RANK au cours du développement de la glande mammaire [123,237,238].

La perturbation de ce mécanisme coordonné peut conduire à la formation de lésions pré-néoplasiques, puis à la formation de foyers de tumeurs comme le montre une étude de Gonzalez-Suarez et *coll.* [239]. En effet, ces auteurs ont établi des souris transgéniques surexprimant RANK dans les glandes mammaires, et ce sous le contrôle du virus mammaire murin. Chez ces souris, l'apparition de foyers pré-néoplasiques (hyperplasies canalaire multifocales, néoplasies intra-épithéliales mammaires multifocales), ainsi que le développement de lésions d'adénocarcinomes est beaucoup plus élevé que chez des souris de type sauvage. Par ailleurs, l'utilisation de RANK recombinant (RANK-Fc), chez des souris MMTV-neu, développant spontanément des tumeurs mammaires, permet de réduire le développement de tumeurs mammaires et de métastases pulmonaires chez ces souris [239].

Dans un travail complémentaire, cette équipe a également démontré que l'axe RANKL / RANK est pro-actif dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), promeut la migration cellulaire en même temps que la néo-vascularisation, et que l'expression de RANK/RANKL est significativement associée à des tumeurs métastatiques [240]. Dans l'ensemble, les données ont révélé que la signalisation RANK / RANKL favorise la phase initiale de développement du cancer du sein par induction de la pluripotence et de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales mammaires. Un processus similaire a été confirmé dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou [241], dans le cancer de l'endomètre [233]. Ainsi l'expression de RANKL semble associée à la transition épithélio-mésenchymateuse notamment dans le cancer de la prostate où il en serait un marqueur [216]. Ces études confirment donc l'implication de RANKL dans le processus d'initiation des tumeurs.

### **Stimulation de la néo-angiogenèse par l'axe RANK/RANKL**

Les vaisseaux sanguins sont utilisés par les cellules tumorales pour obtenir de grandes quantités de nutriments et sont leur principal moyen de migration pour envahir des organes éloignés. Or, il a été démontré que RANK est exprimé par les cellules endothéliales et que RANKL impacte le processus angiogénique en stimulant d'une part l'angiogenèse via des mécanismes dépendants de Src et de la phospholipase C [242,243], et d'autre part en augmentant la survie des cellules endothéliales via un mécanisme dépendant de la voie PI3K/Akt [244]. De plus RANKL, induit également la prolifération des précurseurs des cellules endothéliales et la formation des tubes vasculaires [245]. Au sein de la niche tumorale, ce phénomène est exacerbé par le Vascular endothelial growth factor (VEGF), souvent sécrété par les cellules tumorales,

qui régulent positivement la réponse des cellules endothéliales à RANKL en augmentant l'expression de RANK [242] et la perméabilité vasculaire [246].

#### 4.2. Implication dans les tumeurs osseuses primitives

Au sein des tumeurs osseuses primitives, le cas des tumeurs à cellules géantes est particulièrement représentatif des effets que peut induire une altération de l'expression de la signalisation RANK/RANKL. Ces tumeurs de type ostéoclastiques sont localement agressives, de par l'ostéolyse sévère qui leur est associée, et connues pour exprimer de façon importante RANK. Cette activité coïncide avec l'expression de RANKL par les cellules mononuclées du stroma qui viennent activer de façon paracrine les cellules tumorales par la fixation de RANKL à RANK [198]. Ainsi, bien que la pathogenèse de ces tumeurs soit mal définie, il est vraisemblable que les cellules géantes, qui expriment RANK, soient à l'origine de la destruction osseuse.

En ce qui concerne plus particulièrement les ostéosarcomes, sujet de ce mémoire, ces derniers sont connus pour synthétiser de grandes quantités de matrices ostéoïdes et métastaser principalement à l'os et aux poumons [93]. Une grande majorité des ostéosarcomes expriment RANKL, OPG et RANK à des taux plus ou moins élevés [247,248]. Il a déjà été prouvé que l'expression de RANKL, dans les ostéosarcomes humains, est associée de façon directe à une diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeur Prkar1a (cAmp-dépendant protein kinase type 1, alpha regulatory subunit)[249]. La délétion de ce gène, chez la souris, induit spontanément la formation d'ostéosarcome [249]. Ainsi, bien qu'aucune fonction ne soit encore associée à RANKL dans la physiopathologie des ostéosarcomes, des données suggèrent que cette cytokine serait impliquée dans les processus de migration cellulaire, mais pas dans ceux liés à la prolifération [248]. Par ailleurs, le RANKL tumoral sécrété dans le microenvironnement perturbe probablement le remodelage osseux en induisant une ostéolyse excessive. En effet, des études précliniques réalisées chez des animaux injectés pour développer un ostéosarcome montrent que le blocage de RANKL par de l'OPG recombinant empêche la destruction osseuse induite par la tumeur [250]. Des résultats similaires sont obtenus lors du traitement d'animaux portant un ostéosarcome avec une protéine recombinante RANK-Fc [251].

Ainsi, dans le contexte osseux, la perturbation de la signalisation RANK/RANKL par la tumeur induirait un environnement favorable au développement des tumeurs par la mise en place d'un « cercle vicieux » entre les cellules tumorales (niche tumorale), les cellules immunitaires et les cellules en charge du remodelage osseux.

## 5. LGR4 un nouveau récepteur pour RANKL

De façon extrêmement récente, un nouveau récepteur de RANKL nommé Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4), caractérisé par 7 segments transmembranaires, a été identifié. Dans ces travaux Luo et *coll.*, révèlent que RANKL se fixe sur le domaine extracellulaire de LGR4, ce qui a pour effet de réguler négativement l'ostéoclastogenèse via l'activation de la signalisation  $G\alpha_q$ /GS3K- $\beta$  et la répression de la voie NFATc1 [61]. Par ailleurs, LGR4 est une cible transcriptionnelle de la voie canonique RANKL-NFATc1, ce qui montre que la signalisation de LGR4 agit comme une boucle de rétrocontrôle de l'activité de RANKL. De façon intéressante, une mutation dans le gène codant LGR4 a été rapportée comme induisant un phénotype d'ostéoporose chez les patients atteints [252]. Ce phénotype peut ainsi s'expliquer par le nouveau rôle de LGR4 comme récepteur de RANKL.

Bien qu'aucune implication de l'axe LGR4-RANKL n'ait encore été mise en évidence dans des pathologies cancéreuses, de nombreux travaux suggèrent que LGR4 favorise la prolifération d'un certain nombre de cellules tumorales, notamment dans le cancer du sein, de la prostate, de l'estomac, du côlon et du foie [253–255]. Ces effets prolifératifs sont liés à l'activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin. Ainsi, LGR4 semble être un nouveau régulateur du développement et de la tumorigenèse du cancer de la prostate [255,256]. De plus la voie de signalisation LGR4-Stat3 semble impliquée dans le développement des ostéosarcomes [257]. Ainsi l'étude de ce nouveau récepteur à RANKL, et de cette voie de rétrocontrôle, devrait à terme permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant l'homéostasie osseuse ainsi que les pathologies tumorales ou non s'y développant.

## 6. Approches thérapeutiques ciblant la signalisation RANK/RANKL/OPG en cancérologie

Lorsque les cellules tumorales en prolifération sont localisées dans un environnement osseux (tumeurs osseuses primitives ou métastases), ces dernières perturbent la balance entre la formation et la résorption osseuse afin de créer un environnement favorable à leur croissance [229]. Ainsi, dans ce contexte, le microenvironnement osseux est une cible thérapeutique intéressante dont la signalisation RANK/RANKL fait partie [258].

L'utilisation d'OPG recombinant (OPG-Fc) constitue la première génération de thérapie ciblant RANKL développée, dans un premier temps, afin de réduire les pertes osseuses chez les femmes en période post-ménopause [259]. Néanmoins, à cause de la capacité de l'OPG à lier différents ligands et en particulier TRAIL, les essais cliniques basés sur l'OPG recombinant ont été suspendus jusqu'au développement d'un anticorps monoclonal ciblant RANKL.

Le Denosumab®, un anticorps entièrement humanisé ciblant RANKL, a été développé afin de bloquer RANKL et d'empêcher sa liaison à RANK (et ce tout en évitant les interactions avec d'autres ligands d'OPG). Chez les patients atteints d'ostéoporose, le Denosumab® est bien toléré et une seule dose sous-cutanée suffit à induire une diminution prolongée du remodelage osseux [260]. L'efficacité du blocage de l'activité de RANKL a aussi été démontrée par l'inhibition de la résorption osseuse dans de nombreuses études précliniques liées aux tumeurs osseuses primitives (Sarcome d'Ewing [261], Ostéosarcomes [93,251,262], ou aux métastases osseuses (cancer du sein [263], cancer de la prostate [264], cancer du poumon [265] ou myélome multiple [266]) ainsi que dans plusieurs essais cliniques de phase II ou III (voir article en **Annexe 4** : RANK-RANKL signaling in cancer)[184].

Dans les cancers du sein et de la prostate, une vingtaine de marqueurs du remodelage osseux ont été réduits, et ce de façon similaire à un contexte ostéoporotique. Par ailleurs, un délai plus long a été observé en ce qui concerne l'apparition d'un ou plusieurs événement lié au squelette (fracture, compression de la moelle osseuse, douleurs osseuses) [267].

Une comparaison avec les thérapies employant les bisphosphonates démontre la supériorité des traitements utilisant le Denosumab® en ce qui concerne les deux paramètres précédents même si le taux global de survie est équivalent entre les deux thérapies.

Récemment, Cathomas et *coll.* ont décrit un cas clinique intéressant d'un patient atteint d'ostéosarcome traité avec une combinaison de Sorafenib® et de Denosumab® [268]. En effet, chez ce patient dont la tumeur exprime RANK et RANKL, les auteurs ont observé une rémission métabolique complète de plus de 18 mois de cette tumeur, ce qui renforce le potentiel thérapeutique du blocage de la signalisation RANK/RANKL dans l'ostéosarcome. Enfin d'autres essais cliniques complémentaires dans les maladies métastatiques sont en cours et les résultats semblent très informatifs en ce qui concerne l'utilisation du Denosumab® en oncologie.

En conclusion à ce chapitre, il s'avère que les activités de RANKL sont modulées par l'équilibre entre RANKL et ses différents régulateurs moléculaires produits dans le micro-environnement. Ainsi la signalisation RANK/ RANKL semble être impliquée dans chaque étape du développement de la tumeur, du processus de cancérogenèse initial à la mise en place des métastases à distance comme décrite ci-dessous (**Figure 21**). Le ciblage de RANKL dans le cas des tumeurs osseuses primitives semble être prometteur afin de diminuer leur impact sur le micro-environnement. Cependant, de nombreuses études restent à mener afin de mieux comprendre les fonctions de l'axe RANK/RANKL dans le développement des cancers.

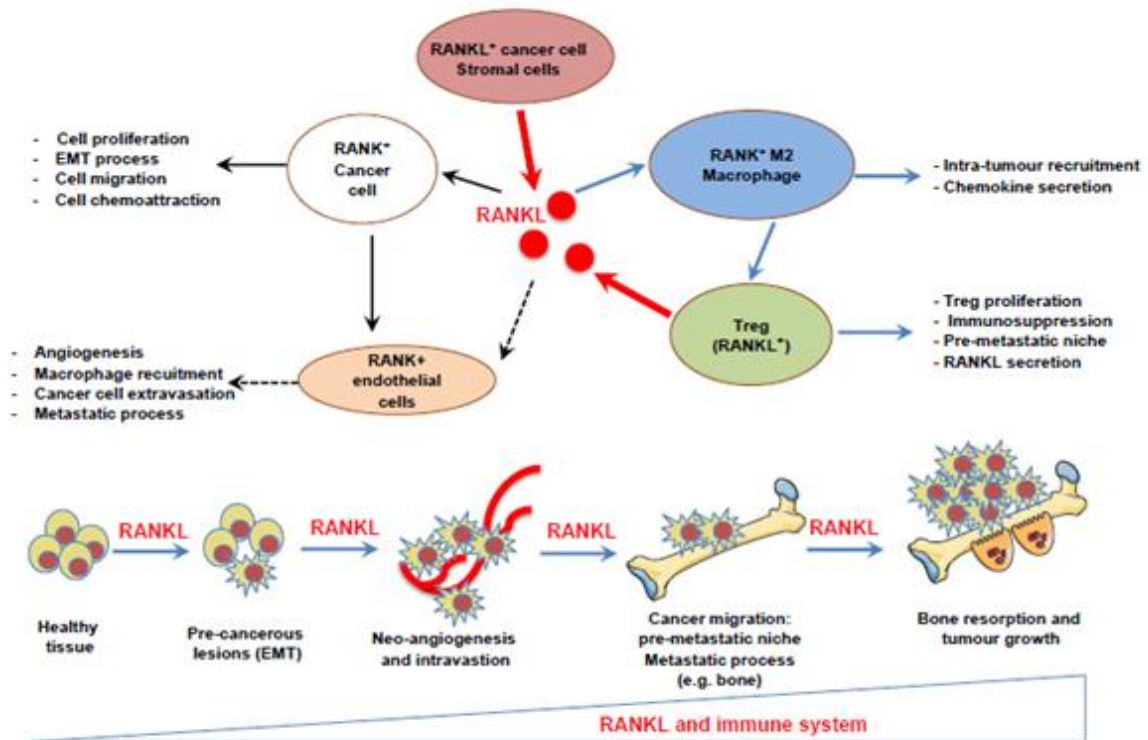


Figure 21 | Implication de la signalisation RANK/RANKL dans les différents stades de la tumorigenèse

D'après Navet et *al.*, 2016 [184]

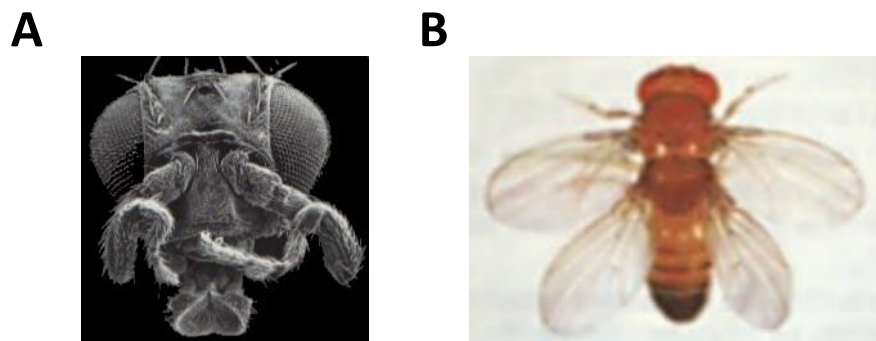
## IV- Les homéogènes *Dlx*

### 1. Généralités sur les homéogènes

#### 1.1. Découverte des homéogènes

Les gènes homéotiques ont été mis en évidence pour la première fois chez la mouche du vinaigre (*Drosophila Megalogaster*) par l'apparition des mutations homéotiques Antennapedia, où le segment antennaire est transformé en segment thoracique, et Ultrabithorax, où le segment thoracique T3 est transformé en segment T2 produisant un insecte à deux paires d'ailes (**Figure 22**) [269–275].

Ceci a conduit à l'isolement des gènes à homéoboîte, ou homéogènes, impliqués dans ces mutations. Grâce à des études d'homologie de séquence avec ces deux premiers gènes, de nombreux autres gènes ont été isolés à partir d'espèces très diverses allant du nématode, au poisson zèbre, au xénope, au poulet, à la souris et à l'homme [276,277]. La séquence homologue qui fut la plus étudiée est l'homéoboîte (183 pb) qui se retrouve dans l'ensemble de ces gènes [272].



**Figure 22 | Mutations homéotiques**

Mutations homéotiques Antennapedia (A) et Ultrabithorax (B) chez la mouche du vinaigre (Photographies de E. B. Lewis et F. R. Turner).



## 1.2. Structure et propriétés biochimiques des homéogènes

### 1.2.1. Structure

L'homéoprotéine codée par l'homéogène comprend une séquence polypeptidique d'environ 64 acides aminés appelée homéodomaine. Cette séquence est relativement conservée entre les différentes familles d'homéoprotéines, au sein de la même espèce, et au cours de l'évolution (**Figure 23**)[278]. L'homéodomaine est composé de la succession, à partir de son extrémité amino-terminale, de deux hélices  $\alpha$ , d'un coude  $\beta$  et d'une troisième hélice  $\alpha$ . Les deux dernières hélices réunies par le coude  $\beta$  forment un motif hélice-tour-hélice [278–280], caractéristique de l'homéodomaine [281].

	1	10	20	30	40	50	60																																																					
Drosophile	R	K	R	G	R	Q	T	Y	T	R	Y	Q	T	L	E	L	E	K	E	F	H	F	N	R	Y	L	T	R	R	R	R	R	E	I	A	H	A	L	C	L	T	E	R	Q	I	K	I	W	F	Q	N	R	R	M	K	W	K	K	E	N
Ver à soie	.....																																100%																											
Abeille	.....																																98%																											
Ver plat	H	S	.....																			K	.....										S	.....										DH	90%															
Oursin	.....										A	.....										Y	.....										K	.....										Q	V	S	.....										R	88%		
Ascidie	S	T	T	A	.....																			Y	.....										S	.....											90%													
Ver némertien	.....																																98%																											
Amphioxus	.....																																98%																											
Grenouille	.....																																98%																											
Poulet	.....																																98%																											
Souris	.....																																98%																											
Homme	.....																																98%																											

**Figure 23 | Alignement des séquences de l'homéodomaine d'Antennapedia de plusieurs espèces**

D'après « la Drosophile aux yeux rouges » Walter Gehring, Editions Odile Jacob.

### 1.2.2. Propriétés biochimiques

L'homéoprotéine se fixe par interaction directe [282] et sous forme monomérique [283] aux éléments de réponse présents sur les promoteurs des gènes cibles dont la séquence est riche en base A et T [273,279,280,282,284]. La troisième hélice, dite hélice de reconnaissance, est le domaine principal de liaison à l'acide désoxyribonucléique (ADN) par insertion dans le grand sillon et établissement de contacts spécifiques via des liaisons hydrogènes et hydrophobes avec les bases [273,281]. Par ailleurs, la seconde hélice interagit avec l'enchaînement des désoxyriboses et des phosphates. D'autres résidus situés dans la partie N terminale de l'homéodomaine forment des contacts avec l'ADN dans le petit sillon. L'homéodomaine permet donc une reconnaissance spécifique et la fixation de l'homéoprotéine sur son élément de réponse, mais il n'intervient pas sur l'activation de la transcription qui est assurée par le reste de la protéine [275] par interaction avec des protéines auxiliaires.

## 2. Les homéogènes de la famille HOX

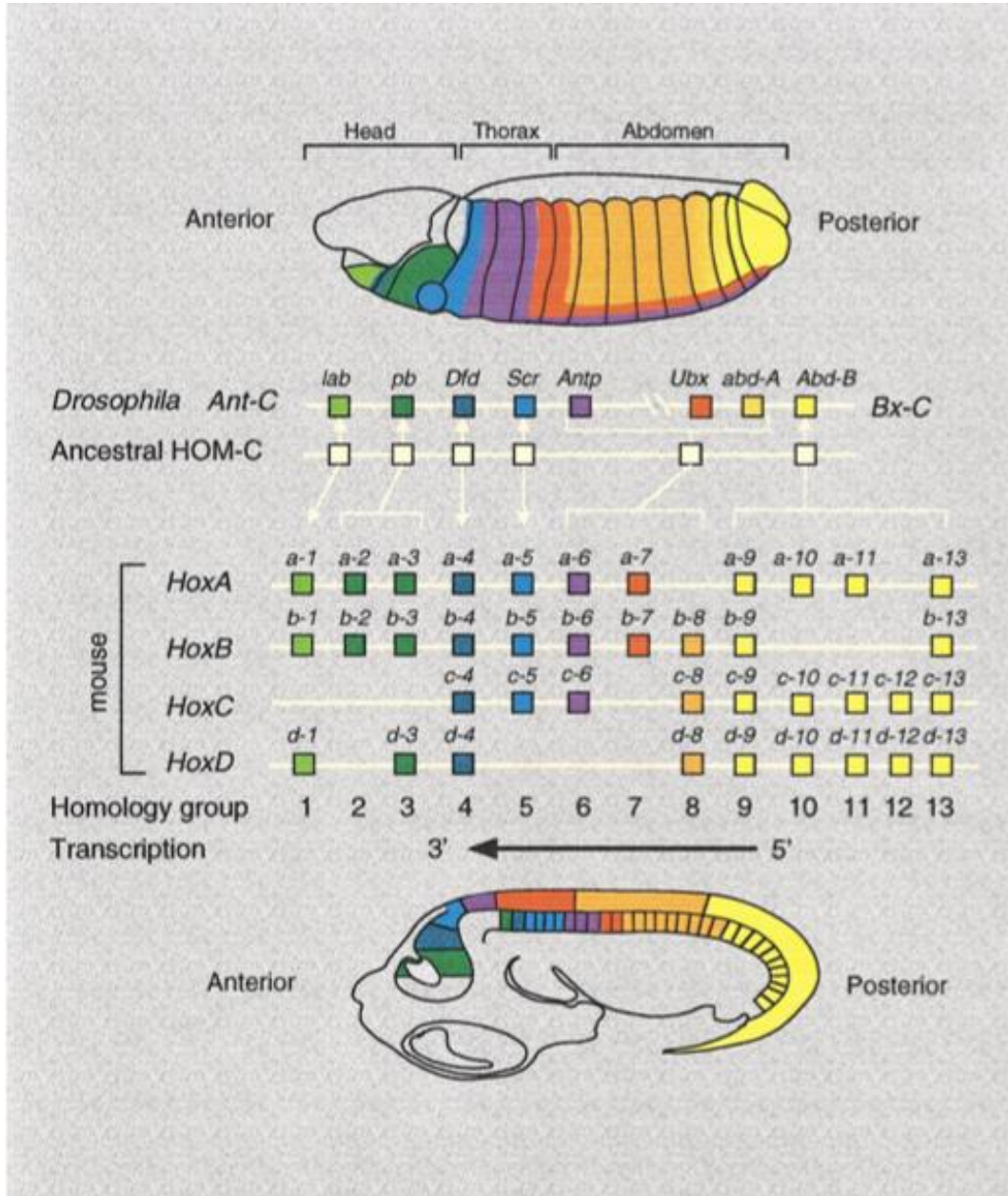
Un certain nombre de gènes homéotiques détermine, par une combinatoire d'expression locale et spécifique appelée code HOX, l'identité de chaque segment suivant l'axe antéro-postérieur du corps. Ces gènes composent chez la drosophile le complexe homéotique HOM-C et chez les vertébrés quatre complexes HOX formés de gènes obtenus très probablement par duplications successives d'un complexe commun avec HOM-C [285]. Les quatre complexes HOX (HOX A à D) sont répartis sur différents chromosomes (**Tableau 9**) et comprennent treize groupes de gènes paralogues [277,286,287]. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription se fixant sur la région promotrice des gènes cibles, en des sites spécifiques (éléments de réponse), via un domaine protéique d'une soixantaine d'acides aminés très conservé au cours de la phylogénèse : l'homéodomaine [273].

	Souris	Humain
HOXA	Chr 6	Chr 7
HOXB	Chr 11	Chr 17
HOXC	Chr 15	Chr 12
HOXD	Chr 2	Chr 2

**Tableau 9 | Localisation chromosomique des quatre séries de gènes HOX chez l'humain et la souris**

D'après Apiou et *al.*, 1996 [287] et Vieille-Grosjean et *al.*, 1997 [277].

Les différents groupes de gènes HOX sont exprimés successivement, le long de l'axe rostro-caudal de l'embryon, selon une séquence qui suit leur position sur chaque chromosome : leur expression obéit de ce fait au principe de colinéarité spatio-temporelle [277,286,288–293](**Figure 24**).

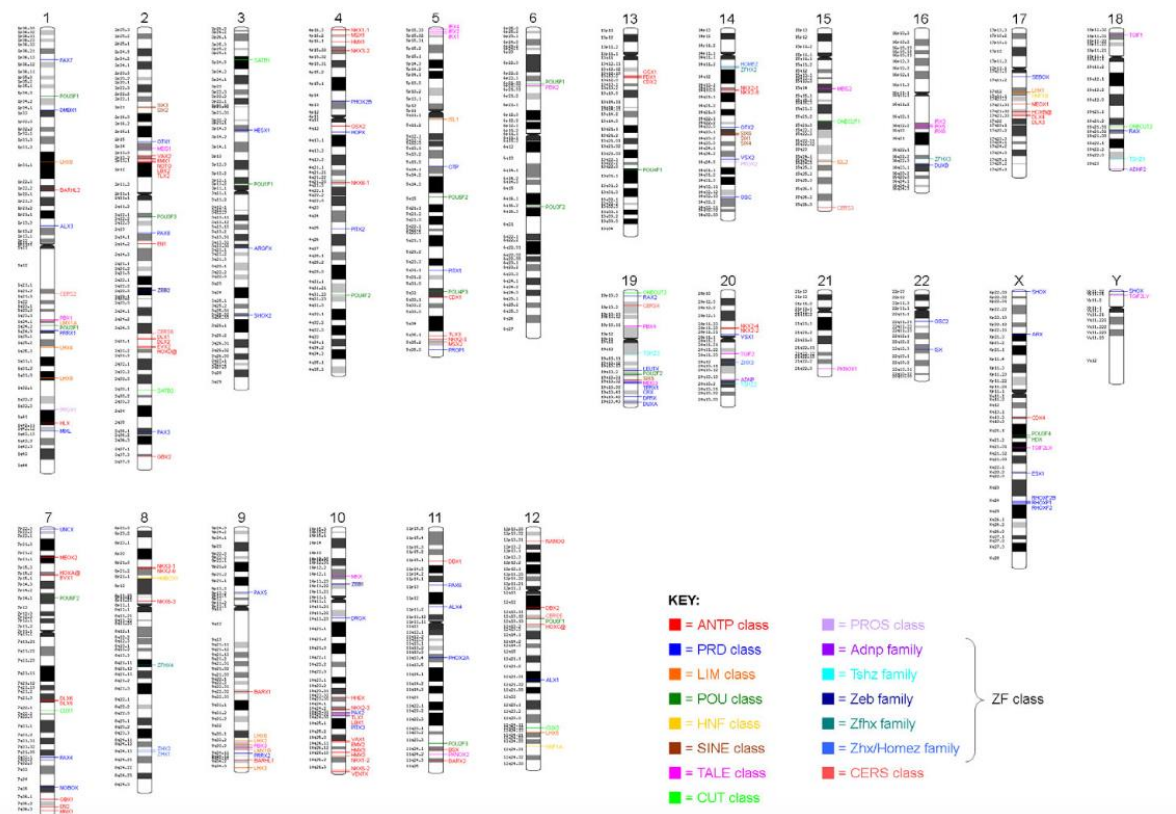


**Figure 24 | Représentation du principe de colinéarité spatio-temporelle**

Les gènes en 3' sont exprimés en premier et dans la partie antérieure de l'embryon alors que ceux en 5' sont exprimés en dernier dans la région postérieure. D'après Carroll S.B. Nature, 1995 [290].

### 3. Les homéogènes n'appartenant pas à la famille HOX : homéogènes divergents

Au cours du temps et avec l'avènement du séquençage des génomes, la famille des homéogènes s'est agrandie considérablement pour aboutir à plus de 250 membres (255 chez l'homme et 279 chez la souris)[294] pouvant être regroupés en 11 classes et répartis sur tous les chromosomes (**Figure 25**) [295].



**Figure 25 | Répartition des homéogènes dans le génome humain**

La répartition des homéogènes a été représentée sur les chromosomes du génome humain. Ces derniers sont mis en avant en fonction de leur classe. D'après Holland et *al.*, BMC Biol., 2007 [295].

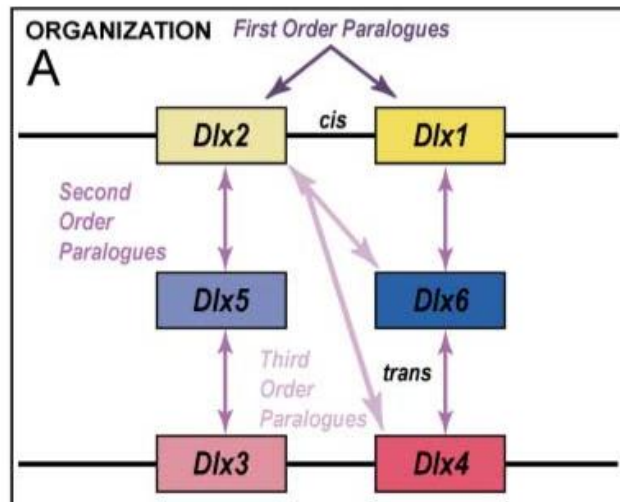
Parmi ces homéogènes, la famille des gènes *Dlx* appartenant à la classe Antennapedia (ANTP) a été identifiée comme importante tout au long du développement du squelette comme explicité ci-après.

## 4. La famille des homéogènes *Dlx*

### 4.1. Les gènes *Dlx* au cours de l'évolution

La haute conservation de l'homéoboîte des gènes *Dlx*, paralogues au sein d'une même espèce, orthologues entre les espèces, plaide en faveur du dédoublement initial d'un gène ancestral *Dll* sur le même chromosome, suivi de duplications chromosomiques successives de cette paire de cis-paralogues conservant la même orientation [296]. L'analyse des séquences des gènes *Dlx*, chez les vertébrés, a permis de mettre en évidence l'organisation de cette famille de gènes en 2 groupes de gènes trans-paralogues (**Figure 26**) [297,298] :

- *Dlx2*, *Dlx3* et *Dlx5*, les plus proches de *Dll*, avec des homéodomaines de séquences homologues à 68%, et conservation de la position du premier intron,
- *Dlx1*, *Dlx4* et *Dlx6* avec des homéodomaines de séquences homologues à 44 % [296].



**Figure 26 | Organisation de la famille *Dlx* avec des gènes trans-paralogues**

La famille des gènes *Dlx* contient des gènes cis et trans-paralogues. D'après Depew et al., 2005 [298].

D'un point de vue phylogénétique, il semblerait que le dédoublement du gène ancestral *Dll* soit apparu après la divergence entre les ancêtres des arthropodes (insectes) et des chordés (vertébrés), mais avant celle des vertébrés et des tuniciers [299]. Quant aux duplications des *Dlx*, qui se seraient faites de concert avec celles des complexes HOX [296], elles seraient apparues avant la bifurcation entre le poisson zèbre et les tétrapodes puisque ce premier possède aussi 3 paires de gènes *Dlx* en position cis-paralogue (« first orderparalogue » sur la **Figure 26**). Cependant la présence chez ce poisson de deux *Dlx* supplémentaires (*Dlx7* et *Dlx8*) disposés aussi en cis-paralogue [297,300,301] pose question : ces deux *Dlx* supplémentaires ont-ils existé

et été perdus chez les vertébrés ou bien sont-ils le fruit de duplications postérieures à la séparation poisson/tétrapodes ?

#### 4.2. Localisation et organisation des gènes *Dlx*

Chez les vertébrés, les gènes *Dlx* sont disposés par paires de cis-paralogues en position antiparallèle. Au sein de chaque paire d'une largeur de 20 à 25 kilobases (kb), les *Dlx* sont étroitement liés, distants uniquement de 10 kb. De plus, chaque paire siège avec un complexe HOX sur le même chromosome.

Pour l'humain :

- *Dlx1* et *Dlx2* : chromosome 2 locus q32 en 5' de HOX D,
- *Dlx5* et *Dlx6* : chromosome 7 locus q22 sur le bras opposé à HOX A,
- *Dlx3* et *Dlx4* : chromosome 17 locus q21 à 1-2Mb en 5' de HOX B [282,302–306].

#### 4.3. Structure des gènes *Dlx*

Le gène *Dll* (*Drosophila*) dont la structure serait la plus proche du gène ancestral est composé de 7 exons et de 5 introns (dont 2 en amont de l'homéoboîte, 1 dans l'homéoboîte et 2 en aval). Par contre tous les gènes *Dlx* sont composés de [302,304,305,307] :

- 3 exons dont les 2 derniers codant pour l'homéoboîte,
- 2 introns dont le second est situé dans l'homéoboîte.

Les modalités de transcription des gènes *Dlx* humains sont variables, allant d'un unique transcrite pour *Dlx2* et *Dlx3*, *Dlx5* et *Dlx6*, à deux transcrits pour *Dlx1* et *Dlx4* (Source Genbank). Une transcription antisens a été mise en évidence chez la souris pour certains de ces gènes (*Dlx1* : [308] ; *Dlx4* : Genbank NR\_040279.1 ; *Dlx6* : [309]).

##### 4.3.1. Structure des protéines DLX

L'homéodomaine est très conservé au sein de la famille des gènes *Dlx* et comprend [283,310] :

- une région de 7 résidus,
- une première hélice  $\alpha$  de 18 acides aminés,
- une seconde hélice  $\alpha$  de 13 acides aminés,

- un coude  $\beta$  de 3 résidus,
- une troisième hélice  $\alpha$  de 19 acides aminés.

La séquence du motif hélice-tour-hélice est très conservée dans cette famille [299]. Une légère variabilité de séquence au niveau de la première hélice et de la zone charnière entre les deux premières hélices permet de distinguer les membres de la famille *Dlx* et les singularise des autres familles d'homéoprotéines [299]. Par ailleurs il existe d'autres zones relativement conservées au sein de la famille *Dlx* :

- Les extensions de l'homéodomaine (EHD) qui bordent celui-ci [311],
- Les régions d'homologie des *Dlx* (RHD 1 et 2) dans la partie N terminale de l'homéoprotéine [283,300].

#### 4.3.2. Propriétés biochimiques des DLX

Comme toutes les homéoprotéines, les DLX se fixent sur des séquences d'ADN riches en bases A et T. Les homéoprotéines DLX1, DLX2 et DLX5 se fixent sur la même séquence nucléotidique 5' TAATT 3' qui se retrouve par exemple dans le promoteur de l'ostéocalcine, de la sialoprotéine osseuse et de *Dlx2* [312,313].

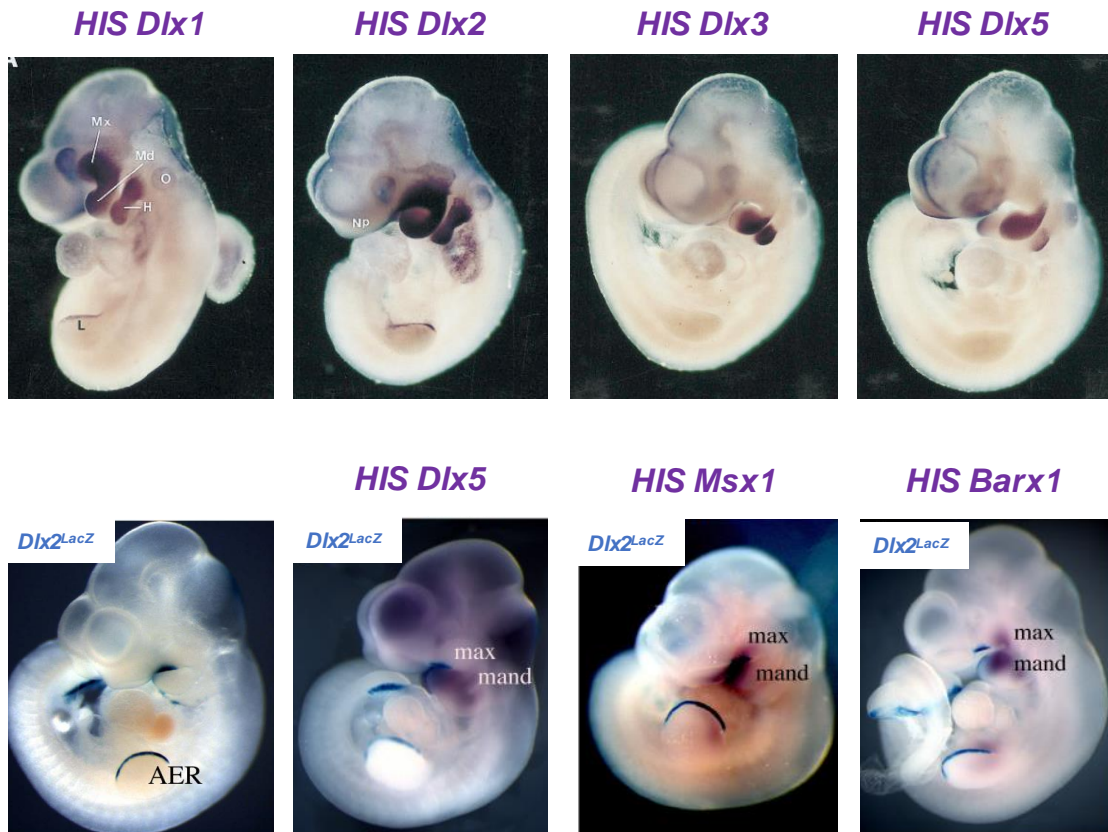
Les protéines DLX peuvent former des homodimères mais aussi des hétérodimères avec d'autres homéoprotéines (MSX principalement) via les résidus de la séquence N-terminale et des premières et troisièmes hélices de l'homéodomaine. Comme ces hélices sont requises pour la fixation sur l'ADN, la formation d'hétérodimère conduit à la neutralisation réciproque de leur activité transcriptionnelle [283].

### 4.4. Fonctions de l'homéogène *Dlx* au cours du développement du squelette

#### 4.4.1. Au cours de l'embryogenèse

La cartographie d'expression au cours du développement embryonnaire a été réalisée pour de nombreux homéogènes dont les *Dlx* (**Figure 27**) [311,314–326]. Concernant les ébauches squelettiques, les homéogènes *Dlx* sont principalement exprimés dans les bourgeons des membres et les bourgeons craniofaciaux (**Figure 27**).



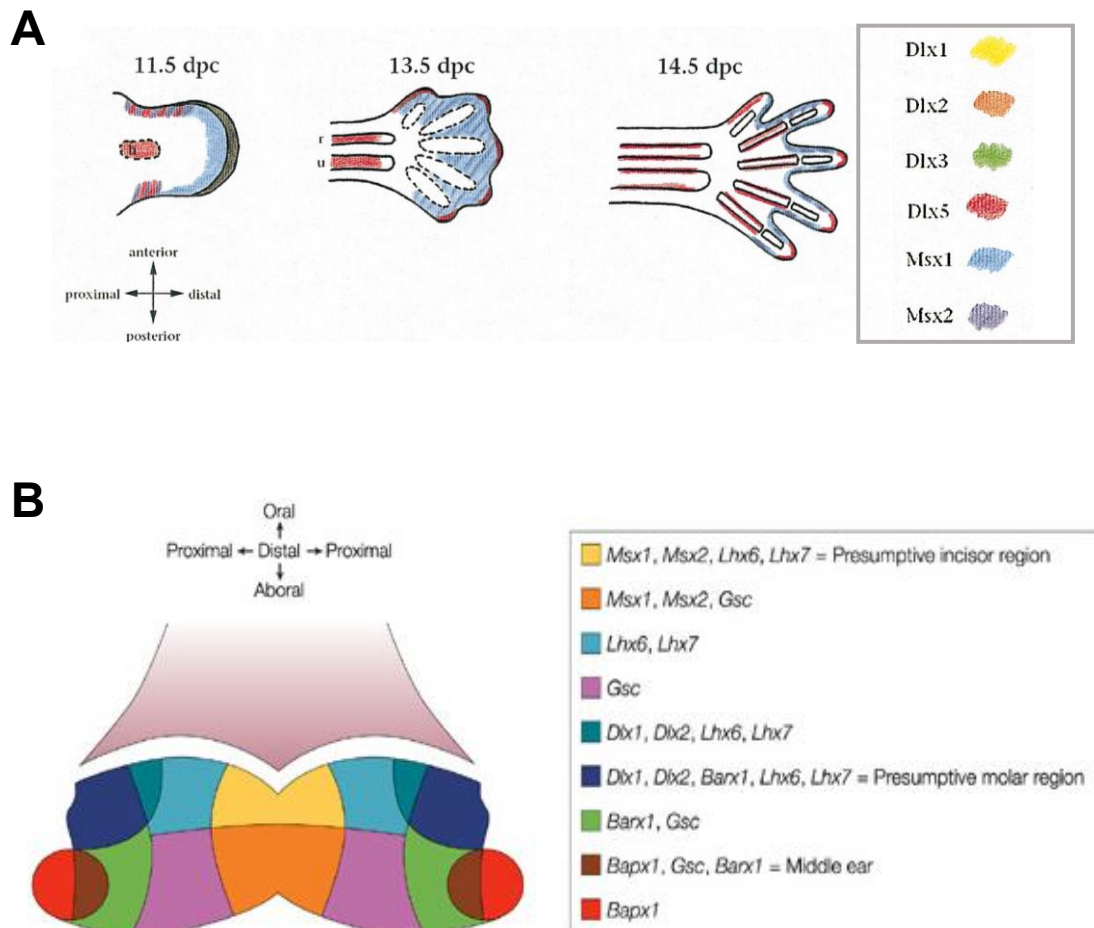


**Figure 27 | Mise en évidence de l'expression d'homéogènes**

Exemple de mise en évidence de l'expression des *Dlx* et d'autres homéogènes au cours du développement embryonnaire (E10.5 présenté) par hybridation in situ (HIS) et gène rapporteur (*LacZ* pour *Dlx2*) d'après Panganiban et Rubenstein 2002, et Thomas et Lézot (non-publié). A ce stade une expression différentielle des *Dlx* au niveau de l'ébauche maxillaire supérieure (Mx) est évidente (*Dlx1* et *Dlx2* sont présents et *Dlx3* et *Dlx5* sont absents) alors que tous sont présents au niveau de l'ébauche mandibulaire (Md). A ce stade une expression de *Dlx2* dans l'AER (« Apical Ectodermal Ridge ») du bourgeon de membre est aussi clairement visible.



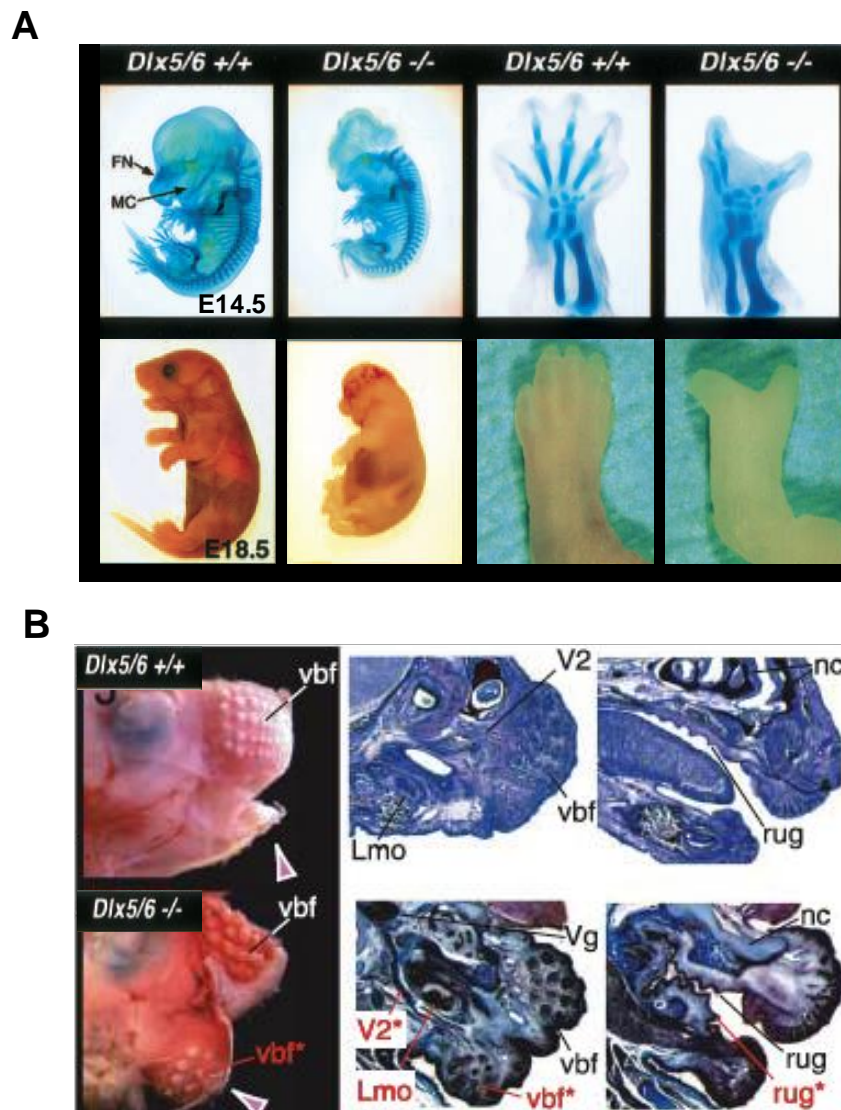
Au sein de ces ébauches, les homéogènes *Dlx* avec d'autres homéogènes constituent, de par leurs expressions finement régulées dans le temps et dans l'espace, des champs morphogénétiques [298,327–332] qui rappellent grandement le code HOX (**Figure 28**). D'ailleurs certains gènes HOX participent à la définition des champs morphogénétiques au sein du bourgeon de membre [333].



**Figure 28 | Représentations des différents champs morphogénétiques formés par la combinatoire d'expression des homéogènes**

(A) dans le bourgeon de membre et (B) dans le bourgeon mandibulaire à E10.5. D'après Bendall et Abate-Shen, 2000 [327], et Tucker et Sharpe 2004 [331].

Cette fonction morphogénétique des *Dlx* est confirmée par l'analyse des mutants nuls combinés de plusieurs *Dlx*, des redondances fonctionnelles existant entre ces gènes [298], ou d'un *Dlx* avec un homéogène de la famille *Msx* [334–336]. Ainsi le double mutant *Dlx1/Dlx2* présente une absence (agénésie) des molaires supérieures avec fente palatine [317,318,337,338], le double mutant *Dlx5/Dlx6* combine une oligodactylie plus une syndactylie et une transformation homéotique de la mandibule en maxillaire supérieure (**Figure 29**) [298,339–343] et le double mutant *Dlx5/Msx1* une syndactylie, des défauts du palais et des os du crâne [334–336].



**Figure 29 | Phénotype squelettique de la souris doublement invalidée pour *Dlx5* et *Dlx6***

(A) L'oligodactylie (doigts manquants) et la syndactylie (fusion de doigts) sont clairement visibles dès E14.5 chez le double mutant. (B) Le double mutant présente une transformation homéotique de la mandibule en maxillaire avec présence des vibrisses, absence de la langue et mise en place d'un processus pseudo-palatin. D'après Robledo *et al.*, 2002 [340], et Beverdam *et al.*, 2002 [339].

#### 4.4.2. Au cours de la croissance squelettique

La majorité des mutations nulles pour les homéogènes *Dlx* étant létales à la naissance [298], l'analyse des implications tardives de ces gènes pendant la croissance s'est appuyée principalement sur des études *in vitro* et sur les profils d'expression de ces gènes *in vivo* établis soit par des techniques classiques (hybridation *in situ* et immunohistochimie) soit à l'aide de souris transgéniques à gène rapporteur LacZ, plus spécifiquement les souris *Dlx2/LacZ* [344], *Dlx3/LacZ* [345] et *Dlx5/LacZ* [346,347]. Les mutations humaines rapportées pour les homéogènes *Dlx3* (syndrome TDO) [306,348] et *Dlx5* (syndrome SHSF) [349–351] ont aussi été informatives sur les rôles des gènes *Dlx* dans la croissance squelettique ainsi que les modèles de surexpressions ciblées de *Dlx2* [352], de *Dlx3* muté [353,354], et d'inactivation conditionnelle de *Dlx3* [355–357].

Globalement, deux fonctions ont pu être associées à l'expression des gènes *Dlx* dans les diverses cellules formant les tissus minéralisés (ostéoblastes, chondroblastes, améloblastes, odontoblastes, cémentoblastes sans oublier les ostéoclastes). En premier lieu, les protéines DLX (avec leurs partenaires privilégiés MSX) participent au contrôle de la différenciation cellulaire en régulant et/ou interagissant avec les gènes clefs de la différenciation comme *Runx2* [358,359] et Osterix [360], des éléments du cycle cellulaire comme la cycline-D1 [361–363] et certains membres de la famille Melanoma-associated antigen D (MAGE-D) dont *Dlxin-1* [364–366]. Ensuite les protéines DLX modulent l'expression des principales protéines impliquées dans la minéralisation, par exemple l'ostéocalcine de l'os [367] et de la dentine [368], le collagène de type 2 du cartilage [369] et l'amélogénine de l'émail [337]. Une expression spécifique de site des protéines DLX (et MSX) dans les cellules sécrétant les tissus minéralisés a été observée et montrée constituer un déterminant majeur de l'organogenèse des unités squelettiques osseuses et dentaires [324,337,354,370–378].

##### 4.4.2.1. *Dlx* et formation osseuse

###### a. Expression des *Dlx* au cours de l'ostéoblastogenèse

Concernant les cellules ostéoblastiques qui nous intéressent plus particulièrement, l'expression de certains gènes *Dlx* (*Dlx2*, *3*, *5* et *6*) a été établie avec une spécificité de stade au cours de l'ostéoblastogenèse [1,13]. Comme présenté dans la **Figure 30**, *Dlx2* est le gène exprimé le plus précocement et transitoirement alors que *Dlx3*, qui s'exprime plus tardivement, a

une expression maintenue dans les cellules pleinement différenciées. Une absence totale d'expression de *Dlx1* et *Dlx4* est à noter.

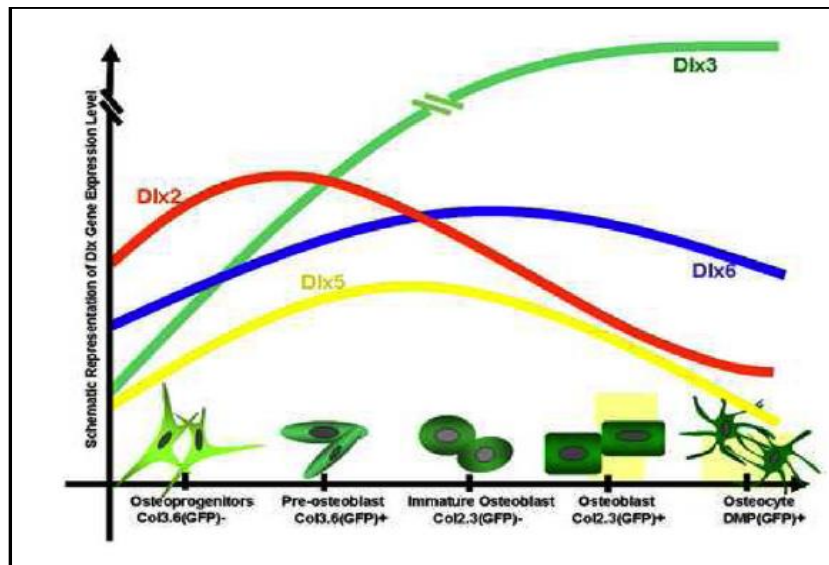


Figure 30 | Expression des différents *Dlx* au cours de l'ostéoblastogenèse

D'après Li et al., 2008 [1].

b. Fonctions des *Dlx* au cours de la formation osseuse

Comme énoncé précédemment (chapitre I, §1), il existe plusieurs processus primaires d'ossification dont les deux principaux sont l'ossification endochondrale et l'ossification membranaire. Les données relatives aux fonctions des gènes *Dlx* au cours de la formation osseuse vont ainsi être présentées en deux parties correspondant à ces deux processus.

- Fonctions des *Dlx* dans les ostéoblastes d'os de membrane (ossification membranaire)

La différenciation des cellules osseuses provenant d'os issus d'une ossification membranaire comprend plusieurs stades transitionnels identifiables par l'expression de marqueurs phénotypiques. Le collagène de type I et la phosphatase alcaline sont des marqueurs des stades précoces de la différenciation ostéoblastique, alors que l'expression de l'ostéocalcine et la minéralisation de la matrice osseuse sont des traits de la différenciation terminale (**Figure 31**). Runx2 (avec sa sous-unité Cbfb) et Osterix sont deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéoblastique [13–16,18,19] (**Figure 31**). Plusieurs travaux relatifs aux interrelations entre les homéoprotéines DLX et ces facteurs de transcription ont été menés dans

différents modèles de cultures ostéoblastiques, principalement la culture primaire de calvaria et les lignées de cellules ostéoblastiques en grande majorité issues d'ostéosarcomes [357,359,367,379–381]. Le promoteur de l'ostéocalcine a, dans la grande majorité des cas, été utilisé comme matrice pour l'analyse de ces interrelations. Au niveau fonctionnel, la surexpression de l'homéogène *Dlx3* [379] et de l'homéogène *Dlx5* [313] dans la cellule ostéoprogénitrice stimule l'apparition de l'ostéocalcine et de d'autres marqueurs ostéogéniques [382–386]. Inversement, l'inhibition de l'expression des transcrits de *Dlx5* diminue l'apparition de l'ensemble de ces marqueurs ostéogéniques. Parallèlement, il a été rapporté que, dans les os de membrane de souris transgéniques *Dlx5*<sup>-/-</sup>, la maturation des ostéoblastes était retardée [298,387].

Chez l'homme, la délétion de quatre paires de bases dans la séquence de *Dlx3*, responsable du syndrome tricho-dento-osseux (TDO), induit un épaissement des os du crâne [306,348]. Cette délétion rendrait la protéine DLX3 incapable d'activer la transcription [355,356,388] et confirme que les homéoprotéines DLX sont nécessaires à la maturation des ostéoblastes.

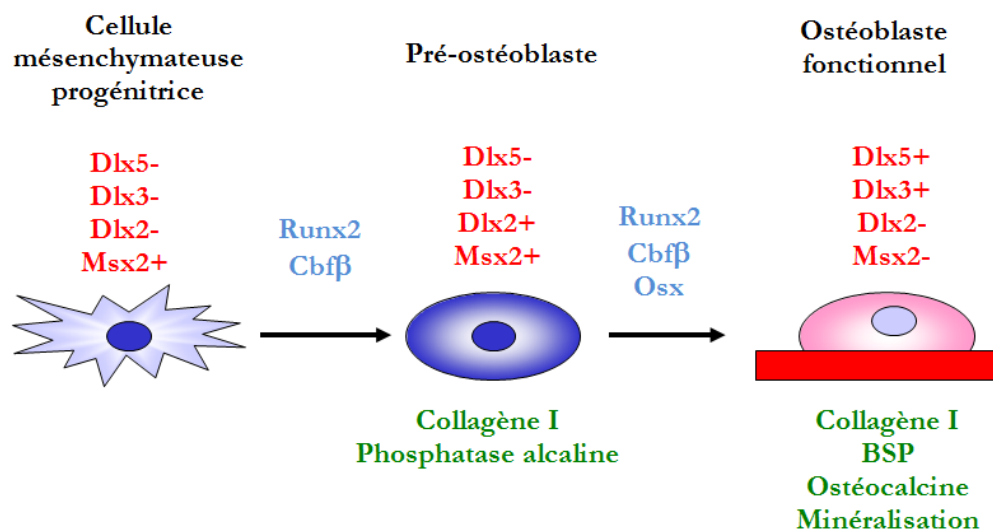


Figure 31 | Expressions relatives des homéogènes *Dlx*, de leurs partenaires *Msx2*, *Runx2*, *Osx* et des marqueurs phénotypiques au cours de la différenciation ostéoblastique

Adapté d'après Nakashima et Crombrughe, 2003

Comme précisé ci-dessus, la majorité des études ont utilisé le gène de l'ostéocalcine comme marqueur de la maturation ostéoblastique. Le promoteur de ce gène contient plusieurs motifs de liaison (éléments de réponse) pour les protéines à homéodomaine. Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que DLX5 réprimait le gène de l'ostéocalcine [21,313]. Cependant, d'autres études ont rapporté à l'inverse une activation transcriptionnelle de l'ostéocalcine par DLX5 en utilisant d'autres constructions de promoteurs [22,389]. Finalement il s'avère que selon le stade de différenciation cellulaire considéré, d'une part les homéoprotéines DLX (et leur partenaire MSX) se lient séquentiellement au promoteur de l'ostéocalcine, et d'autre part leur activité de stimulation ou d'inhibition soit différente. C'est ainsi que les études de Hassan [379] ont pu démontrer que MSX2 réprimait l'expression de l'ostéocalcine pendant les stades prolifératifs, puis que le promoteur de l'ostéocalcine était ensuite occupé par DLX3, DLX5 et RUNX2 dans les stades post-prolifératifs, l'occupation de DLX5 sur ce promoteur étant maintenue jusqu'aux stades de minéralisation contrairement à celle de DLX3 [379]. Cette étude a par ailleurs mis en évidence que la formation d'hétérodimères entre la protéine RUNX2 et les homéoprotéines DLX3, DLX5 et MSX2 pouvait inhiber la transcription de l'ostéocalcine aux stades tardifs de différenciation. Récemment, l'existence d'interactions directes de type cofacteurs entre les homéoprotéines DLX et OSX a été mise en évidence et a été démontrée comme étant impliquée dans la spécification ostéoblastique [360].

Les homéoprotéines DLX semblent donc jouer des rôles importants dans la différenciation des cellules osseuses en contrôlant l'expression des marqueurs phénotypiques en conjonction avec les facteurs de transcription clef de l'ostéoblastogenèse que sont RUNX2 et OSX.

- Fonctions des *Dlx* dans les ostéoblastes d'os long (ossification endochondrale)

L'ossification endochondrale passe par plusieurs étapes : la formation des blastèmes pré-cartilagineux et leur chondrification, l'ossification diaphysaire et l'ossification épiphysaire. L'expression des homéogènes *Dlx5* et *Dlx6* est retrouvée dans toutes les condensations chondrogéniques embryonnaires ainsi que dans les phases de chondrogenèse survenant lors de la mise en place du squelette [302,319,390,391].

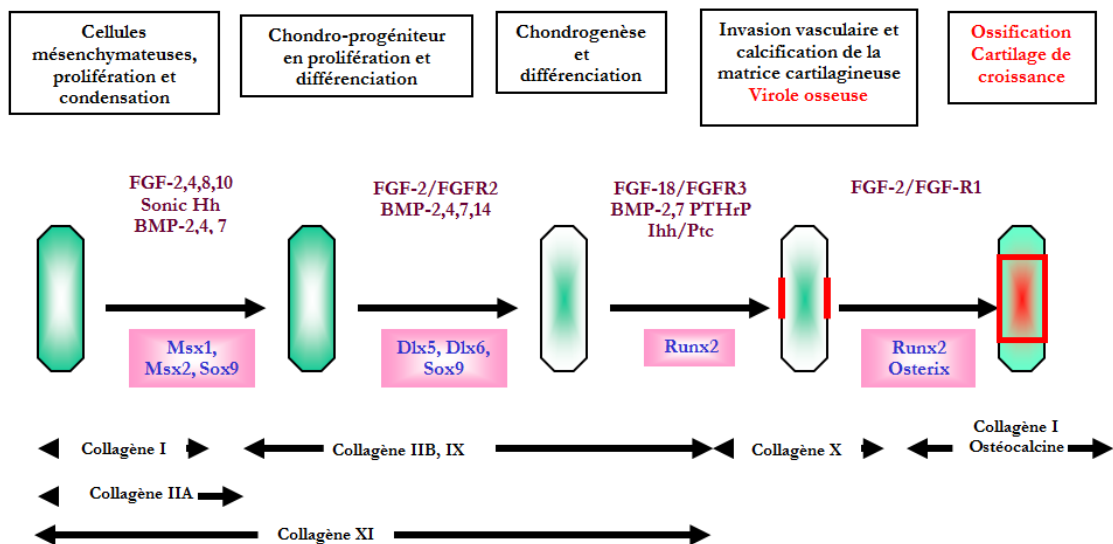


Figure 32 | Facteurs de croissance, facteurs de transcription et molécules matricielles exprimés au cours du développement des os longs

Adapté d'après Goldring et al., 2006

Dès que commence l'invasion vasculaire et la calcification de la matrice cartilagineuse, les cellules cartilagineuses entament un programme de maturation où s'expriment des homéogènes *Dlx* et leurs partenaires *Msx*.

D'un point de vue cytotologique, l'ossification endochondrale s'accompagne d'une maturation chondrocytaire passant d'un stade de chondrocyte prolifératif, à un stade de chondrocyte pré-hypertrophique, à un stade de chondrocyte hypertrophique (Figure 33). La minéralisation de la matrice cartilagineuse est alors suivie d'un remaniement osseux. Les principaux mécanismes de régulation impliqués dans la progression de cette maturation cellulaire font intervenir les voies de signalisation de IHH, des BMP, des FGF ou encore du PTHrP [392–396]. Des études ont suggéré que les homéogènes *Dlx* [369] et *Msx* [397] soient des cibles de la voie BMP lors de la régulation de la chondrogenèse. La surexpression de l'homéogène *Msx1*, par exemple, inhibe la chondrogenèse ou l'ostéogenèse que ce soit *in vitro* sur des modèles de culture cellulaire ou *in vivo* [398]. *Msx1* est aussi capable d'induire la transdifférenciation des myotubes en culture vers la voie chondrogénique, ostéogénique ou encore adipocytaire [399]. Aussi, l'expression du collagène de type II dans les chondrocytes est stimulée par BMP2 via l'homéogène *Dlx2* [369]. L'homéogène *Dlx5* est exprimé dans les zones de cartilage hypertrophique et dans les chondrocytes prolifératifs [400]. *Dlx5* est aussi exprimé avec *Dlx6* au niveau

du périchondre et du périoste du squelette axial ainsi que dans les ostéoblastes de la métaphyse [21].

Chez les souris invalidées pour *Ihh*, il n'y a ni ostéoblastes différenciés dans les formations endochondrales ni expression de RUNX2 au niveau du périchondre ou du périoste. Chez les souris invalidées pour *Runx2*, il y a inhibition de la différenciation des chondrocytes hypertrophiques [18,401]. Ainsi, il a été suggéré qu'*Ihh* agirait par trois mécanismes :

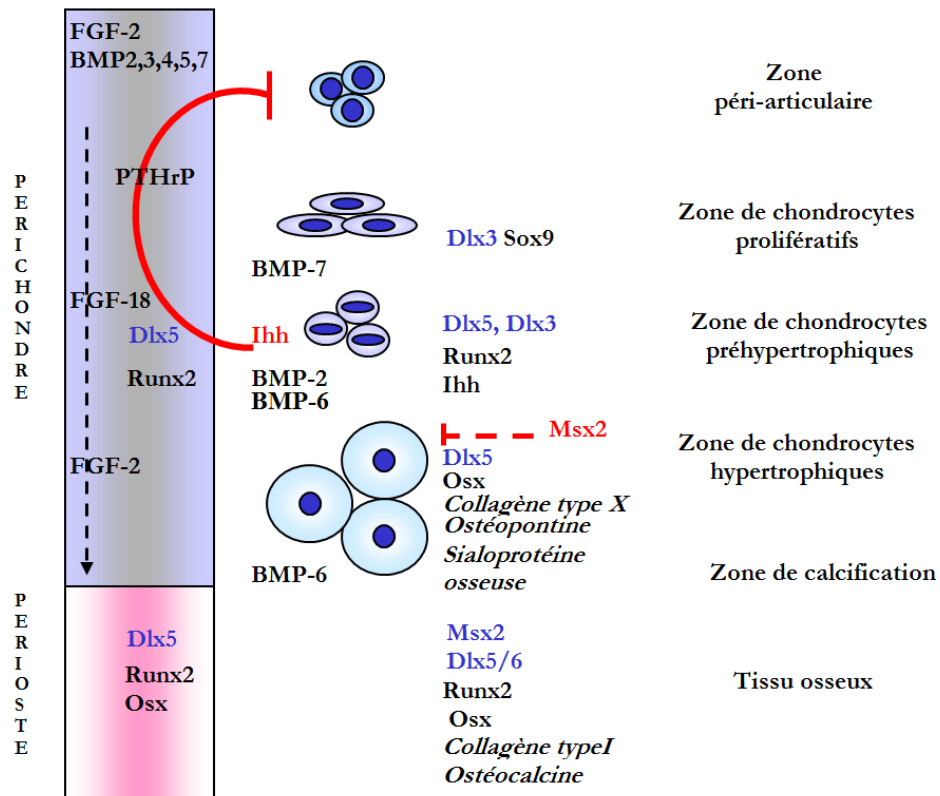
- il induirait la différenciation des ostéoblastes ;
- il serait responsable de l'expression de *Runx2* ;
- et il régulerait enfin l'expression de PTHrP (parathyroid-hormone-related peptide) contrôlant ainsi le taux de chondrocytes prolifératifs devenant hypertrophiques [402].

L'homéoprotéine DLX5 est un régulateur positif de la différenciation chondrocytaire [373,386,400,403] et osseuse [347,373,386,389]. Une analyse plus fine des os longs chez les souris doublement mutées *Dlx5*<sup>-/-</sup> et *Dlx6*<sup>-/-</sup> montre un retard dans le programme de différenciation des chondrocytes puisque les auteurs décrivent une prédominance des chondrocytes préhypertrophiques. Un retard temporel dans l'expression de *Ihh* est aussi noté alors que l'expression de PTH/PTHrP ne semble pas être affectée dans ces souris doublement mutées [298]. Une forme humaine d'ectrodactylie (Split-hand/split-foot SHSF malformation), pathologie autosomique dominante caractérisée par l'absence ou la fusion des doigts avec la présence de fentes palmaires médianes, a été reliée à la région du locus *Dlx5/6* [404], comme présenté plus loin (§4.5).

L'homéoprotéine MSX2 a par contre été impliquée dans la répression de la différenciation ostéoblastique et chondroblastique [405–407]. Les souris invalidées pour *Msx2* présentent ainsi des anomalies de développement des os longs subissant normalement une ossification endochondrale avec une diminution de l'expression de *IHH*. Ces os longs au niveau du squelette axial et appendiculaire montrent une diminution de la signalisation PTH/PTHrP ainsi que des marqueurs de différenciation ostéogénique (*Runx2*, phosphatase alcaline, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine)[408]. Cependant, une autre étude plus poussée a démontré que l'homéoprotéine MSX2 inhibait bien la différenciation précoce des chondrocytes au stade primaire, mais favorisait au contraire la maturation des chondrocytes hypertrophiques, ainsi que la



calcification en contrôlant l'expression de IHH [409]. Ces données suggèrent un rôle complexe de *Msx2* dans la différenciation chondrocytaires.



**Figure 33 | Régulation de la maturation des cellules cartilagineuses lors de l'ossification endochondrale**

Adapté d'après Goldring et al., 2006

Pour conclure, l'expression des homéogènes *Dlx* est clairement associée à la chondrogenèse et à la différenciation des ostéoblastes ainsi qu'à la maturation des chondrocytes. L'expression de leurs partenaires les homéogènes *Msx* semble davantage liée à l'inhibition de la différenciation terminale des cellules.

#### 4.4.2.2. *Dlx* et résorption osseuse

Au cours de la croissance du squelette, l'expression de certains gènes *Dlx* (*Dlx1*, 2, 5 et 6) a aussi pu être établie dans les cellules d'origine hématopoïétique résorbant l'os que sont les ostéoclastes [344]. *In vivo*, une spécificité de site et/ou de stade (croissance exclusivement) a pu être observée concernant l'expression ostéoclastique de ces gènes et de leurs partenaires *Msx* [344,375,410,411]. *In vitro*, une expression croissante de *Dlx1* et de *Dlx2* au cours de l'ostéoclastogenèse induite par RANKL a été montrée dépendante de l'environnement osseux

et en relation directe avec la vitesse d'obtention d'ostéoclastes matures [344]. Ces observations *in vitro* suggèrent l'existence d'une connexion entre homéoprotéines DLX et voies de signalisation RANK au cours de l'ostéoclastogenèse et potentiellement dans les cellules ostéoblastiques tumorales connues pour avoir une expression anormale de RANK.

Il est intéressant de noter que l'expression des homéogènes *Dlx* dans les cellules ostéoblastiques impacte l'ostéoclastogenèse en particulier en modulant le ratio d'expression de RANKL et OPG [347].

#### 4.5. Homéogènes *Dlx* et pathologies

##### 4.5.1. Pathologies non-cancéreuses

Concernant le locus *Dlx1/Dlx2*, une association entre des polymorphismes d'un nucléotide (SNPs) dans ou à proximité des gènes et la susceptibilité à l'autisme (AUTS5, OMIM #606053) a été rapportée [412]. Ainsi dans un échantillon de 138 familles (multi-membres) avec cas d'autisme, l'allèle T du SNP rs4519482 à proximité de *Dlx2* a pu être significativement ( $p=0.0046$ ) associé à l'autisme. Cette association a été confirmée dans un second échantillon de 169 familles ( $p=0.0005$ ). Dans la combinaison de ces deux échantillons, les SNPs rs788172, rs788173 et rs813720 dans ou à proximité du gène *Dlx1* sont aussi ressortis associés à l'autisme (valeurs de  $p$  comprises entre 0.0005 et 0.016).

Concernant le locus *Dlx3/Dlx4*, deux délétions dans le gène *Dlx3*, une de 4 paires de bases (g3198delGGGG ; [306]) et une de 2 paires de bases dans l'homéoboîte (560delCT ; [413,414]) sont responsables du syndrome Tricho-Dento-Osseux (TDO, OMIM #190320) alors qu'une délétion d'une paire de base (546delG ; [415]) dans le gène *Dlx4* a été associée à une fente labiale et palatine bilatérale (OFC15, OMIM #616788).

Concernant le locus *Dlx5/Dlx6*, une mutation autosomique dominante dans le gène *Dlx5* (Q178P ;[349]) est responsable de la malformation Split-Hand/Foot avec perte de l'audition (SHFM1D, OMIM #220600) et deux mutations distinctes (Q186H et E39X ; [350,351]) sont responsables de la malformation Split-Hand/Foot de type 1 (SHFM1, OMIM #186300).

#### 4.5.2. Pathologies cancéreuses

##### 4.5.2.1. Expression des *Dlx* dans les cancers non-osseux

Une analyse détaillée de la littérature révèle une expression anormale d'un ou plusieurs gènes *Dlx* dans les cancers du sang (leucémies, lymphomes et myélomes : *Dlx2-3-4-5-6*)[416–424], du sein (*Dlx2-4-5-6*)[419,425–431], du poumon (*Dlx1-4-5*)[423,432–434], de la prostate (*Dlx1-2-4*)[435,436], du colon (*Dlx4*)[437], dentaires (*Dlx2-3-4*)[438,439], neurologiques (glioblastome : *Dlx2*)[440], testiculaires (*Dlx6*)[441], chorioniques (*Dlx4*)[442–444] et ovariens (*Dlx4*)[445,446]. L'origine de cette expression anormale demeure inconnue dans la plupart des cas.

De plus, des méthylations aberrantes des homéogènes *Dlx* ont été mises en évidence dans les cancers du sang (*Dlx3*)[420], du sein (*Dlx4*)[447], du poumon (*Dlx1*)[448] et des testicules (*Dlx6*)[441], de même que dans les cancers du sang la présence de réarrangements chromosomiques à proximité des loci des clusters *Dlx* (lymphomes : locus *Dlx5-Dlx6* ; leucémies : loci *Dlx1-Dlx2* et *Dlx3-Dlx4*)[418,449].

Concernant l'implication des gènes *Dlx*, avec leur partenaires *Msx*, dans la croissance tumorale, les résultats publiés sont très disparates néanmoins ils peuvent être divisés en deux catégories. Premièrement ces homéoprotéines via leurs interactions avec certains oncogènes (*AKT2*[423]; *IRS-2*[446]; *P53* [450]; *P63* [451]; *V-Ki-ras* [452]; *v-raf* [452]; *GATA-1* [416]; *c-myc* [416,421]; *Bcl-2* [421,453]; *TWIST*[431]; *DLXIN*[454–457]), et leur capacité à moduler des voies de signalisation (*BMP*[458]; *FGF*[445]; *Hh*[459]; *Wnt* [460,461]; *TNF $\alpha$*  [462]; *vegf* [445]; *cyclin D1*[463]) peuvent agir sur les processus de prolifération, différenciation et apoptose dans la cellule tumorale. D'autre part, ces homéoprotéines peuvent être impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractéristique de certains cancers : sein [431,464], estomac [461] et pancréas [465]. La TEM est considérée comme une étape cruciale pour le processus de migration métastatique vers l'os [466,467]. La question de l'implication des homéogènes *Dlx* dans les processus de métastases osseuses est ainsi posée.

##### 4.5.2.2. Expression des *Dlx* dans les cancers osseux

###### a. Métastases osseuses : tumeurs osseuses secondaires

L'expression des gènes à homéoboîte *Dlx* dans les métastases osseuses a été uniquement rapportée pour les tumeurs du sein [430,431]. Une expression élevée de *Dlx4* dans les

tumeurs primaires a été établie comme un facteur augmentant la migration, l'invasion et la dissémination métastatique en augmentant l'expression de TWIST qui est connue pour stimuler la TEM [431]. De manière intéressante, la surexpression de la Beta-Protein 1 (BP1), la protéine codée par le second transcrite de l'homéogène *Dlx4*, dans les tumeurs primaires des patients n'est pas associée à une augmentation du risque métastatique mais elle est clairement associée avec le grade histologique [419]. Ainsi ces deux protéines pourraient avoir des implications différentes dans la tumorigenèse malgré qu'elles contiennent toutes les deux la séquence complète de l'homéodomaine. Des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre une telle implication différentielle de ces deux protéines.

Une autre étude portant sur l'implication des homéogènes *Dlx* a mis en évidence le fait qu'une expression mutuellement exclusive des homéoprotéines DLX2 et DLX5-6 était associée au potentiel métastatique des cellules du cancer du sein [430]. Ainsi, l'expression de DLX2 est présente au site de la tumeur primaire et s'éteint dans la métastase alors que DLX5 et DLX6 sont fortement exprimés dans la métastase. De plus une corrélation significative entre l'expression de *Dlx2*, le temps de survie sans maladie et l'incidence des rechutes a été rapportée [430]. Cependant, un tel effet bénéfique de l'expression de DLX2 dans la cellule tumorale doit être pris avec précaution puisqu'il a été suggéré que DLX2 puisse être impliqué dans la progression tumorale via la régulation du processus de nécrose induite par le stress métabolique [468]. Des études complémentaires seront nécessaires pour décrypter les bons et les mauvais aspects de l'expression des homéoprotéines DLX lorsque l'on considère les capacités métastatiques des cellules tumorales.

#### b. Tumeurs osseuses primitives

De manière surprenante, alors que les schémas d'expression et les fonctions des homéogènes *Dlx* ont été largement étudiés au cours de l'ostéoblastogenèse et dans l'ostéoblaste mature, une seule étude a considéré l'expression/fonction de ces gènes dans les tumeurs osseuses primitives. Cette étude dédiée à la régulation de la sclérostine par les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) rapporte l'expression des *Dlx2-3-4-5-6* dans la lignée d'ostéosarcome humain Saos-2. Les homéoprotéines codées, à l'exception de DLX4, ont été montrées modulées par les BMPs, et réguler l'expression de la sclérostine. Aucun commentaire ne fut fait concernant l'expression inattendue des transcrits de *Dlx4* dans ces cellules ostéoblastiques tumorales. En effet, comme mentionné précédemment, *Dlx1* et *Dlx4* ne sont pas normalement exprimés au cours de l'ostéoblastogenèse [469].

# **OBJECTIFS DE LA THESE**

La prise en charge thérapeutique des ostéosarcomes repose actuellement sur une polychimiothérapie pré et postopératoire associée à une exérèse chirurgicale plus ou moins large de la tumeur. Bien que ce traitement ait largement contribué à l'amélioration de la survie des patients à 5 ans, ce dernier reste relativement toxique et mal supporté. De plus, lorsque des métastases sont détectées au moment du diagnostic ou que le patient développe une résistance au traitement, le taux de survie à 5 ans n'est seulement que de 30%.

Depuis les années 1970, peu de progrès ont été menés dans la prise en charge de cette pathologie qui touche principalement l'enfant. C'est pourquoi, au vu de ces arguments, l'amélioration des connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition et le développement des ostéosarcomes est nécessaire afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Ces thérapies pourront être développées soit pour cibler directement la cellule tumorale, soit pour cibler le micro-environnement tumoral et bloquer le « cercle vicieux ».

Ainsi, l'ostéosarcome étant une tumeur survenant principalement chez l'enfant et l'adolescent, il est concevable d'établir un lien entre cette pathologie et la croissance squelettique. De plus l'ostéosarcome est une tumeur d'origine ostéoblastique, associée à la formation d'os ectopique et à une importante ostéolyse péri-tumorale. Cela suggère que le (ou les) facteur(s) en cause dans cette pathologie puisse(nt) être impliqué(s) dans l'ostéoblastogenèse ou la régulation de la triade RANK/RANKL/OPG, en partie liée à l'ostéoblaste. C'est pourquoi il a été émis l'hypothèse que les homéogènes de la famille *Dlx*, exprimés au cours du développement précoce et de l'ostéoblastogenèse, pourraient contribuer à la physiopathologie de l'ostéosarcome.

De par ces hypothèses, les objectifs de cette thèse sont multiples et visent à approfondir les connaissances :

- Sur le (les) rôle(s) que pourrait (ent) tenir les membres de la triade RANK/RANKL/OPG dans la physiopathologie des ostéosarcomes, notamment en ce qui concerne la formation d'os ectopique et l'ostéolyse tumorale,
- Sur le (les) rôles des homéogènes *Dlx* dans la physiopathologie des ostéosarcomes et dans l'ostéoblastogenèse,
- L'existence d'un lien entre la résorption osseuse contrôlée par la signalisation RANK/RANKL et les homéogènes de la famille *Dlx*.

# **MATERIEL ET METHODES**

## I- Modèles cellulaires

### 1. Lignées cellulaires

Les travaux de cette thèse ont été réalisés à l'aide de plusieurs modèles cellulaires comprenant d'une part des lignées d'ostéosarcomes murines (MOS-J [470], K7M2 [471] et POS-1 (Kanagawa Cancer Center)) et humaine (K-HOS [472]) et d'autre part des lignées « auxiliaires » ayant servi à la production de virus, protéines ou à la validation d'outils (**Tableau 10**). Toutes les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 ou DMEM (Lonza, Basel, Suisse) additionné de 5% ou 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone, Logan, États-Unis) et de 1% d'une solution d'antibiotique de pénicilline-streptomycine à 10 000 U/mL (Lonza).

	Origine		Milieu de culture
K-HOS	femme de 13 ans (Yang et al. 1979)		DMEM + 10%SVF
MOS-J	souris C57Bl/6	Joliat et al. 2002	RPMI1640 + 5%SVF
MOS-J A3N (prolifération lente)		obtenue par dilution limite au sein du laboratoire	
MOS-J PG1 (prolifération rapide)			
POS-1	souris C3H (Kanagawa Cancer Center)		
K7M2	souris BALB/c (Khanna et al. 2000)		DMEM + 10%SVF

Tableau 10 | Lignées d'ostéosarcomes utilisées au cours de ces études

### 2. Entretien et passage des cultures

Les cellules sont incubées sous atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé 2 à 3 fois par semaine. Lorsque les cellules arrivent à 90 % de confluence, elles sont repiquées en réalisant un passage au tiers (1/3). Pour cela le milieu est retiré, puis les cellules sont lavées à l'aide d'une solution de Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X) (Lonza). Après quoi, 40 µL de trypsine-EDTA à 10 000U/mL (Lonza) sont ajoutés par cm<sup>2</sup> de culture, afin de décrocher les cellules. La réaction est stoppée après 2 min en ajoutant 4 volumes de milieu par volume de trypsine. La suspension cellulaire est alors centrifugée à 1 000 rcf (relative centrifugal force), pendant 5 min à 20°C. Ensuite le surnageant est éliminé avant de reprendre les cellules dans un volume de milieu approprié.



## II- Expérimentation in vivo

Toutes les expérimentations employant des animaux ont été menées en accord avec la réglementation française suivant des protocoles validés par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale des Pays de la Loire (CEEAPdL 06) et autorisés par le Ministère de l'Agriculture. Les animaux utilisés ont été hébergés dans des conditions exemptes de pathogènes, au sein de l'Unité de Thérapeutique Expérimentale de la faculté de Médecine de Nantes, avec un cycle jour/nuit de 12h et un accès libre à l'eau et à la nourriture.

### 1. Modèles murins

Les expériences *in vivo* ont été menées à l'aide de plusieurs lignées de souris différentes afin de répondre aux différents besoins des études réalisées sur les gènes *Dlx* et la triade RANK/RANKL/OPG.

#### 1.1. Modèles conventionnels

Pour les expériences nécessitant un système immunitaire intact, des souris de fond génétique C57BL/6JRj âgées de 4 semaines (Janvier Laboratoires, Saint-Berthevin, FR) ont été utilisées pour l'obtention d'ostéosarcomes par injection de la lignée cellulaire murine MOS-J.

Pour les expériences visant à étudier le rôle des lymphocytes T dans le développement des ostéosarcomes, ou bien utilisant la lignée humaine HOS, des souris NMRI-nudes (Janvier), souris immunodéprimées (déficientes en lymphocytes T), âgées de 4 semaines ont été utilisées.

#### 1.2. Modèles spécifiques pour l'étude de la triade RANK/RANKL/OPG

Dans le cadre de l'étude de l'implication de la signalisation RANK/RANKL/OPG plusieurs lignées de souris invalidées, transgéniques ou conditionnelles, toutes de fond génétique C57BL/6JR, ont été utilisées :

- Souris RANK<sup>Tg</sup> (Christopher Mueller, Strasbourg, France) présentant une surexpression de RANK dans la lignée myéloïde.

- Souris RANKL<sup>Flox/Flox</sup> Lck-Cre obtenues après croisement de souris RANKL<sup>Flox/Flox</sup> (Charles A O'Brien, Little Rock, Arkansas, États-Unis) et de souris B6.Cg.Tg (Lck-cre) 548Jxm/J (Charles River France, l'Arbresle, France) afin de déléter spécifiquement RANKL dans les lymphocytes T.

## 2. Génotypage des animaux

Les souris génétiquement modifiées ont été génotypées par réaction de Polymerase Chain Reaction (PCR) à l'aide du kit Phire Animal Tissue Direct (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) en accord avec les instructions du fabricant. Brièvement, après l'extraction de l'ADN génomique de la queue de l'animal, la PCR est réalisée sur 1 microLitre (µL) d'extrait en utilisant les couples d'amorces (primers) ci-dessous (**Tableau 11**).

	Couples primers		Amplicon positif
RANK <sup>Tg</sup>	forward	5' ATGGACTACAAAGACGATGACGAC 3'	320 pb
	reverse	5' TGCCAGGATCCACCGCCACCA 3'	
RANKL <sup>flox</sup>	forward	5' CTGGGAGCGCAGGTTAAATA 3'	251 pb
	reverse	5' GCCAATAATTAATACTGCAGGAAA 3'	
iCre	forward	5' ATGGTGCCCAAGAAGAAGAG 3'	300 pb
	reverse	5' CAGGTGCTGTTGGATGGTCT 3'	

**Tableau 11| Amorces de génotypage des souris RANK<sup>Tg</sup>, RANKL<sup>F/F</sup> et iCre**

Par ailleurs, la bonne recombinaison des lymphocytes T dans les souris RANKL<sup>Flox/Flox</sup> Lck-Cre a été vérifiée après purification des lymphocytes T de la rate. Pour ce faire, au moment du sacrifice des souris, la rate a été prélevée et conservée à 4 °C dans un tampon d'isolation (PBS avec 2 % SVF et 2 mM EDTA). Après quoi, les échantillons de rates sont perfusés avec une seringue contenant du tampon d'isolation afin d'en récupérer les cellules. L'extraction est jugée satisfaisante lorsque la rate s'éclaircit.

Le surnageant cellulaire est ensuite centrifugé pendant 5 min à 600 rcf afin de culotter les cellules. Après une étape de rinçage avec du tampon d'isolation, une lyse des globules rouges est réalisée à l'aide d'une solution hypotonique de pH égal à 7,4 (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 100µM Na<sub>2</sub>EDTA) pendant 3 min. La réaction de lyse est ensuite stoppée par l'ajout de 4 volumes de tampon d'isolation. Le culot cellulaire est alors repris et l'isolation des

lymphocytes T est réalisée à l'aide du kit Dynabeads® FlowComp™ Mouse Pan T (CD90.2) (ThermoFisher Scientific) suivant le protocole du kit. À la fin de l'isolation des lymphocytes T, une partie du culot cellulaire est fixée à l'aide d'une solution de paraformaldehyde à 4 % (PFA 4 %) afin de vérifier la pureté de l'extrait par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti-CD3 (clone 17A2, ref 555247, BD Biosciences, San José, CA, États-Unis) (voir en **Annexe 1**). L'autre partie du culot est conservée à sec et à -20°C ou traitée immédiatement à l'aide du kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific). Une réaction de PCR est réalisée à l'aide du kit Phire Hot Start II DNA Polymerase en utilisant les amorces suivantes : 5' GTAACAGTCGGCAGGAGTATTTATC 3' pour l'amorce sens, et 5' GGACA-GAGCCTCCCTGGTTATGAA 3' pour l'amorce antisens. La taille attendue des amplicons est d'environ 1600 paires de bases (pb) si la recombinaison est correcte et d'environ 1800 pb dans le cas contraire.

### 3. Induction des tumeurs *in vivo*

Les tumeurs sont induites par l'injection intramusculaire de 1 à 3 millions de cellules reprises dans 50 µL de PBS. Expérimentalement, les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une combinaison air-isoflurane (1,5% ; 1L/min), puis rasés au niveau du site d'injection. L'inoculation des cellules tumorales est ensuite réalisée en piquant l'animal au niveau du muscle de la patte arrière gauche tout en cherchant le contact du tibia.

### 4. Suivi expérimental

Le poids et le volume tumoral sont mesurés tous les deux à trois jours. La mesure de la tumeur est réalisée à l'aide d'un pied à coulisse, et le volume de la tumeur calculé à l'aide de la formule suivante :  $((E \times P \times H)/2)$  où E correspond à l'épaisseur ; P à la profondeur et H à la hauteur de la tumeur. Les souris sont sacrifiées lorsque le volume de la tumeur atteint le volume maximum éthiquement acceptable : 2500 mm<sup>3</sup> soit 10 % du poids de l'animal.

## 5. Injections de molécules

Dans le cadre de l'étude de l'implication de la triade RANK/RANKL dans la physiopathologie de l'ostéosarcome, un anticorps bloquant RANKL, IKK22.5 (Hideo Yagita, Juntendo University, Tokyo), a été utilisé. Ce dernier, repris dans une solution de PBS-stérile, a été injecté par voie intrapéritonéale trois fois par semaine à raison de 50 microgrammes par injection.

## 6. Nécropsie

La nécropsie des souris a été réalisée en sacrifiant les animaux par dislocation cervicale. La peau est ensuite retirée entièrement en réalisant une incision au niveau de l'abdomen. Les pattes arrières (tumeur et patte contrôle contra-latérale) sont alors découpées et placées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis). La cavité thoracique est incisée afin d'examiner les poumons pour mettre en évidence la présence de métastase. Les lobes pulmonaires sont séparés et un comptage visuel des métastases est réalisé. Après quoi, ces derniers sont conservés dans une solution de PFA à 4%.

## 7. Histologie

### 7.1. Préparation des échantillons

Après le sacrifice des animaux, les pièces histologiques non calcifiées sont fixées pendant 24 à 48h dans une solution de PFA 4% à 4°C. Après quoi, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs au degré d'alcool croissant (70, 80, 95 et 100%), puis clarifiés par un solvant intermédiaire (butanol ou toluène) et imprégnés par de la paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation (STP120, Microm, Brignais, France). Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine puis coupés à l'aide d'un microtome rotatif afin d'obtenir de fines coupes de 3µm. Les coupes sont « défroissées » dans un bain-marie à 40°C puis étalées sur lame.

Concernant les pièces histologiques calcifiées (tibia), ces dernières après l'étape de fixation sont décalcifiées dans une solution de PBS contenant 0,2% de PFA et 4,13% d'EDTA à l'aide d'un automate micro-ondes KOS (Milestone SRL, Sorisole, Italie) pendant plusieurs jours. La décalcification complète des échantillons est vérifiée par radiographie à l'aide d'un

système d'imagerie faxitron MX-20 (Faxitron, Tucson, AZ, États-Unis). Après quoi, les échantillons sont traités de la même façon que les échantillons non calcifiés.

## 7.2. Coloration histologique

Les colorations histologiques (Trichrome de Masson, et coloration Hématoxyline/Eosine) sont réalisées à l'aide d'un automate de coloration HMS 740 (Microm) dans lequel les échantillons sont déparaffinés et réhydratés par des bains successifs de toluène et d'éthanol de concentration décroissante (100, 95, 80 et 70%).

La coloration au Trichrome de Masson, réalisée à l'aide de l'automate, permet de colorer les fibres de collagène en vert, les noyaux cellulaires en noir/violet et les hématies en orange. Le protocole de coloration est le suivant (**Tableau 12**).

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

**Tableau 12 | Protocole du Trichrome de Masson**

Après coloration, les coupes sont montées entre lames et lamelles à l'aide d'un milieu de montage non aqueux (Pertex). Les lames sont ensuite numérisées grâce à un imageur de lame Nanozommer 2.0 R-S (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japon).

### 7.3. Immunohistologie

Les immunomarquages sont tous réalisés de la même façon à l'exception de certains qui requièrent un démasquage antigénique préalable (**Tableau 13**). Dans un premier temps, les coupes déparaffinées sont incubées en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine à mettre en évidence (**Tableau 13**), puis détectées à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre biotinylé dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire. Après un blocage préalable des peroxydases endogènes à l'aide d'une solution d'eau oxygénée à 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 10 min, le signal de l'anticorps est amplifié par la liaison d'une streptavidine couplée à une peroxydase (HRP). Enfin le signal est mis en évidence par l'ajout du substrat de la peroxydase, le diaminobenzidine (DAB), permettant d'obtenir une coloration marron. Entre chacune de ces étapes, trois lavages de 5 min sont réalisés à l'aide d'une solution tampon de PBS-Tween 0,1%. Pour finir, une contre-coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) est réalisée et le montage de l'échantillon entre lame et lamelles est réalisé grâce à un milieu de montage non aqueux (Per-tex).

	Murins			Humains		
	Référence	Dilution	Demasquage	Référence	Dilution	Demasquage
Ki-67	ab16667 (Abcam)	1:100	C	M7240 (Dako)	1:100	C
CD146	ab75769 (Abcam)	1:800	E	ab75769 (Abcam)	1:800	E
RANK	RANK-02 (C. Mueller, Strasbourg)	1:3000	C	sc-9072 (Santa Cruz)	1:50	C
p21	ab109199 (Abcam)	1:500	C	ab109199 (Abcam)	1:500	C
Osx	ab22552 (Abcam)	1:1000	-	ab22552 (Abcam)	1:1000	-
caspase 3 clivé	#9664 (Cell Signaling)	1:400	C	#9664 (Cell Signaling)	1:400	C

C : tampon citrate pH=6 pdt 20 min à 97°C ou sur la nuit à 60°C  
 E : tampon tris EDTA pH=9 pdt 20 min à 97°C ou sur la nuit à 60°C

**Tableau 13 | Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistologie**

## 8. Remise en culture à partir de la pièce tumorale

Dans certains cas, afin de vérifier la stabilité des lignées injectées ou pour remettre en culture des métastases, des prélèvements de pièces anatomiques ont été réalisés sur quelques individus. Brièvement, à la nécropsie, un morceau de la pièce tumorale ou d'un lobe pulmonaire est placé dans une solution de PBS et conservé à 4°C. L'échantillon est ensuite lacéré afin d'obtenir de petits morceaux qui seront incubés dans le fond d'une plaque 6 puits en présence du milieu de culture correspondant à la lignée initialement injectée. Il est important d'adapter la quantité de milieu de culture afin que l'échantillon soit immergé sans pour autant être en suspension. Après 24 à 48h, le milieu est renouvelé et une amplification est réalisée afin d'évaluer les niveaux d'expression.

## 9. Analyse par microtomographie 3D ( $\mu$ CT)

Les pattes des souris ont été numérisées à l'aide du microtomographe SKYSCAN 1076 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgique). Cet appareil permet l'acquisition, la quantification et la visualisation 3D des échantillons de façon non invasive. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide du logiciel du constructeur. Les images sont acquises avec les paramètres suivants :

- résolution 18  $\mu$ m ;
- source de rayon X 50 kV avec filtre Al 0.5 mm ;
- champ optique : 180 ° avec l'acquisition tous les 0.6° de deux images.

Après acquisition, les images sont reconstruites (moyenne des deux images), seuillées (seuil : 0.004 -0.08) et converties (format BMP) à l'aide du logiciel NRecon (Bruker). L'analyse des coupes et la reconstruction 3D des images sont ensuite réalisées à l'aide des logiciels Dataviewer et CTvox (Bruker). L'analyse des paramètres osseux est, elle, réalisée à l'aide du logiciel CTan (Bruker) sur 450 coupes et permet d'obtenir les paramètres suivants : volume (TV, mm<sup>3</sup>) et surface (TS, mm<sup>2</sup>) du tissu, volume (BV, mm<sup>3</sup>) et surface de l'os (BS, mm<sup>2</sup>), le pourcentage de volume osseux (BV/TV,%), le ratio surface/volume de l'os (BS/BV, mm<sup>3</sup>), et la densité de la surface osseuse (BS/TV, mm<sup>3</sup>).

### III- Techniques

#### 1. Génie génétique : modulation de l'expression des gènes

Afin de modifier l'expression génique de *Dlx4* (des *Dlx*) (inhibition et surexpression) ou de RANK, différentes méthodes ont été employées. Ainsi les surexpressions de *Dlx4* (des *Dlx*) ont été réalisées par transfection chimique au JetPEI (Polyplus, Illkirch, France) alors que l'inhibition de *Dlx4* et la surexpression de RANK ont été induites par transduction avec des particules lentivirales.

##### 1.1. Induction de gènes par méthode chimique

Afin d'induire l'expression de *Dlx4* (des *Dlx*) dans différentes lignées d'ostéosarcomes, le clonage des différents transcrits a été entrepris afin d'obtenir des vecteurs d'expression eucaryote. Après quoi, les plasmides ont pu être transfectés par une molécule chimique : le JetPEI (Polyplus).

###### 1.1.1. Clonage du gène *Dlx4* murin

Afin d'obtenir un vecteur d'expression permettant la surexpression stable de *Dlx4* (des *Dlx*), nous avons cloné la majeure partie de l'ADNc de *Dlx4* amplifiée par PCR dans un vecteur pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific) suivant les étapes décrites ci-dessous.

###### 1.1.1.1. Amplification de l'ADNc de *Dlx4* par PCR

Un fragment de l'ADNc contenant toute la séquence codante pour la protéine DLX4 murine a été obtenu en réalisant une PCR sur un échantillon d'ADNc d'embryon de souris (E12.5). Pour ce faire, la réaction a été réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ L contenant 300 ng d'ADNc, 50 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de dNTP, 5% de DMSO, 2  $\mu$ L de tampon 10X, 2U de *Taq* Polymérase DNA Platinum HIFI (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis), et 10  $\mu$ M de chacune des amorces sens et antisens (**Tableau 14**). Le protocole de PCR suivant a été appliqué : dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie de 45 cycles d'amplification comportant chacun une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 35 secondes à 52°C et une phase d'élongation de 1,5 min à 72°C. La réaction a été finalisée en réalisant une étape d'élongation de 10 min à 72°C. Le produit PCR a ensuite été conservé à -20°C.



	Amorces		Site enzymatique	Taille fragment
Dlx4	forward	5'-GCA act agt TCT CTG CCG GAA GAG-3'	SpeI	env. 1600 pb
	reverse	5'-CG gtt taa ACA GCG AGG AGC TAT GCC TG-3'	PmeI	

**Tableau 14| Amorces de clonage pour Dlx4**

#### 1.1.1.2. Clonage par « TA Cloning »

Les produits de PCR obtenus ont été clonés dans les plasmides pcDNA3.3 ou pCR2.1 en aval d'un promoteur CMV grâce au kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) ou au kit TA cloning® kit with pCR2.1 Vector (Invitrogen). Ces kits utilisent un vecteur linéarisé possédant à ses extrémités 5', un résidu thymidine non apparié. Le produit de PCR va être ligaturé au vecteur, à l'aide de la topoisomérase I ou de la T4 DNA ligase (en fonction du kit), en exploitant l'activité terminale transférase de la *Taq* Polymérase qui a la spécificité d'ajouter un résidu désoxyadénosine (A) en 3' de son produit. Les réactions sont réalisées suivant les recommandations des différents kits.

#### 1.1.1.3. Transformation et sélection des bactéries

Les transformations ont été effectuées avec une souche d'*Escherichia coli* DH5α ou Stbl3 déjà compétente (Invitrogen). Celle-ci est réalisée en plaçant 50 µL de bactéries sur glace pendant 10 min. Puis, 5 µL du produit de « ligation » sont ajoutés. Le mélange est replacé sur glace pendant 30 secondes (sec). Un choc thermique est alors produit en plaçant les bactéries dans un bain thermostaté à 42°C pendant 45 sec puis sur glace pendant 2 min ; 0,9 mL de milieu « Luria-Bertani (LB) » liquide sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé 1h à 37°C sous agitation. Pour terminer, 200 µL des bactéries sont étalés sur un milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg/mL), afin de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide.

#### 1.1.1.4. Mini-préparation d'ADN plasmidique

10 à 15 colonies isolées sont récoltées sur la gélose et remises chacune en culture dans 5 mL de milieu LB + ampicilline (100 µg/mL). Après une nuit d'incubation à 37°C, sous agitation, l'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide du kit Nucleospin plasmid (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne) selon les indications données par le fournisseur. L'insertion du produit de PCR dans le plasmide est vérifiée en réalisant une digestion par l'enzyme ApaLI (New England Biolabs, Beverly, MA, États-Unis). La réaction est réalisée dans un volume de 20 µL.

sur 5 µg d'ADN en suivant les recommandations du fournisseur. La migration du produit de digestion est ensuite réalisée sur un gel d'agarose à 1,5% (+Bromure d'Ethidium) et en utilisant comme tampon de migration une solution de Tris Acétate EDTA à 1X (TAE 1X).

#### 1.1.1.5. Maxi-préparation d'ADN plasmidique

Les clones validés sont amplifiés en ensemençant 300 mL de milieu LB + ampicilline (100 µg/mL). Puis, l'ADN plasmidique est extrait et purifié en utilisant le kit NucleoBondXtra Maxi Plus (Macherey-Nagel). L'extraction est réalisée en suivant les recommandations du fournisseur.

#### 1.1.1.6. Vérification des séquences

Les séquences des inserts clonés dans les différents plasmides ont toutes été validées par séquençage à l'aide des différentes amorces « universelles » disponibles, ainsi que des amorces de qPCR des gènes cibles. Les réactions de séquençages ont été confiées à la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne), qui en retour fournit les fichiers traces au format ABI. À partir de ces fichiers, la séquence est reconstruite en assemblant les contigs à l'aide du logiciel DNA Dragon (SequentiX, Klein Raden, Allemagne).

#### 1.1.2. Transfection chimique au jetPEI

Les plasmides utilisés pour induire la surexpression des gènes d'intérêt ont été transfectés dans les cellules à l'aide d'une solution de jetPEI (Polyplus). La formation des complexes a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur. En pratique, la transfection est opérée en plaque 6 puits, préalablement ensemencée (24h avant) à hauteur de 100 000 cellules par puit (~50 à 60% de confluence au bout de 24h). Les complexes sont préparés en ajoutant 2 µg de jetPEI, contenus dans 100 µL de NaCl à 150 mM, à 1 µg d'ADN plasmidique dilué de la même façon dans 100 µL de NaCl à 150 mM. 200 µL de complexes sont ensuite déposés sur les cellules. Après 24h, les cellules sont sélectionnées à l'aide de l'antibiotique approprié (G418 : 500 µg/mL pour les plasmides pCDNA3 ou pCR2.1).

## 1.2. Induction ou inhibition de gène par méthode lentivirale

### 1.2.1. Etapes de préparation communes à la préparation des lentivirus

#### 1.2.1.1. Production des particules lentivirales

Les particules virales ont été produites à l'aide de la lignée cellulaire HEK 293FT (optimisée pour la production de particules virales) et en utilisant le kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen). Ce kit fournit des plasmides auxiliaires permettant la synthèse des différents constituants des virus dans lesquels sera empaqueté le transgène d'intérêt (short-hairpin-ARN (shARN) anti-Dlx4 ou transcrit de RANK).

Brièvement, ces manipulations sont réalisées en laboratoire de type L3 en se basant sur le protocole de Dull et *coll.* [473]. Pour ce faire,  $6 \times 10^6$  de cellules HEK 293FT sont ensemencées en milieu DMEM sans rouge phénol, et transfectées 24h après avec 3 µg de chaque plasmide auxiliaire (kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems) et 9 µg du plasmide contenant le transgène d'intérêt (RANK ou shARN-antiDlx4). De plus, afin de permettre la titration des particules lentivirales, 0,9 µg d'un plasmide contrôle contenant la GFP sont ajoutés. La transfection est réalisée à l'aide d'une solution de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant.

Après 48h d'incubation, le surnageant cellulaire qui contient les particules virales est récupéré et filtré à travers un filtre 0,45 µm en acétate de cellulose (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) afin d'éliminer les débris cellulaires. Pour finir, les particules sont concentrées par ultrafiltration avec des tubes AMICON-Ultra 15 KD (Merck Millipore), puis conservées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2.1.2. Titration des particules lentivirales

Les productions de lentivirus sont titrées en infectant des cellules HEK 293FT afin de connaître le nombre de particules par µL de surnageant. Pour ce faire, 20 000 cellules ensemencées le jour précédent sont infectées avec plusieurs doses de virus : 0,5, 1, 5 et 10 µL. Après 72h, les cellules sont récupérées et le pourcentage de cellules transduites est évalué en analysant le pourcentage de cellules GFP (Green Fluorescence Protein) par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre FC500 (Beckman Coulter, Pasadena, CA, États-Unis). La concentration en particules lentivirales est calculée en considérant que chaque particule infecte une cellule.

### 1.2.1.3. Transduction des lignées cellulaires d'ostéosarcomes

Pour ce faire, 20 000 cellules sont ensemencées en plaque 24 puits, dans un volume de 400  $\mu$ L de milieu complet. Le lendemain, les cellules sont transduites par les particules avec un ratio de 30 à 100 particules par cellule. Après 72h d'incubation, les cellules sont rincées 3 fois avec une solution de PBS et passées en plaque 6 puits pour être sorties de la structure L3. Ensuite, les cellules sont amplifiées en flasques de 25  $\text{cm}^2$  afin d'être sélectionnées soit par un antibiotique, puromycine 5 $\mu$ g/ml (Gibco, Grand Island, États-Unis) (lenti-RANK) soit par tri cellulaire (shARN) sur la base de l'expression de la GFP afin d'obtenir des lignées stables. Le tri cellulaire est réalisé au sein du plateau technique de cytométrie en flux et de tri cellulaire de la SFR Santé François Bonamy (Nantes), par un cytomètre en flux FACSAria III (BD biosciences).

### 1.2.2. Surexpression de RANK

La surexpression de RANK dans les cellules d'ostéosarcomes a été obtenue par la production de lentivirus suivant les protocoles décrits précédemment, et en utilisant des plasmides commerciaux comme vecteurs d'expression (source de transgène) : référence EX-O0007-Lv105 et EX-Mm24198-Lv105 OmicsLink™ Expression vectors (GeneCopoeia, Rockville, MD, États-Unis) contenant respectivement le transcrite de RANK humain ou murin.

### 1.2.3. Inhibition de l'expression de *Dlx4* (des *Dlx*) par shARN

Pour cette étude, l'utilisation de shARN a été envisagée afin de diminuer spécifiquement la quantité d'acide ribonucléique messenger (ARNm) (de transcrite donc de protéine) de *Dlx4*. Pour ce faire, la production de particules lentivirales a été retenue puisqu'elle permet l'intégration d'ADN exogène dans le génome, avec une grande efficacité, et dans des régions stables. Les lentivirus ont été générés à l'aide du plasmide pFG12 [474]. Ce plasmide contient les séquences rétrovirales 5' et 3' LTR permettant l'intégration dans le génome de la cassette transgène située entre ces deux éléments. La préparation de la cassette d'expression des shARNs et des particules lentivirales est décrite ci-dessous. Après quoi, la production des lentivirus a été réalisée comme décrite précédemment.

### 1.2.3.1. Design des séquences shRNAs

Les séquences des shRNAs dirigées contre *Dlx4* ont été dessinées en respectant plusieurs critères décrits par Reynolds et *coll.* [475]. Ces séquences doivent être spécifiques du gène d'intérêt et ne pas interagir avec un autre gène. Afin de conduire à la dégradation de l'ARNm du gène cible, la séquence du shARN doit contenir une région parfaitement complémentaire avec celui-ci, sinon il n'en résulterait qu'une inhibition partielle. Concernant la séquence d'ADN servant à la synthèse des shARNs, il s'agit de deux oligonucléotides parfaitement complémentaires à l'exception de leur extrémité 5'. D'autre part, la séquence choisie doit contenir entre 40 et 50 % de GC pour assurer une structure stable, et ne pas présenter plus de 4 fois à la suite la répétition d'une même base. Trois séquences de shARN ont été dessinées, mais deux ont été retenues après la première étape de clonage, la troisième s'avérant difficile à cloner. Les séquences des shARNs retenues sont présentées ci-dessous (**Tableau 15**).

	Séquences (Duplex)
shDlx4-207	3' GGGCGTAGACTTCACATTCTCAAAGTTCTCTTGAGAATGTGAAGTCTACGAAAAACCTTTTCGA 5' 5' GATCCCCGCATCTGAAGTGTAAAGATTCAAGAGAACTCTTACACTTCAGATGCTTTTTGGAAA 3'
shDlx4-670	3' GGGCGTTCGGGTCTTGGTAGATAAGTTCTCTATCTACCAAGACCCGAACGAAAAACCTTTTCGA 5' 5' GATCCCCGCAAGCCAGAACCATCTATTCAAGAGATAGATGGTCTGGGCTTGCTTTTTGGAAA 3'
shDlx4-1128	3' GGGTTGGTCGAGGTCTACCTAAAGTTCTCTTTAGGTAGACCTCGACCAA AAAAACCTTTTCGA 5' 5' GATCCCCAACAGCTCCAGATGGATTTC AAGAGAAATCCATCTGGAGCTGGTTTTTTGGAAA 3'

**Tableau 15 | Séquences des shARNs ciblant spécifiquement *Dlx4***

### 1.2.3.2. Préparation de la cassette d'expression

Les oligonucléotides servant à la synthèse des shARNs sont dans un premier temps clonés dans le plasmide pSUPER (Oligoengine, Seattle, WA, US), à la suite du promoteur H1. Ce promoteur, reconnu par l'ARN polymérase III, permet une production endogène des shARNs. C'est l'ensemble « promoteur H1 + duplex shARN » qui sera ensuite inséré entre les séquences LTR du plasmide pFG12. Pour la réalisation du clonage, des techniques précédemment citées pour la création des plasmides de surexpression sont employées.

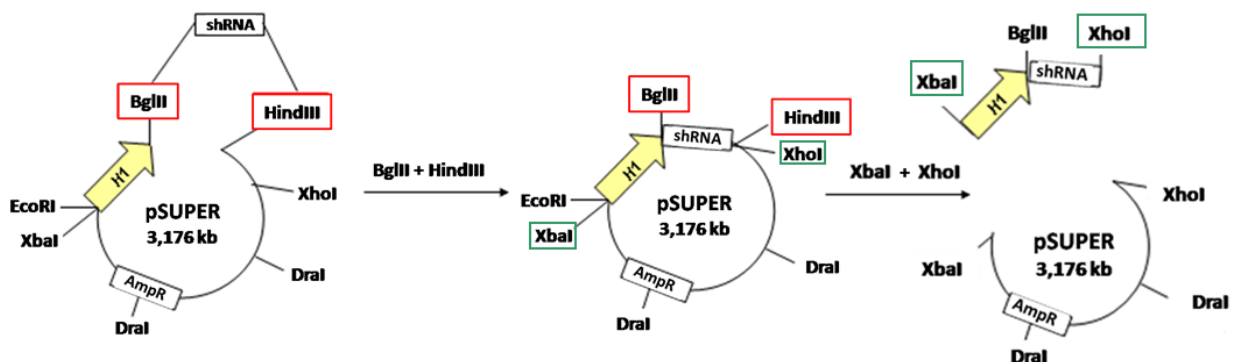
#### a. Formation des duplex shARNs : appariement des brins sens et antisens

Les oligonucléotides sens et antisens sont repris dans de l'eau à une concentration de 10 µM, puis après dénaturation 10 min à 90°C, 40 picomoles de chaque oligonucléotide sont repris dans un volume final de 40 µL contenant 4 µL de tampon 10X. Le mélange est alors

incubé 10 min à 67°C puis 30 min à température ambiante (TA) afin de permettre l'appariement des brins.

b. Ligation des duplex shARNs dans le plasmide pSUPER

Les oligonucléotides appariés sont clonés dans le plasmide pSUPER préalablement linéarisé (**Figure 34**). Cette linéarisation est réalisée en digérant 2µg de plasmide, pendant 1h à 37°C, par les enzymes de restriction BglII et HindIII (NEB). Ainsi, la ligation est réalisée en plaçant 80 ng de plasmide linéarisé et 4 µg de duplex shARN dans un volume final de 20 µl en présence d'1µL d'enzyme T4 DNA ligase (Roche, Rotkreuz, Suisse). Ce mélange est alors incubé une nuit à 4°C. Après quoi, l'enzyme est dénaturée en incubant le mélange 20 min à 65°C. Le produit de ligation est ensuite digéré par l'enzyme de restriction BglIII, afin d'éliminer les plasmides qui se sont refermés sans incorporer de duplex shARN. En effet, la ligation des shARNs induit une perte du site BglIII. Ensuite, la transformation de bactéries ultracompétentes Stbl3 (Invitrogen), et la sélection des clones sont réalisées selon les protocoles précédemment cités. Des mini-préparations sont ensuite réalisées et l'insertion de la cassette vérifiée par digestion enzymatique à l'aide des enzymes EcoRI et HindIII.



**Figure 34 | Stratégie de clonage dans le plasmide pSUPER permettant la récupération du promoteur H1**

Les oligonucléotides appariés (shARN) sont insérés en aval du promoteur H1 à l'aide des sites BglII et HindIII. Le promoteur UbiC permet l'expression de la GFP (gène rapporteur).

### 1.2.3.3. Insertion de la cassette H1-shARN dans le plasmide pFG12

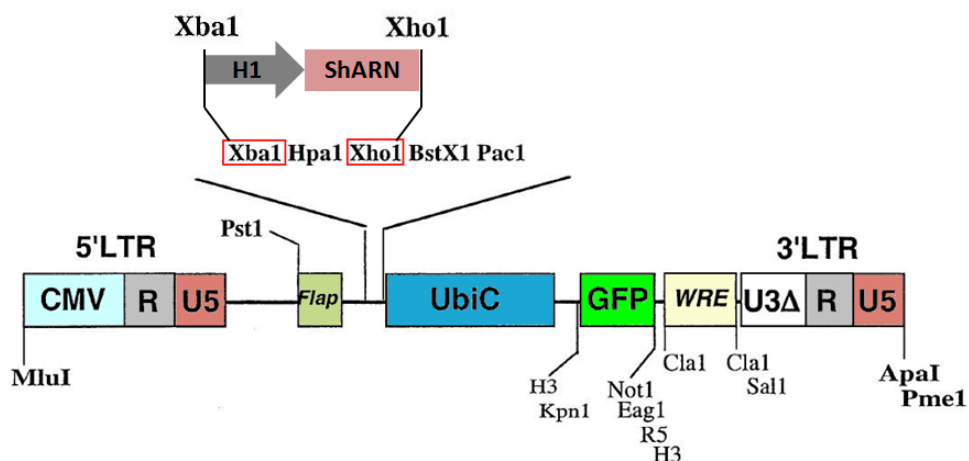
Comme indiqué précédemment, le plasmide pFG12 contient les séquences 5' et 3' LTR permettant la production de particules lentivirales. Il contient également le gène codant la GFP qui permettra la sélection des cellules transduites par tri cellulaire.

#### a. Préparation du vecteur pFG12 et de la cassette H1-shARN

Les vecteurs pFG12 et pSUPER-duplex-shARN sont linéarisés, séparément, par les enzymes XhoI et XbaI (NEB). La digestion est réalisée durant 1h à 37°C, sur 2µg de plasmide contenu dans un volume final de 50µL. Cette digestion permet d'une part de libérer la cassette H1-duplex shARN du plasmide pSUPER et d'autre part de créer des extrémités compatibles dans le plasmide pFG12 (**Figure 35**). Après quoi, le plasmide pSUPER est éliminé, en le coupant à l'aide de l'enzyme DraI (NEB) qui ne coupe pas dans la cassette d'intérêt. Enfin, les mélanges sont incubés 20 min à 65°C pour inactiver les enzymes. Les digestions sont vérifiées sur gel d'agarose à 1,5%.

#### b. Ligation de la cassette H1-duplex shARN dans le pFG12

Les protocoles de ligation, transformation, sélection des clones et de mini-préparations sont similaires à ceux vus précédemment. Les enzymes utilisées diffèrent néanmoins. L'enzyme HpaI (NEB) a été utilisée pour éliminer les plasmides pFG12 reliqués sur eux-mêmes, et les enzymes XbaI et XhoI pour vérifier les mini-préparations.



**Figure 35 | Séquence d'expression lentivirale du plasmide pFG12**

La séquence contient entre autres, le promoteur des shARNs, les éléments d'encapsulation et de répliquions lentivirales ainsi que le gène de la GFP sous contrôle du promoteur UbiC.

## 2. Identification de nouveaux transcrits

Dans le cadre de l'étude des gènes *Dlx*, des techniques d'identification des transcrits ARN ont du être utilisées afin de confirmer la présence ou l'absence de transcrit alternatif. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été employées.

### 2.1. RACE-PCR

La Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (RACE-PCR) est une technique de PCR permettant de déterminer les sites d'initiation (5') et de terminaison (3') des transcrits ARN en connaissant une séquence partielle de ces derniers.

Pour ce faire, la séquence en 5' est déterminée en réalisant la ligation d'un oligonucléotide de séquence connue, après l'élimination préalable de la coiffe qui laisse apparaître un 5' phosphate nécessaire à la réaction de ligation. Après quoi, une réaction de reverse transcription (avec un oligo polyT) suivie d'une étape de PCR (avec un primer spécifique au gène et à l'adaptateur) permettent d'obtenir la séquence de l'extrémité 5' (**Figure 36**). La séquence en 3' est déterminée de la même façon, mais en utilisant un oligonucléotide reconnaissant la queue polyA des ARNm (**Figure 36**).

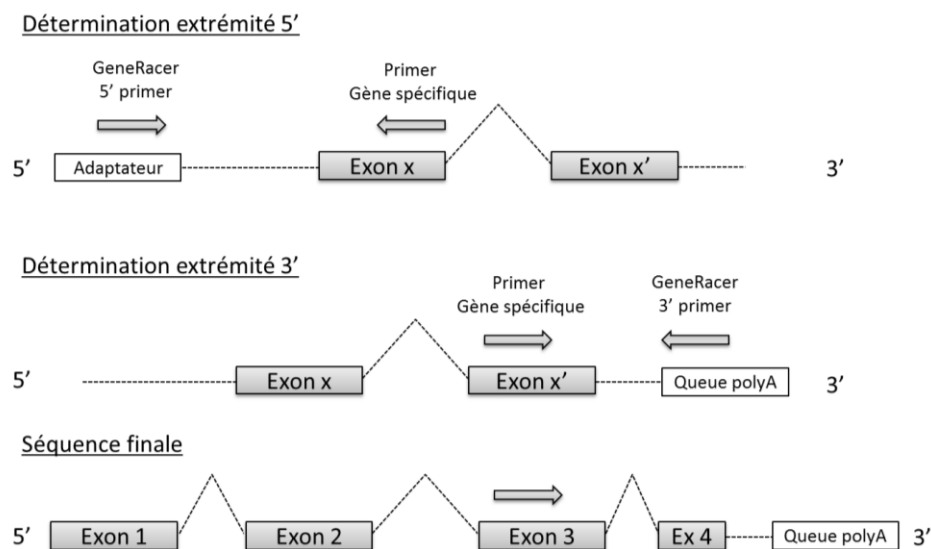


Figure 36 | Principe général de la réaction de RACE-PCR

La ligation d'un adaptateur en 5' après avoir préalablement décoiffé les ARNm permet de synthétiser l'extrémité 5' de l'ARNm à l'aide d'un primer fourni dans le kit (Invitrogen) et d'un primer du gène cible. L'utilisation d'un primer dans la région polyA ainsi que d'un primer spécifique permet également la détermination de l'extrémité 3'.



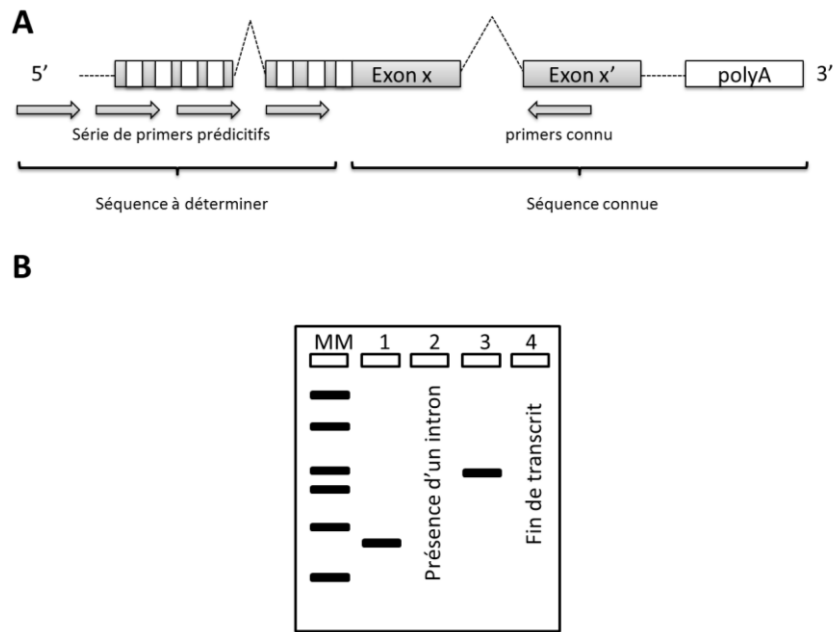
Dans le cadre de notre étude, les réactions de RACE-PCR ont été réalisées à l'aide du kit « GeneRACER kit with SuperScript and TOPO TA cloning for sequencing (Invitrogen) » en suivant les instructions du fabricant. Brièvement les réactions de RACE-PCR sont réalisées sur un échantillon d'ARN totaux dans des conditions exemptes de RNase et de contaminants. Après quoi, l'échantillon de PCR est directement ligué par « TA cloning » dans un plasmide afin de permettre le séquençage des fragments. Les étapes de clonage, d'amplification plasmidique et de séquençage sont les mêmes que celles précédemment décrites.

## 2.2. Northern-blot

La détection des transcrits de *Dlx4* (ou des gènes *Dlx*) a également été entreprise. Pour ce faire, 12 µg d'ARN totaux ont été fractionnés sur un gel d'agarose dénaturant (1,2% agarose, MOPS 1X, formaldéhyde 1,2 M) et transférés sur une membrane Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup> (Ge Healthcare). Après quoi la membrane est hybridée avec une sonde ARN marquée à la digoxigénine (DIG) synthétisée à partir d'un plasmide pBS-KS<sup>+</sup>, contenant le transcrit d'intérêt, et à l'aide du kit DIG Northern Starter Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne). La synthèse de la sonde et les étapes d'hybridation sont réalisées comme préconisé par le fabricant du kit. Enfin, la révélation est réalisée en ajoutant 1 ml de CDP-star (Roche Applied Science) dilué au 1/10<sup>ème</sup>, et le signal est acquis à l'aide d'un imageur à chemiluminescence G-Box (Syn-gene, Cambridge, Royaume-Uni).

## 2.3. PCR « glissante »

L'analyse par PCR glissante consiste à utiliser une amorce située dans une région connue et à utiliser plusieurs amorces en sens inverse qui s'éloignent au fur et à mesure de la première amorce (**Figure 37**). Ainsi, l'éloignement croissant des amorces par rapport au point de référence permet d'obtenir des cDNA de tailles croissantes jusqu'à l'arrêt de la synthèse. La présence d'un intron pouvant être déduite par l'absence d'une bande entre deux échantillons. Dans ces expériences, les PCR sont réalisées de façon standard à l'aide du kit Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Les échantillons sont ensuite séparés sur un gel d'agarose à 2%.



**Figure 37 | Principe général de la réaction de PCR « glissante »**

Dans un premier temps, des réactions de PCR sont réalisées avec de multiples amorces dessinées en fonction des séquences génomiques présentes dans les banques (A). Après quoi, les échantillons sont séparés sur un gel d'agarose (B).

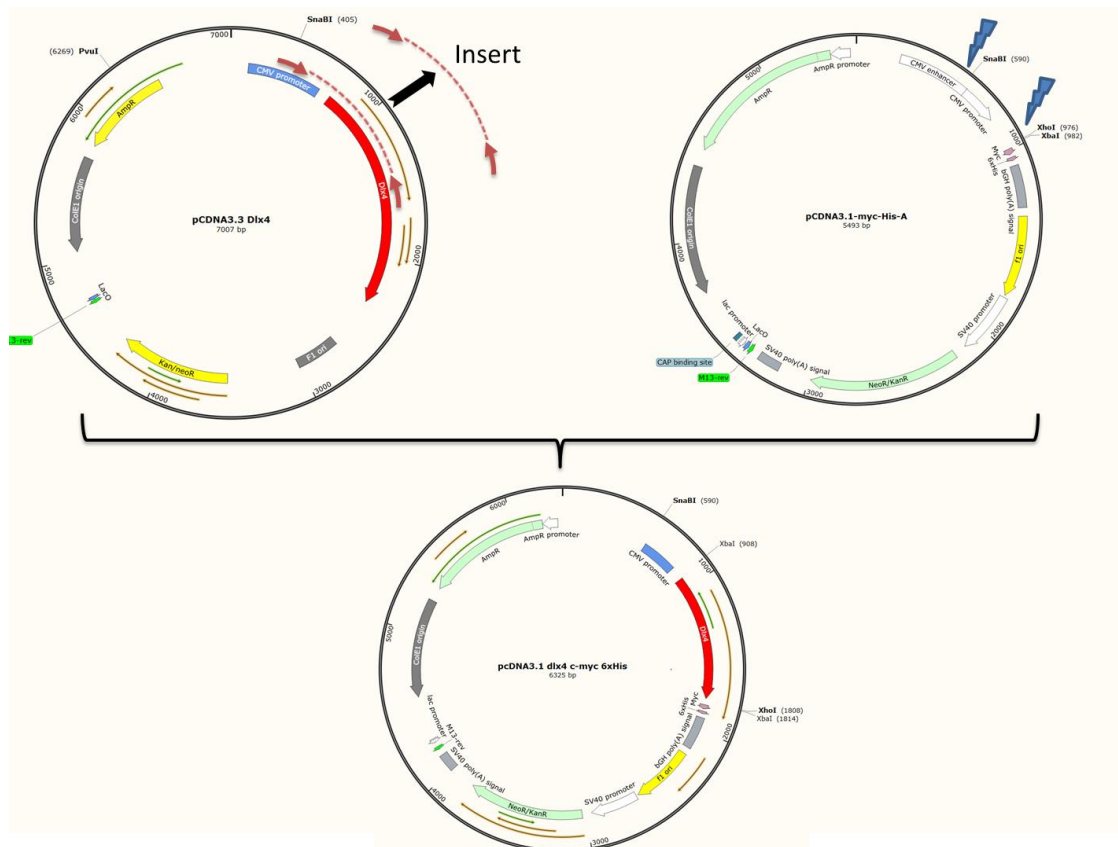
### 3. Production de protéine taguée

Afin de valider la présence et la taille des protéines obtenues après transcription *in vitro* des nouveaux transcrits identifiés, ces derniers ont été clonés dans un vecteur permettant de produire des protéines chimériques possédant un tag c-myc/6xHistidine (His) en C-terminal.

#### 3.1. Clonage dans le plasmide pcDNA3.1 c-myc/6xHis

Les transcrits précédemment clonés dans des vecteurs d'expression pcDNA3.1 ou pcDNA3.3 ont été sous-clonés dans le plasmide pcDNA3.1 c-myc/6xHis en respectant la phase de lecture, et en éliminant le codon-stop (**Figure 38**). Pour ce faire, une réaction de PCR, utilisant les mêmes conditions que décrites précédemment, a été réalisée sur 100 ng de plasmide linéarisé par l'enzyme *PvuI* afin de produire l'insert en grande quantité. Les amorces utilisées sont les suivantes : CMV\_snabI\_fw (TGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA) et Dlx4\_His\_rev (TCTAGACTCGAGCGGCATCATCTGAGGCAGTGC) et contiennent des

sites de coupures enzymatiques (SnaBI et XhoI). Ces dernières reconnaissent une partie du CMV commune aux différents vecteurs, pour l'amorce sens, et la fin du transcrite de *Dlx4* qui est commune aux trois isoformes pour l'amorce antisens. À noter que le codon-stop est supprimé lors de la PCR grâce au remplacement des bases par l'amorce.



**Figure 38 | Stratégie de clonage des inserts dans le plasmide permettant l'ajout d'un tag c-myc/6xHis**

L'insert est amplifié par PCR à l'aide d'une amorce sens reconnaissant la partie CMV et à l'aide d'une amorce antisens reconnaissant la terminaison commune de *Dlx4*. Grâce aux sites de restrictions présents dans les séquences des amorces, l'insert est ensuite inséré dans le plasmide pCDNA3.1c-myc/6xHis en conservant la

### 3.2. Production et purification de la protéine taguée

Après amplification des plasmides selon les protocoles précédemment décrits, ces derniers sont transfectés transitoirement dans des cellules HEK 293FT. Pour ce faire, la transfection est réalisée dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup>, contenant 6 millions de cellules, à l'aide d'une solution de JetPEI (PolyPlus), et en suivant les instructions du fournisseur. Après 48h de culture, les cellules sont rincées et une extraction des protéines est réalisée à l'aide de 10 mL de tampon de lyse (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole; 1% Igepal® CA-630, pH 8.0) contenant 40U de benzonase (Sigma-Aldrich). L'extrait est alors conservé à – 80 °C ou immédiatement purifié à l'aide du kit Ni-NTA Spin Kit (Qiagen, Valencia, CA, États-Unis) en se basant sur le protocole fourni pour l'extraction des protéines taguées à partir de lysats d'insectes (p.25 ; Ni-NTA Spin Kit Handbook 01/2008). À la fin de la purification, les protéines sont reprises dans un volume 300 µL.

### 3.3. Analyse des protéines par western-blot

La détection et l'analyse des protéines taguées sont réalisées après migration en gel de polyacrylamide 15% suivant la technique décrite plus loin dans ce chapitre (voir §8 de ce chapitre). La révélation des membranes est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-6xHis tag (#2365, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, États-Unis) ou d'un anti-c-myc (référence 13-2500, Invitrogen) diluée au 1/1000<sup>ème</sup> tout en utilisant l'anticorps secondaire adéquat.

## 4. Activité des protéases MMP2 et MMP9 : zymographie

Après deux jours de culture en milieu complet, les cellules à confluence, sont incubées 24h dans un milieu sans sérum en présence ou en absence de traitement (par ex. : RANKL). Après cette période de culture, l'activité de MMP2 et MMP9 est analysée dans le surnageant par zymographie en gel SDS-PAGE contenant 1mg/ml de gélatine (Sigma-Aldrich). Suite à l'électrophorèse, les gels sont rincés, sous agitation, à l'aide d'une solution de 2,5% de Triton X-100 pendant 30 min. Cette opération est renouvelée une deuxième fois afin de renaturer les protéines en éliminant le SDS. Après quoi, le gel est incubé pendant 24h à 37°C dans une solution de 50 mM Tris-HCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>. Enfin, les gels sont colorés à l'aide d'une solution à 0.05 % de bleu de Coomassie G250 (20% isopropanol, 10 % acide acétique). L'activité des protéinases apparaît comme une zone incolore. Les images sont alors capturées à l'aide d'un imageur G-box (Syngene).

## 5. Migration cellulaire

Les cellules sontensemencées à une densité de  $1 \times 10^5$  cellules/ml dans la partie haute d'une chambre de Boyden (taille des pores :  $8\mu\text{m}$ ) (BD Biosciences) contenant 0,7 ml de milieu (1% SVF et 100 ng/ml de RANKL soluble ou non). La chambre de Boyden est alors immergée dans une plaque 24 puits contenant 0,7 ml de milieu complet. Après 24h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , les cellules à la surface du filtre, qui n'ont pas migré à travers le filtre, sont retirées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules restantes sont fixées à l'aide d'une solution à 1% de glutaraldehyde pendant 10 min à température ambiante. Après quoi, deux rinçages à l'aide d'une solution de PBS (pH 7,2) sont réalisés avant d'incuber les cellules durant 20 min avec une solution de cristal violet à 20% afin de les colorer. Enfin, après séchage, les cellules sont visualisées à l'objectif x10 et comptées dans 5 champs en utilisant une caméra AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Le nombre de cellules ayant migré est compté à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Rockville Pike, MA, États-Unis) et est évalué dans trois expériences indépendantes (n=6).

## 6. Etude de la prolifération cellulaire *in vitro*

Deux mille cellules sontensemencées dans des plaques de culture 96 puits, contenant le milieu de culture approprié (avec ou sans traitement). Après 48h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , la viabilité cellulaire est déterminée par un test colorimétrique grâce à l'ajout du réactif WST-1 (sel de tetrazolium) - PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara, Madison, WI, États-Unis) – sur une période de 6h. L'absorbance est lue à 490 nm sur un lecteur de plaque Wallac 1420 Victor 2 (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis).

## 7. Analyse transcriptionnelle

### 7.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN a été réalisée sur des cultures de cellules confluentes en plaques 6 puits ( $9.6\text{ cm}^2$ ). Toutes les étapes sont réalisées à  $4^\circ\text{C}$ . Le milieu de culture est d'abord retiré et un lavage avec 1 mL de PBS est opéré pour éliminer toute trace de milieu. Les cellules sont ensuite lysées directement dans le puits à l'aide d'1 mL de TRI Reagent (MolecularResearch Center Inc, Cincinnati, OH, États-Unis). Les cellules sont grattées pour faciliter la lyse puis le lysat est récupéré dans un microtube. 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme sont alors ajoutés et le tube est

retourné 4 à 6 fois afin d'homogénéiser. Après une incubation de 10 min à 4°C, puis une centrifugation à 16 000 g durant 30 min à 4°C, la phase aqueuse (phase supérieure) contenant les ARN est récupérée dans un nouveau tube, en évitant de prendre de l'ADN (galette blanche). Un volume de 500 µL d'isopropanol est ensuite additionné afin de précipiter l'ARN. L'ensemble est mélangé par retournement et incubé 1h à -80°C. Après centrifugation à 16 000 g durant 15 min à 4°C, le surnageant est éliminé en prenant soin de ne pas toucher au culot, puis 1 mL d'éthanol à 75% est ajouté pour un lavage du culot. Une nouvelle centrifugation à 16 000 g durant 15 min à 4°C est réalisée puis l'éthanol est retiré. Les culots sont mis à sécher sur glace afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Les culots d'ARN sont alors repris délicatement dans 30 µL d'eau exempte de RNase.

Après extraction, la quantité et la qualité des ARN sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND1000 (ThermoFisher Scientific). La qualité des ARN est jugée satisfaisante lorsque le ratio 260/280 est compris entre 1,8 et 2,2 et le ratio 260/230 est compris entre 2 et 2,2.

## 7.2. Reverse transcription (RT)

La réaction de réverse transcription a pour but de synthétiser les ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers (ARNm).

La réverse transcription est réalisée à l'aide du kit « Maxima H Minus First Strand cDNASynthesis Kit » (ThermoFisher Scientific). La réaction est opérée dans un volume final de 20 µL contenant 3 µg d'ARN, 100 picomol d'amorces hexamériques aléatoires « random hexamer » (transcription des ARN totaux) et 10 nmol de dNTP. Après une étape préalable de dénaturation, 5 min à 65°C, une pause de 5 min à 4°C est effectuée afin de permettre l'ajout de 4µL de RT buffer 5X et 1µL de Maxima H Minus Enzyme Mix. Puis le mélange réactionnel est placé dans un thermocycleur et le cycle suivant est appliqué : 10 min à 25°C, 30 min à 50°C, 5 min à 85°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -20 °C.

## 7.3. PCR quantitative en temps réel – technologie SYBR green (qPCR)

La PCR quantitative est une technique de PCR qui repose sur la possibilité de suivre la réaction d'amplification au cours du temps à l'aide de la fluorescence émise par un fluorochrome s'intercalant dans les doubles brins d'ADN néoformés. La fluorescence émise est me-

surée à la fin de chaque cycle. Pour déterminer la quantité d'ADN présente initialement, on détermine le nombre de cycles de PCR nécessaires pour obtenir une fluorescence supérieure au bruit de fond et dans le début de la phase exponentielle de la réaction d'amplification. Ce point particulier est appelé le Ct pour cycle seuil. Plus le cycle seuil sera faible, plus la quantité d'ADN présente au départ sera élevée.

### 7.3.1. Approche expérimentale

Les PCR sont effectuées dans un volume total de 10  $\mu\text{L}$  en utilisant 2  $\mu\text{L}$  d'ADNc dilué au 1/6ème, 5 pmol/ $\mu\text{L}$  de chaque amorce ainsi que 7,5  $\mu\text{L}$  de iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad, Richmond, CA, États-Unis). Les amorces utilisées pour les réactions de qPCR sont fournies en annexe (**Annexe 2** ; **Annexe 3**). Un échantillon standard (embryon, lignée de référence), de concentration connue, ayant subi la même réaction de RT, que les échantillons d'intérêts, est dilué au demi (1/2) puis en une série de 5 tubes avec une raison au 1/2.5 afin d'obtenir une droite de référence (étalon) pour la quantification tenant compte de l'efficacité de la PCR.

La qPCR débute par une étape de dénaturation pendant 10 minutes à 98°C. Ensuite 40 cycles d'amplification comportant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 15 secondes à 59°C et une phase d'élongation de 20 secondes à 72°C sont réalisés. Une mesure de la fluorescence est effectuée après chaque étape d'élongation. Enfin, pour vérifier la spécificité de la PCR, une courbe de fusion est réalisée. Celle-ci correspond à une montée progressive de la température de 50°C à 95°C avec lecture de la fluorescence tous les 0,5°C. Dans cette approche les gènes de la  $\beta$ -actine (ACTB) et de la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) ont été utilisés comme contrôles endogènes. En effet, leur expression est considérée constante dans les différents échantillons.

### 7.3.2. Exploitation des résultats

L'exploitation des résultats a été réalisée par la méthode de quantification relative par courbe étalon. Pour chaque point de gamme, la valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle. Les valeurs obtenues permettent de tracer la droite Log (quantité) en fonction de la valeur du Ct. Les valeurs des Ct de chaque échantillon sont alors converties en quantité grâce à la droite étalon.

## 8. Etude de l'expression protéique

### 8.1. Extraction des protéines

Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits afin d'obtenir une confluence au bout de 48h. En cas de traitements, ces derniers sont ajoutés au milieu de culture après 24h. Après un lavage au PBS, les cellules sont lysées à l'aide du tampon MPER (ThermoFisher Scientific) additionné extemporanément du cocktail d'inhibiteurs Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (ThermoFisher Scientific), selon les procédures décrites par le fournisseur. Les extraits protéiques sont ensuite dosés à l'aide du kit BCA (Sigma-Aldrich). Pour ce faire, dans une plaque 96 puits, 10 µL de lysat protéique dilué au 1/10<sup>ème</sup> sont mélangés à 200µL de réactif BCA (sulfate de cuivre dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans une solution d'acide bicinchoninique).

### 8.2. Western-blot

L'analyse des échantillons protéiques est réalisée par western-blot sur 40µg de lysat protéique total (ou bien 60 µL de protéine histidine purifiée). Les échantillons sont dilués dans un tampon Laemmli 4x, portés à ébullition 5 min à 95°C, puis chargés sur un gel de polyacrylamide dont le pourcentage varie en fonction de la protéine d'intérêt (8% pour RANK, 12 à 15 % pour les isoformes de DLX4).

Après quoi, une électrophorèse d'environ 2h à 20 milliA/gel est effectuée afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une fois, la migration des protéines terminées (tampon de migration : 25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0,1% Sodium Dodécyl Sulfate), ces dernières sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinyliDeneFluoride ; Millipore) en utilisant un système de transfert liquide. Pour ce faire, le montage est placé dans une cuve contenant le tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% méthanol) et un courant de 100 milliA/cuve est appliqué pendant deux heures à 4°C (rq : pour les petites protéines, le transfert est réalisé sur la nuit à 40 milliAmpère/cuve).

Une fois le transfert terminé, les membranes sont rincées plusieurs fois en PBS-Tween 0,05%, puis saturées à l'aide d'une solution de blocage (Odyssey Blocking Buffer ; Li-cor, Lincoln, NE, États-Unis) pendant 30 min sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées sur la nuit (à 4°C) avec l'anticorps primaire (**Tableau 16**) dilué dans la solution de blocage. Après plusieurs lavages au PBS-Tween 0,05%, les membranes sont incubées durant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Li-cor) ou à la HRP (Santa Cruz Biotechno-



logy Inc, Dallas, TX, États-Unis), dilués dans le tampon de blocage, et dirigés contre l'espèce de l'anticorps primaire. Les membranes sont ensuite lues et analysées à l'aide de l'imageur Odyssey® Fc (Li-cor). Cet appareil est capable d'acquérir la fluorescence, comme la chimiluminescence.

	Espèces reconnues	Référence	Fournisseur	Dilution
<b>RANK</b>	humain	AF-683	R&D systems	1 / 2000
<b>total p38</b>	humain, souris	9212	CST	1 / 1000
<b>phospho p38 (Thr180/Tyr182)</b>	humain, souris	9211S	CST	1 / 1000
<b>total ERK</b>	humain, souris	9102S	CST	1 / 1000
<b>phospho-ERK (Thr202/Tyr204)</b>	humain, souris	9101S	CST	1 / 1000
<b>GAPDH</b>	humain, souris	2118S	CST	1 / 1000
<b>β-actine</b>	humain, souris	A5060	Sigma	1 / 1000
<b>His-tag</b>	-	2365S	CST	1 / 1000

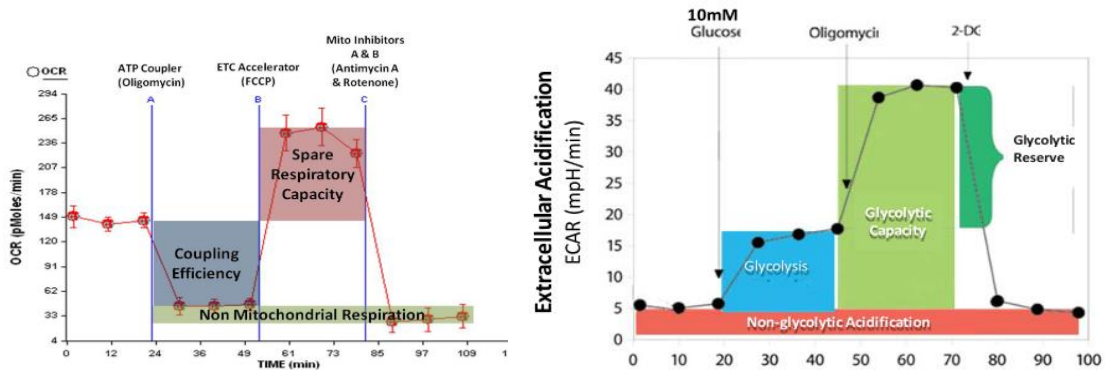
Tableau 16 | Listes des anticorps primaires utilisés en Western-blotting

## 9. Cytométrie en flux

Différents marquages ont été analysés par cytométrie en flux (RANK, CD3). Les étapes nécessaires à ces marquages sont décrites ci-dessous et sont toutes réalisées à 4°C et suivies d'une centrifugation de 2 min à 1500g. 100 000 cellules, préalablement récoltées ou purifiées, sont culotées dans une plaque 96 puits à fond conique. Après plusieurs lavages avec une solution de PBS, les cellules sont incubées pendant 15 min avec une solution de blocage (PBS supplémenté avec 10 % de SVF ou Human BD Fc-Block (BD Biosciences)). S'ensuivent plusieurs lavages à l'aide d'une solution de PBS supplémentée en SVF (10%) avant d'incuber les cellules pendant 30 min avec l'anticorps primaire directement couplé à un fluorochrome. Pour finir, après de nouveaux lavages, les cellules sont resuspendues dans une solution de PBS afin d'être analysées à l'aide du cytomètre FC500 (Beckman Coulter), suivant les recommandations du fournisseur.

## 10. Etude du métabolisme énergétique

Une première étude du métabolisme énergétique a été initiée en collaboration avec le Dr. Claire PECQUEUR, de l'unité INSERM U892 de Nantes (les détails techniques ne seront pas abordés). Les tests de cette étude reposent sur l'utilisation des kits « XF cell mito » et « XF glycolysis stress » (Agilent, Santa Clara, CA, États-Unis). Les mesures sont acquises et analysées à l'aide d'un analyseur XFe24 Analyser (Agilent). Le principe de ces tests repose sur la mesure de la vitesse de consommation d'oxygène (OCR : oxygen consumption rate) et sur la vitesse d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR : Extracellular Acidification rate) en fonction de l'ajout de différents inhibiteurs des voies étudiées (**Figure 39**). Ainsi, ces kits permettent l'étude de la phosphorylation et de la glycolyse.



**Figure 39 | Exemple de résultats pour l'étude de la phosphorylation oxydative (A) et de la glycolyse (B)**

L'ajout progressif d'inhibiteur permet d'étudier les paramètres clés de ces deux voies.

### 10.1. Etude de la phosphorylation

Les cellules sont placées dans un milieu spécifique contenant du glucose, du pyruvate et de la glutamine. Puis, les inhibiteurs suivants sont ajoutés de façon progressive :

- Poligomycine inhibe l'ATP synthétase (complexe V) en bloquant le flux de protons,
- le FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) est un agent découplant conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale,
- l'antimycine et la roténone sont des inhibiteurs des complexes I et III respectivement.

## 10.2. Etude de la glycolyse

Les cellules sont conditionnées dans un milieu spécifique contenant comme unique source d'énergie de la glutamine (absence de glucose et de pyruvate). Du glucose est ajouté après le début de l'expérience, puis les inhibiteurs suivants sont ajoutés de façon progressive :

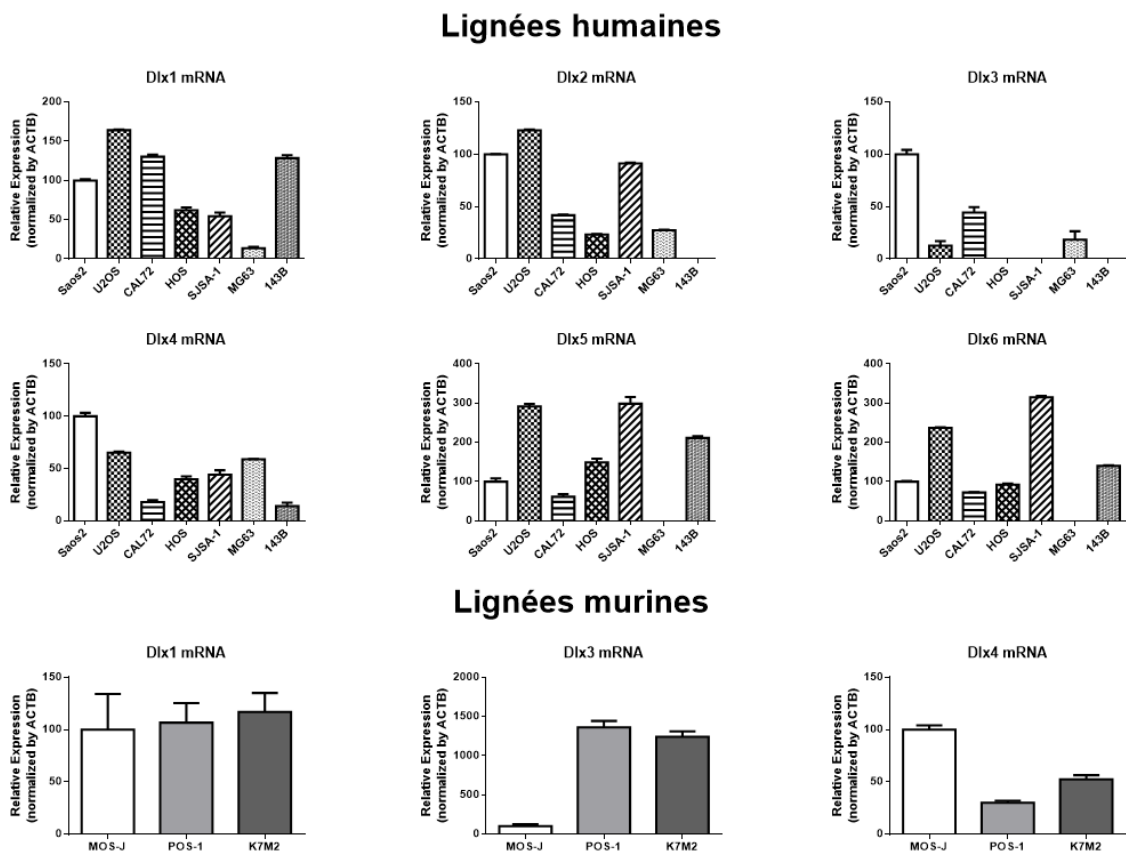
- l'oligomycine,
- le 2-DG (2-Deoxy-D-glucose) qui est un analogue du glucose permettant d'inhiber la glycolyse.

## IV- Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, États-Unis). Pour les expériences *in vivo*, les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  standard error of mean (SEM). Pour les expériences *in vitro*, un test de Student non apparié a été réalisé. Les résultats sont présentés sous forme moyenne  $\pm$  standard deviation (SD). Les résultats sont considérés comme significatifs pour  $p < 0,05$ . (\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

**Partie I :**  
**Etude de l'implication des *Dlx* dans**  
**la physiopathologie de**  
**l'ostéosarcome**

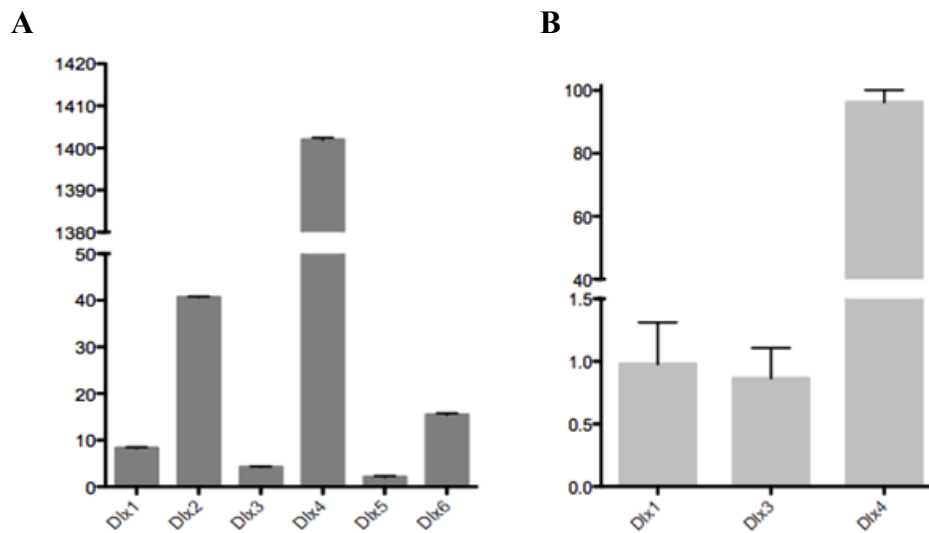
Une étude préliminaire du laboratoire portant sur l'expression des gènes de la famille *Dlx* dans différentes lignées d'ostéosarcomes a permis d'affiner l'hypothèse selon laquelle les gènes *Dlx* pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'ostéosarcome. En effet, les résultats obtenus ont montré que les six gènes *Dlx* étaient exprimés dans les lignées humaines (**Figure 40**) et que *Dlx1*, *Dlx3* et *Dlx4* l'étaient dans les lignées murines (**Figure 40**). L'expression de *Dlx1* et *Dlx4* dans l'ensemble des lignées testées est « anormale » puisque ces gènes ne sont pas exprimés au cours de l'ostéoblastogenèse physiologique (**Figure 30**), et très peu exprimée dans les différents tissus adultes.



**Figure 40 | Expression des gènes de la famille *Dlx* dans les différentes lignées d'ostéosarcomes du laboratoire**

Les résultats sont normalisés par rapport à la  $\beta$ -actine et ils sont rapportés à l'expression dans les cellules SaOS2 pour les cellules humaines et à celle des cellules MOS-J pour les cellules murines.

Au-delà de ces résultats, une analyse plus précise (lignées SaOS2 et MOS-J) a permis de mettre en évidence une expression plus importante du transcrit de *Dlx4* comparativement aux autres gènes *Dlx* (**Figure 38**).

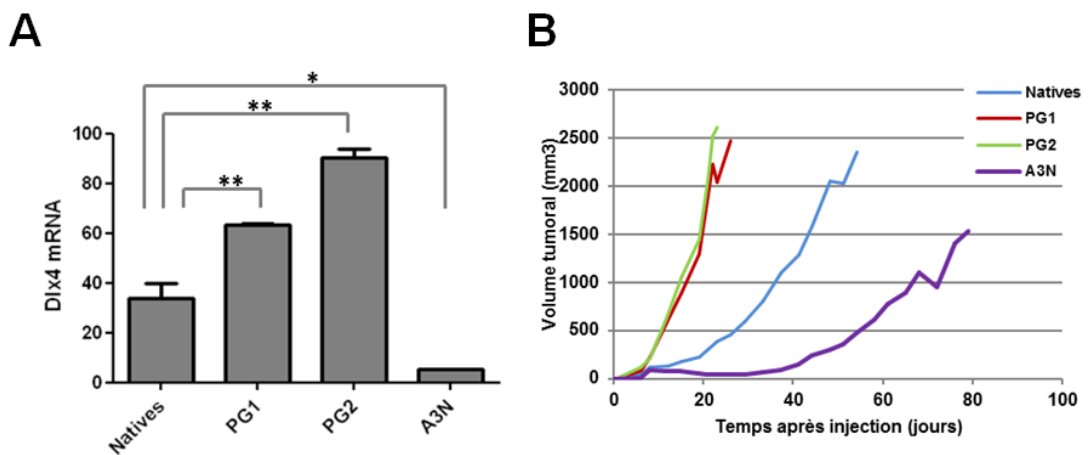


**Figure 41 | Expression relative des gènes de la famille *Dlx* dans deux lignées de références d'ostéosarcomes du laboratoire**

L'expression relative des différents *Dlx* a été analysée dans la lignée humaine SaOS2 (A) et dans la lignée murine MOS-J (B) par qPCR.

Ces observations ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle *Dlx4* pourrait être impliqué dans les processus de prolifération tumorale, de néoapposition ostéoïde et/ou d'ostéolyse péri-tumorale. Consécutivement notre étude s'est principalement focalisée sur le gène *Dlx4*.

Afin de déterminer son implication dans la prolifération tumorale, une première approche consistant à utiliser des sous-clones (PG1, PG2 et A3N) dérivés de la lignée MOS-J avec différents niveaux d'expression de *Dlx4* a été concluante (**Figure 42**). En effet, dans cette expérience, une corrélation entre le niveau d'expression de *Dlx4* et la vitesse de prolifération a pu être observée *in vivo* comme *in vitro*.



**Figure 42 | Données préliminaires concernant l'implication de *Dlx4* dans la prolifération tumorale**

Expression de *Dlx4* (A) et suivi tumoral *in vivo* (B) des différents clones dérivés des cellules MOS-J.

L'objectif des travaux présentés dans cette partie était dans un premier temps de valider l'implication de *Dlx4* dans la prolifération tumorale puis dans un second temps d'analyser l'éventuelle implication de *Dlx4* dans la néoformation osseuse tumorale et le « contrôle » de l'ostéolyse péri-tumorale. La comparaison de sous-clones MOS-J avec des taux d'expression de *Dlx4* différents n'étant pas suffisante à la démonstration, la stratégie expérimentale a consisté à surexprimer *Dlx4* dans le sous-clone ayant la plus faible expression, et à invalider l'expression de *Dlx4* dans le sous-clone ayant la plus forte expression, puis à analyser *in vitro* et *in vivo* les effets obtenus comparativement aux cellules non modifiées.

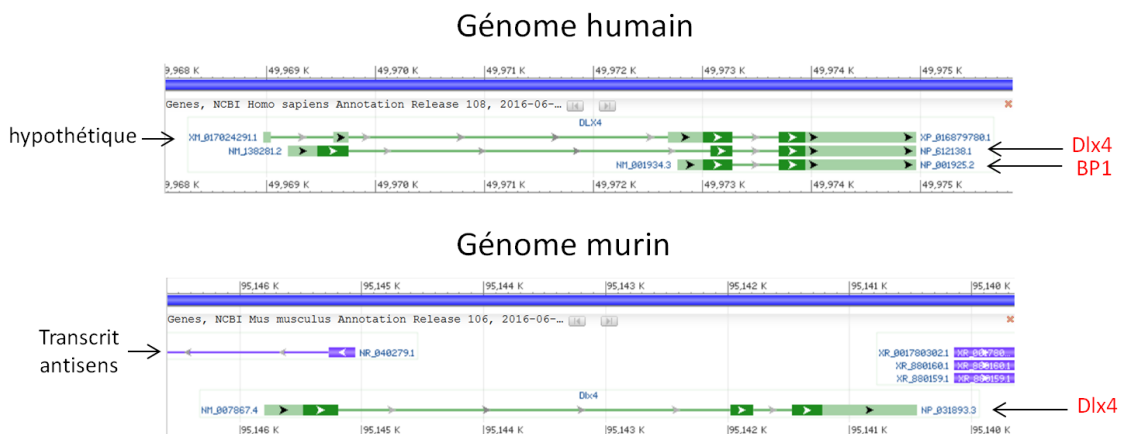
Pour ce faire, il était nécessaire dans un premier temps de créer les outils permettant de surexprimer ou d'inhiber *Dlx4* dans les lignées tumorales, mais également de caractériser de façon plus précise l'organisation génomique du gène *Dlx4* chez la souris. En effet, le gène *Dlx4* code pour deux isoformes chez l'homme : *Dlx4* et *BP1* [476].



## I- Caractérisation du système *Dlx4* chez la souris

L'organisation génomique du système *Dlx4* est encore mal connue. En effet, bien que chez l'homme, la présence de deux transcrits codant pour les protéines DLX4 et BP1 soit bien définie, il semblerait qu'il existe d'autres transcrits (variants) hypothétiques comme le montrent les annotations (expérimentales ou prédictives) présentes dans la base de données du National Center for Biotechnology information (NCBI) (**Figure 43**), et dans les différents navigateurs de génome comme Ensembl ou Vega.

Chez la souris (**Figure 43**), les données actuelles décrivent seulement un seul transcrit codant pour la protéine DLX4. Aucune donnée sur la présence de BP1 n'existe. Cependant, plusieurs annotations et données expérimentales suggèrent l'existence d'un transcrit antisens de *Dlx4*.

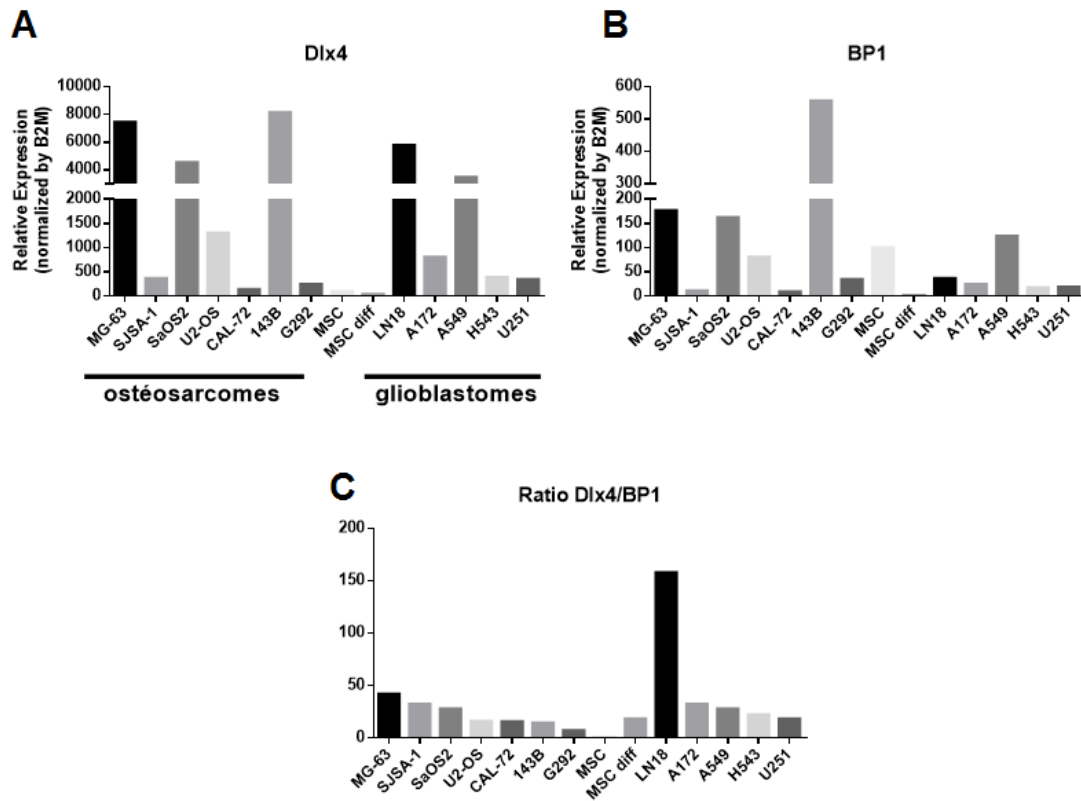


**Figure 43 | Annotations des gènes *Dlx4* humain et murin présentes dans la base de données du NCBI**

Chez l'homme, la présence de deux transcrits codant pour DLX4 et BP1 est mise en évidence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1748>). Chez la souris, un seul transcrit codant pour DLX4 est présent (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13394>). Informations consultées en août 2016.

Un screening des transcrits *Dlx4* et *BP1* dans plusieurs lignées (ou cultures primaires) d'ostéosarcomes et de glioblastomes révèle que *Dlx4* et *BP1* sont exprimés de façon importante dans l'ensemble des échantillons analysés comparativement aux cellules souches mésenchymateuses différenciées ou non (**Figure 44**). Ainsi, l'étude de l'implication de *Dlx4* dans la physiopathologie de l'ostéosarcome à l'aide de modèles de cellules murines nécessitait dans un pre-

mier temps de valider l'existence de la protéine BP1 chez la souris. Pour cela, la recherche de transcrit a été entreprise par des techniques de RACE-PCR, de PCR « glissante » et d'hybridation (Northern-Blot).



**Figure 44 | Expression de *Dlx4* et de *BP1* dans des lignées et cultures primaires d'ostéosarcomes et de glioblastomes**

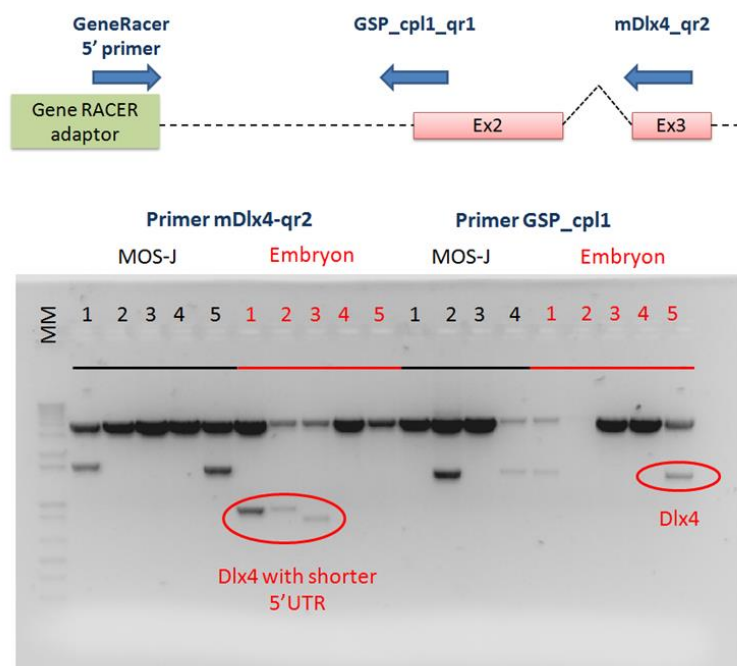
Les expressions de *Dlx4* (A) et *BP1* (B) sont normalisées par rapport à la  $\beta$ -2-microglobuline et rapportées à l'expression dans les cellules souches mésenchymateuses non différenciées. Le ratio de l'expression de *Dlx4* sur celle de *BP1* est également représenté (C).

## 1. Identification de nouveaux transcrits de *Dlx4* chez la souris

### 1.1. Race-PCR

Plusieurs expériences de RACE-PCR ont été réalisées afin d'identifier de nouveaux transcrits pour le gène *Dlx4* murin. Pour ce faire, des échantillons d'ARN d'embryon de souris C57BL/6JRj et de cellules MOS-J ont été utilisés.

L'expérience de 5' RACE visant à mettre en évidence de nouveaux transcrits de par leur site d'initiation en 5' de l'exon 2 a été réalisée à l'aide de deux amorces antisens différentes. Une amorce située dans l'exon 3, (mDlx4\_qr2 ; 5' CTGGGGTAGACCCCAGATGA 3') afin de reconnaître toutes les formes potentielles de *Dlx4*, et une amorce chevauchant la jonction Intron 1 – Exon 2, (GSP\_cpl1\_qr1 ; 5' CTGGGAGGCAGAAGAACAATAAGC 3') afin de favoriser la découverte de BP1 dans le cas où cette isoforme présenterait la même structure que chez l'homme. Après clonages, plusieurs clones ont été obtenus (**Figure 45**) et purifiés afin d'être séquencés.

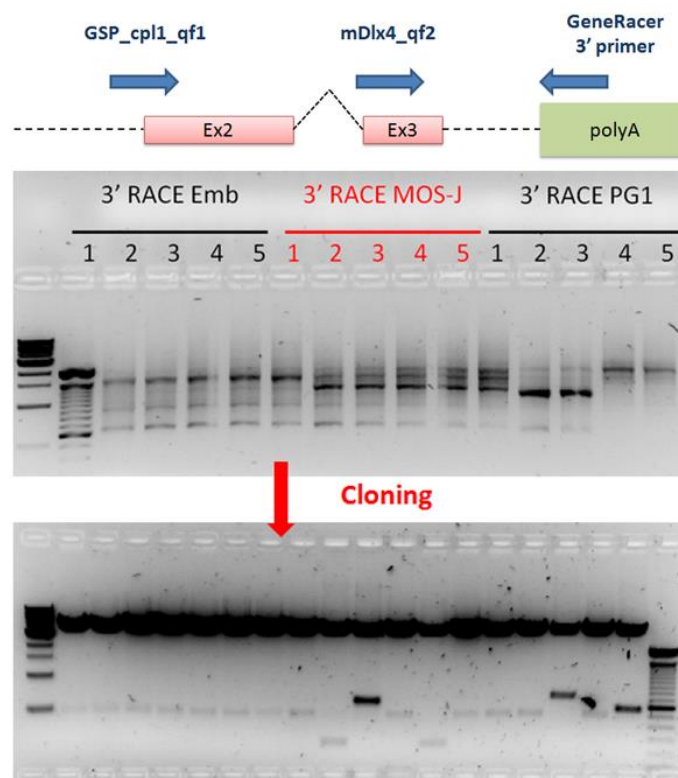


**Figure 45 | Clones obtenus à l'issue de l'expérience de 5' RACE**

Après l'étape de 5'RACE, des PCRs sont réalisées sur l'échantillon d'ADNc-RACE avec différentes amorces de séquences connues. Le produit de PCR est alors cloné par TA cloning et les différents clones obtenus sont purifiés et envoyés à séquencer.

Parmi les séquences reçues, plusieurs clones contenaient une partie seulement de la séquence de l'ornithine décarboxylase, dû au chevauchement en 3' de quelques nucléotides de l'amorce antisens GSP\_cpl1\_qr1. Néanmoins, les autres clones obtenus notamment avec l'amorce antisens mDlx4\_qr2 ont fourni des résultats plus concrets en identifiant plusieurs transcrits de *Dlx4* avec des 5'UTR (untranslated region) plus ou moins longs. Cependant, les clones analysés n'ont pas permis de mettre en évidence une forme BP1.

Concernant l'expérience de 3' RACE, permettant de déduire l'extrémité 3' des transcrits, celle-ci a été réalisée sur les mêmes ARN (avec en plus des ARN de cellules PG1) en utilisant deux amorces sens différentes. La première amorce est située au sein de l'exon 3 de *Dlx4* (mDlx4\_qf2 ; 5'AGCTCCAACACCTGAACCAG 3') et la deuxième chevauche l'intron 1 et l'exon 2 (GSP\_cpl1\_qf1 ; 5'GCTTAGTGTTCTTCTGCCTCCCAG 3').



**Figure 46 | Clones obtenus à l'issue de l'expérience de 3' RACE**

Après l'étape de 3'RACE, des PCRs sont réalisées sur l'échantillon d'ADNc-RACE avec différentes amorces de séquences connues. Le produit de PCR est alors cloné par TA cloning et les différents clones obtenus sont purifiés et envoyés à séquencer.

Parmi tous les clones obtenus par cette expérience, aucun résultat probant n'est ressorti mise à part la séquence du gène *Dlx4*, confirmant ainsi que les différentes isoformes de *Dlx4* possèdent la même terminaison (**Figure 46**).

## 1.2. PCR glissante

Dans un objectif similaire, l'identification de nouveaux transcrits a été abordée en réalisant des expériences de PCR glissantes. Pour ce faire, afin d'identifier de nouvelles extrémités 5', les PCRs ont été réalisées en prenant une amorce antisens commune (l'amorce mDlx4\_qr2) à toutes les réactions de PCR et une série d'amorces sens (**Tableau 17**). Cette série a été dessinée, en se basant sur la séquence génomique de *Dlx4*, dans la région en amont de l'exon 2 de *Dlx4*, sur une zone de 1200 pb en essayant d'espacer les amorces d'environ 200 pb à chaque fois. Après migration des différents produits de PCR réalisées sur des cDNA d'embryon, la courbe Log(nbr de base) en fonction de la distance de migration a été tracée afin de permettre de déterminer précisément la taille des différents fragments observés.

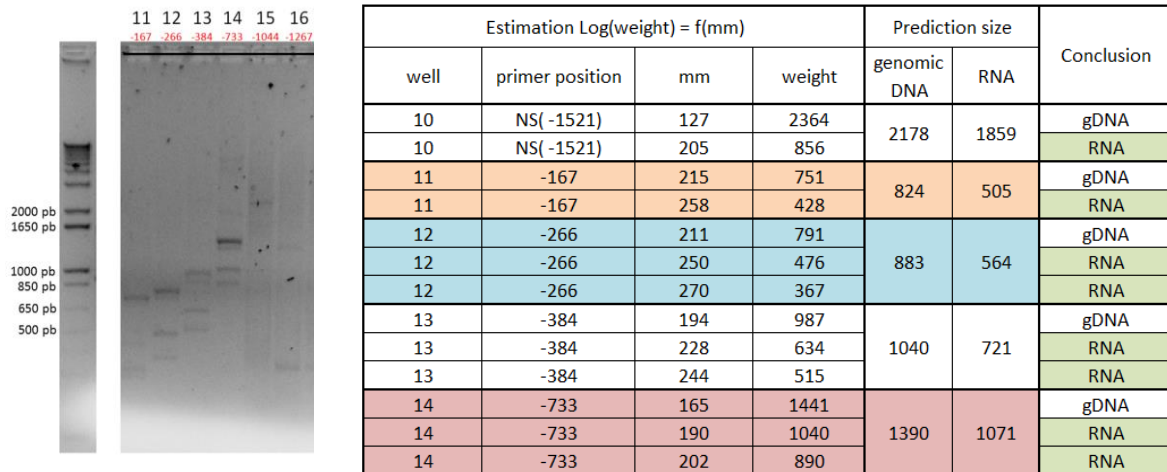
Position (Nom)	Séquence
-167	5' CAAGGCTTGTTCCACTGCAC 3'
-266	5' AGAACTCAAGAGCTGAAGCTTGAT 3'
-384	5' GCTCAGCTCTCCACGAGTCTTTGC 3'
-733	5' AGTCTCAGTATCCATAAAGTGGTC 3'
-1044	5' CCAGGGGACAGGATTTGAGGACC 3'
-1267	5' GAGTTCAGCAGTCCAGGCTGTCTTCC 3'
NS (-1521)	5' ATTGGAGTACGAGAGAGGGCTT 3'
mDlx4-Qr2	5' CTTGGGTAGACCCAGATGA 3'

**Tableau 17 | Listes des amorces utilisées pour la PCR glissante en 5'**

Ainsi, dans les puits 11 à 14 (**Figure 47**), un fragment correspondant à la taille attendue pour l'ADN génomique est bien observé à des tailles respectives d'environ 751, 791, 987 et 1441 pb (pour des tailles prédictives de 824, 883, 1040 et 1390 pb). En supposant que l'intron 2 de *Dlx4* murin, d'une taille de 319 pb, soit « splicer » comme pour la forme humaine de *BP1*, le transcrit murin devrait se trouver dans ces mêmes puits à une taille de 505, 564, 721 et 1071 pb. C'est bien ce qui est observé, puisqu'une bande est retrouvée constamment sous la bande d'ADNg dans les puits 11 à 14 avec une différence de taille constante d'environ 319 pb. De plus, la détermination de la taille de ces bandes (428, 476, 634 et 1040 pb) est proche des valeurs théoriques. À partir de la position -733 en amont de l'exon 2, aucune trace de *BP1* n'est

détectée, ce qui signifie que le début de la transcription de cet ARN se situerait entre -1044 et -733 pb avant l'exon 2.

De façon intéressante, une autre bande est observée dans ces puits avec une taille inférieure à celle de l'ADNg et du transcrit de *BP1*. Cette bande est présente de façon constante et posséderait une centaine de paire de bases de moins que *BP1*. Ce nouveau transcrit sera nommé *BP2*.



**Figure 47 | Produits obtenus à l'issue de la PCR glissante en 5'**

Chaque réaction de PCR a été réalisée avec une amorce antisens commune et une amorce sens prise dans l'intron1. Après migration, une estimation de la taille des fragments est réalisée et les données mesurées sont fournies dans la table ci-dessus.

Afin d'aller plus loin dans cette analyse, la recherche de la terminaison de ces transcrits a été entreprise en réalisant la même expérience en 3'. Pour ce faire, sur la base des informations obtenues, deux amorces sens situées dans la fin de l'intron 1 ont été utilisées (-733\_qf et mBP1\_dect\_fw), ainsi que de multiples amorces antisens prises dans la fin de l'exon 3 et de la région 3'UTR de *Dlx4* (**Tableau 18**). La position relative de ces amorces est donnée par rapport à la position du codon-stop de *Dlx4*. Ainsi l'amorce +200\_rev est prise à 200 pb de base en aval du codon-stop, les amorces -113, -440 et -796 sont prises en amont du codon-stop. Enfin, une amorce est prise à la fin de la région 3'UTR de *Dlx4*.

Position (Nom)	Séquence
mBP1_Intron-733	5' AGTCTCAGTATCCCATAAAGTGGTC 3'
mBP1_dect_fw	5' GGATGCGATGAGCTTATTAAG 3'
+200_rev	5' CAATATTCTCATAACAGACAT 3'
primer_fin_utr	5' ACCTCCAGCAGGTCACCTTCTT 3'
-113_rev	5' TTCTGGGCTTCCAACAATGTGTGC 3'
-440_rev	5' TGTTCCTGGAAGGGCTGTCTG 3'
-796_rev	5' TCACATCATCTGAGGCAGTG 3'
mDlx4-Qr2	5' CTTGGGTAGACCCAGATGA 3'

Tableau 18 | Listes des amorces utilisées pour la PCR glissante en 3'

Les résultats obtenus avec l'amorce -700\_qf (**Figure 48**) montrent que les différents transcrits identifiés préalablement ont tous la même terminaison. En effet, la migration des différents produits de PCR met en évidence trois bandes, dont la plus haute est celle correspondant à l'ADN génomique, qui sont toutes retrouvées aux alentours des tailles prédites, et ce avec un espacement constant. Il est à noter que les amorces situées en aval de la terminaison de *Dlx4* n'ont reconnu aucune séquence, cela signifie donc que les transcrits *BP1* et *BP2* ont la même terminaison que *Dlx4*.

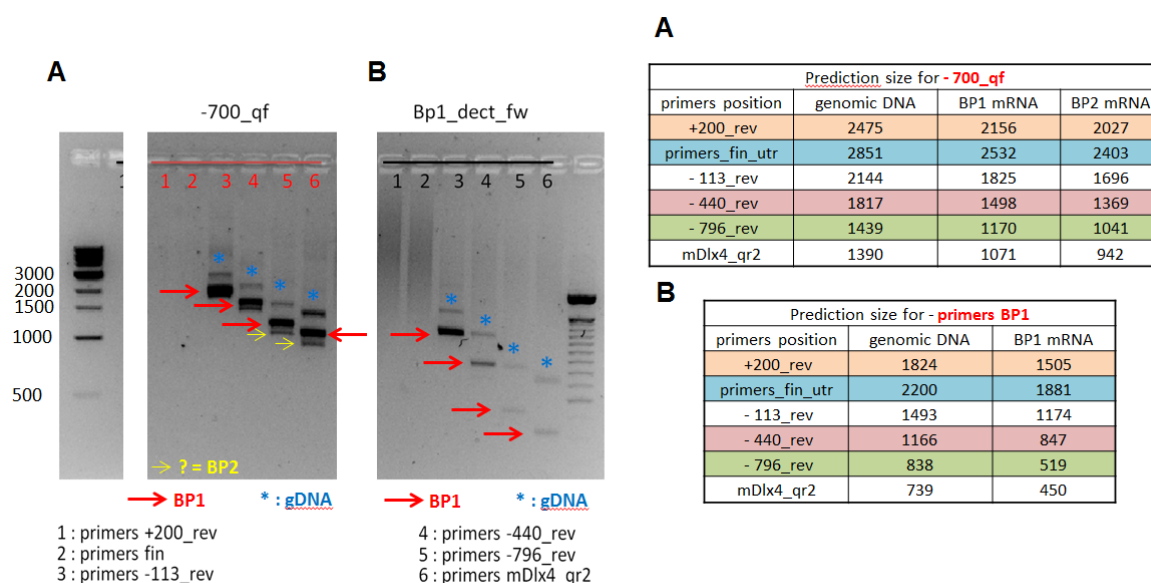


Figure 48 | Produits obtenus à l'issue de la PCR glissante en 3'

Les réactions ont été réalisées à chaque fois avec une amorce sens commune, soit l'amorce -700\_qf (A) ou Bp1\_dect\_fw (B), et plusieurs amorces antisens prises dans la fin de l'exon 3 et dans la région 3'UTR de *Dlx4*.



Concernant les résultats obtenus avec la seconde amorce sens (mBP1\_dect), il s'avère que seul BP1 est détecté. Ceci suggère que cette amorce se situe dans un exon de BP1, mais potentiellement dans un splicing de BP2.

Les produits de PCR obtenus avec les amorces -700\_qf et -113\_rev ont été clonés par TA cloning, et ce afin d'être isolés et amplifiés pour permettre le séquençage des transcrits *BP1* et *BP2*. Les résultats obtenus (**Figure 49**) confirment les prédictions, c'est-à-dire que *BP1* correspond à un transcrit qui conserve au moins les 700 dernières bases de l'intron 1 de *Dlx4* et la terminaison exon2-exon3 de *Dlx4* (c'est-à-dire avec un splicing de l'intron 2 de *Dlx4*). Pour *BP2*, la séquence obtenue montre que la forme *BP2* est identique à la forme *BP1* à l'exception d'un splicing de 129 pb juste avant le début de l'exon 2 de *Dlx4*.



**Figure 49 | Séquences nucléotidiques des transcrits *BP1* et *BP2***

La séquence présentée, ci-dessus, dans son intégralité correspond à la séquence du transcrit *BP1*. La séquence de *BP2*, elle, correspond à la même séquence déletée des 129 pb soulignées et en italique. Ces deux transcrits conservent l'intégralité des exons 2 et 3 de *Dlx4*.



### 1.3. Northern Blot

Un northern-blot a été réalisé sur différents échantillons d'ARN d'embryon (E12.5 ; E14.5) et de cellule MOS-J. Après migration et transfert, les blots ont été révélés à l'aide d'une sonde reconnaissant l'ensemble de la forme longue de *Dlx4* ou d'une sonde reconnaissant seulement la partie Ex2/Ex3. Les résultats obtenus semblent mettre en évidence plusieurs transcrits (**Figure 50**). D'une part, la détection d'une bande à environ 2,5 kb confirme la présence de *Dlx4* dans les cellules MOS-J. En effet, la taille théorique du transcrite est de 2,3 kb. D'autres parts, plusieurs bandes sont observées aux alentours de 1,4/1,6 kb suggérant la présence d'autres transcrits. Il pourrait s'agir de *BP1* pour la première forme, puisque le transcrite *BP1* humain à une taille théorique de 1,4 kb. La deuxième forme pourrait être *BP2*.

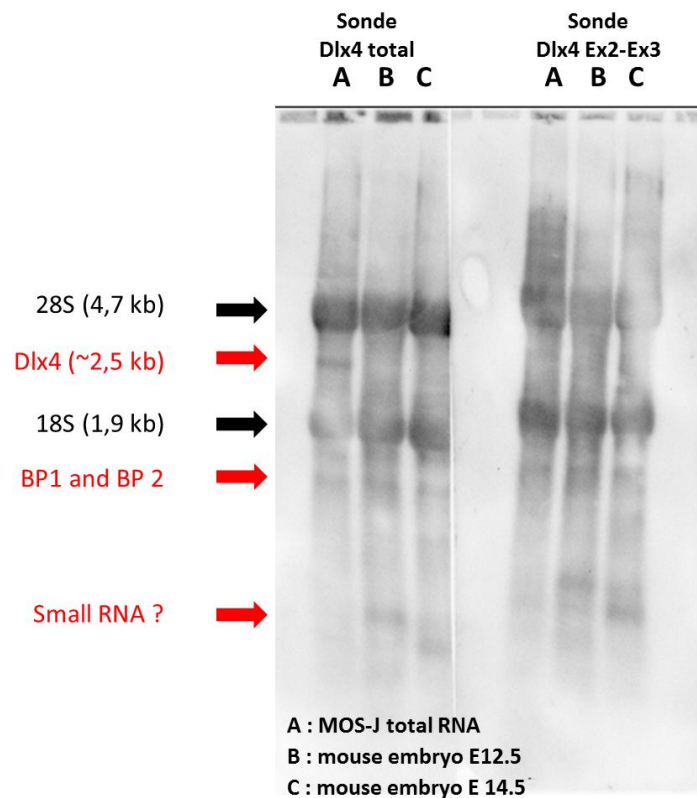
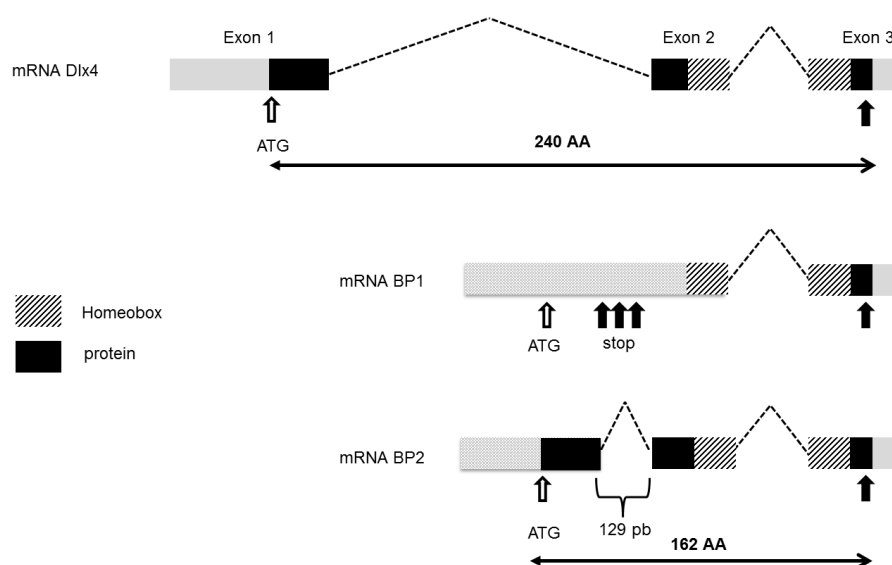


Figure 50 | Northern Blot révélé avec des sondes reconnaissant toutes les formes de *Dlx4*

#### 1.4. Prédictions bioinformatiques de l'organisation des transcrits

Sur la base des données de séquençages obtenues après la technique de PCR « glissante », des prédictions de phases ouvertes de lecture ont été réalisées à l'aide de l'outil ORF finder (NCBI). Ces prédictions ont permis de déterminer une organisation des transcrits *BP1* et *BP2* (**Figure 51**).



**Figure 51 | Structures des transcrits BP1 et BP2 et des protéines codées**  
Prédiction des phases ouvertes de lecture à partir des transcrits de *Dlx4*

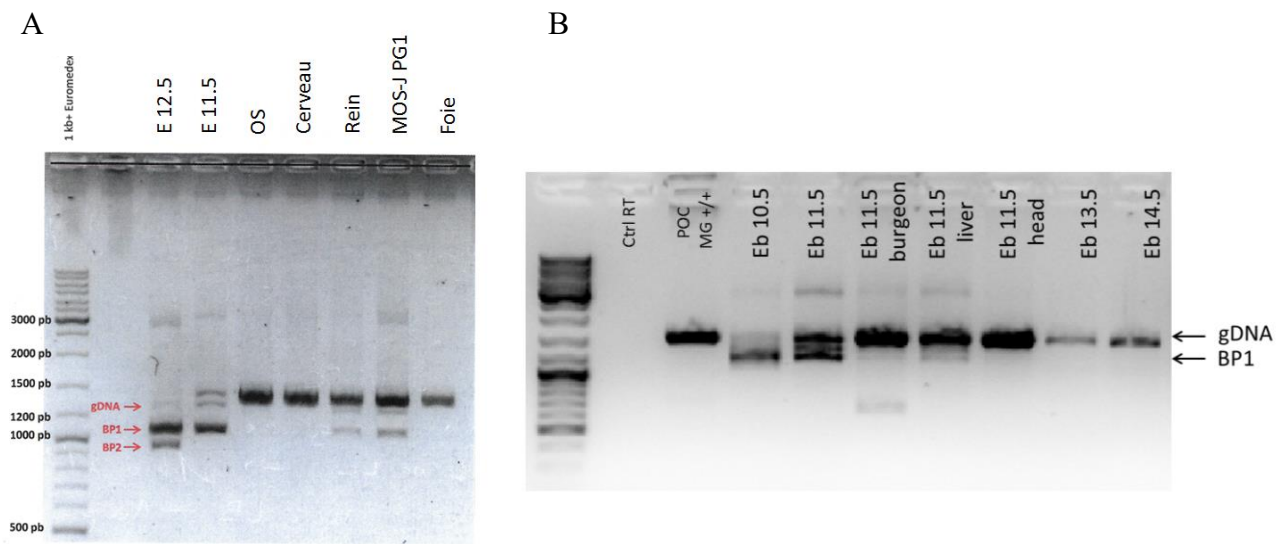
Ces prédictions semblent indiquer que le transcrypt *BP2* a la capacité de coder pour une protéine de 162 acides aminés qui conserve l'homéodomaine de DLX4. D'après ces mêmes prédictions, il s'avère que la forme *BP1* ne coderait à priori pour aucune protéine, puisque son initiation (à l'aide du même codon que *BP2*), est stoppée par plusieurs codon-stop. Ces codons étant présents dans le splicing de 129 pb, cela permet d'obtenir *BP2*, suggérant l'idée que *BP1* puisse être une forme de pré-messager de *BP2*. Les séquences des protéines *BP1* et *BP2* sont fournies ci-dessous (**Tableau 19**).

	Séquence protéique
BP1	MAGIGKACSTAHTHRDSGStopStopStop
BP2	MAGIGKACSTAHTHRDSESEKLALSLVPSQQQSLTRKLRK <u>PRTIYSSLQLQHLNQRFOHT</u> <u>QYLALPERAQLAAQLGLTQTQVKIWFQNKRSKYK</u> KLKQSSGEPEEDFSGRPPSLSPHSP ALPFIWGLPKADTLPSSGYDNSHFGAWYQHRSPDVLLALPQMM

**Tableau 19 | Séquences protéiques de BP1 et BP2**

## 2. Screening de tissus et de lignées cellulaires pour l'expression de *BP1* et *BP2*

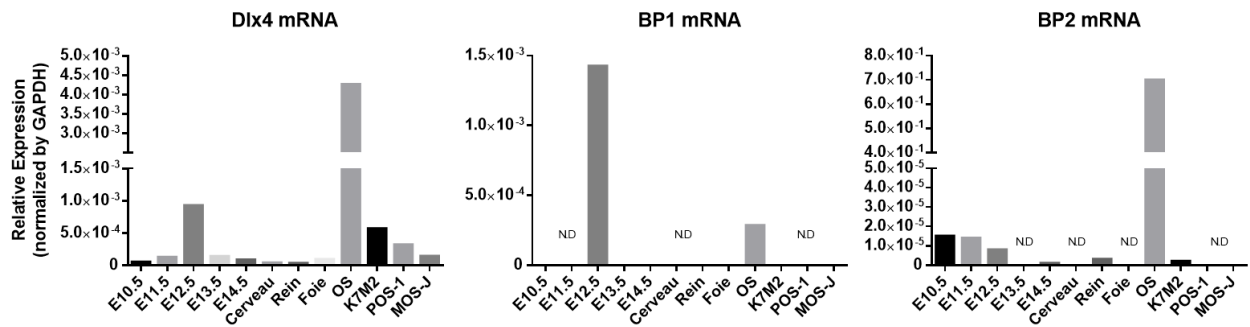
L'analyse de plusieurs échantillons d'extraits d'embryons, de tissus ou de cellules a permis de mettre en évidence que *BP1* est principalement exprimé de façon stade spécifique à E10.5 ; E11.5 et E12.5 (**Figure 52**). En ce qui concerne *BP2*, il est retrouvé seulement à E12.5. Par ailleurs, *BP1* serait également exprimé dans les cellules MOS-J PG1, K7M2 et POS-J (résultats non montrés). Aucune autre détection de *BP2* n'a été faite dans ces différents échantillons. Un screening plus large, notamment par PCR quantitative, d'une multitude de tissus et de lignées serait nécessaire afin d'avoir un aperçu de l'expression de ces transcrits.



**Figure 52 | Analyse de la présence des transcrits de *BP1* et *BP2* dans divers tissus et cellules par PCR standard**

Des PCR ont été réalisées à l'aide de l'amorce sens -700\_fw et de l'amorce antisens mDlx4\_qr2 utilisées pour l'expérience de PCR glissante.

Les échantillons étudiés par PCR standard ont ensuite été analysés par PCR quantitative. Les données recueillies montrent que *Dlx4* est exprimé de façon très faible dans la majorité des tissus analysés et de façon plus importante dans l'os (moelle osseuse incluse) et dans l'embryon avec un pic d'incidence à E12.5 (**Figure 53**). Confirmant les analyses préliminaires, la présence de *Dlx4* est relevée dans les trois lignées murines d'ostéosarcomes (K7M2, POS-1, MOS-J).



**Figure 53 | Analyse transcriptionnelle des transcrits *Dlx4*, *BP1* et *BP2* dans divers tissus et cellules**

Des PCR ont été réalisées à l'aide de l'amorce sens -700\_fw et de l'amorce antisens mDlx4\_qr2 utilisées pour l'expérience de PCR glissante.

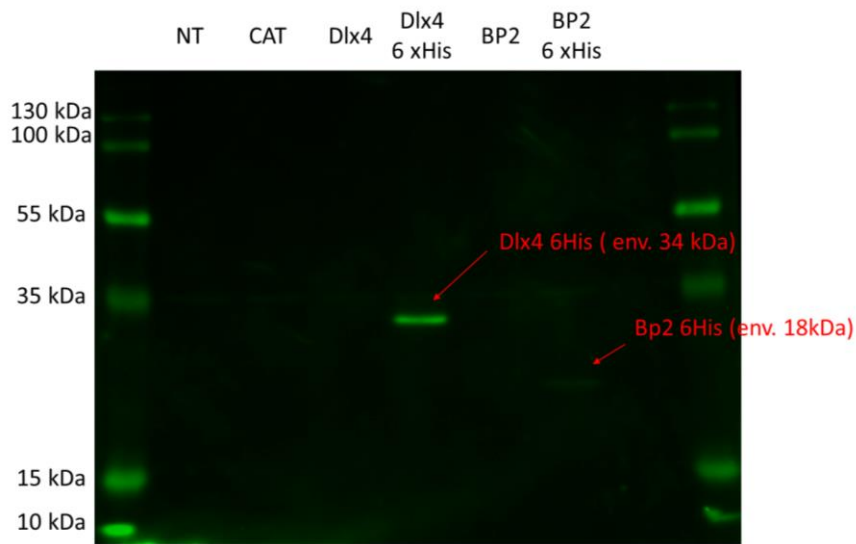
En ce qui concerne *BP1*, ce transcrit est surtout retrouvé dans l'embryon à E12.5 et dans l'os, alors que l'expression de *BP2* est plus variée. En effet, l'expression de *BP2* est détectée dans le rein, l'os et l'embryon au stade compris entre 10.5 et 12.5 et au stade 14.5. De façon intéressante, l'expression de *BP2* semble diminuer progressivement entre les stades embryonnaires 10.5 et 12.5. Ainsi il semblerait intéressant d'analyser l'expression de *BP2* à des stades embryonnaires plus précoces.

Enfin, parmi les lignées murines d'ostéosarcomes, seule la lignée K7M2 semble exprimer *BP2*, quant à *BP1* il n'est pas exprimé dans ces lignées.

### 3. Confirmation de l'existence d'une protéine pour BP2

Afin de valider l'existence d'une protéine pour BP2, et de confirmer sa séquence en particulier son site d'initiation, il a été décidé de surexprimer le transcrit à l'aide d'un plasmide permettant d'ajouter un tag c-myc/6xHistidine à l'extrémité C-terminale de la protéine. Dans le même temps, le transcrit de *Dlx4* a été traité de la même façon afin d'avoir un contrôle du fonctionnement du système. Après production de la protéine BP2 dans des cellules HEK 293FT, cette dernière a été purifiée et analysée par Western-blot à l'aide d'un anticorps anti 6xHistidine.

Le résultat obtenu permet de valider le fonctionnement du système puisque la protéine *Dlx4* est retrouvée à sa taille habituelle (**Figure 54**). En ce qui concerne le transcrit *BP2*, celui-ci a produit une protéine dont la taille est d'environ 18 kDa (**Figure 54**). Ce résultat est proche de celui attendu puisque la taille prédictive de cette protéine est d'environ 16 à 17 kDa, suggérant ainsi que l'initiation de la protéine se fait bien à l'endroit prédit. Néanmoins, une purification de plus haute qualité est nécessaire afin de permettre de séquencer la protéine. Ce séquençage permettra ainsi de confirmer la séquence de la protéine afin de produire un anticorps spécifique dirigé contre cette dernière (sur les 10 premiers AA) pour réaliser un screening de tissu par immunohistologie.



**Figure 54 | Détection de la protéine BP2 marquée à l'aide d'une séquence c-myc/6xHIS**

Après purification et migration, les extraits protéiques des cellules contrôles (natives (NT), ou vecteur vide (CAT)), des cellules surexprimant les formes non taguées (Dlx4 ou BP2) ou taguées (Dlx4 6xHis et BP2 6xHis) de *Dlx4* et de BP2 sont révélés à l'aide d'un anticorps reconnaissant le tag 6xHis.

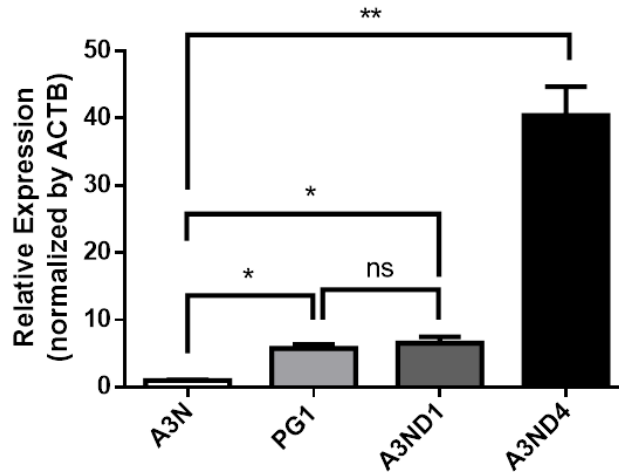
## II- Modulation du système *Dlx4* dans des ostéosarcomes murins

L'objectif principal de ces travaux était de valider l'implication de *Dlx4* ou de ses autres transcrits dans la prolifération tumorale. En effet, une première approche basée sur l'utilisation de sous-clones de la lignée cellulaire MOS-J exprimant de façon différente *Dlx4* s'est avérée concluante. Pour valider ces observations, la surexpression de *Dlx4* dans le sous-clone A3N, ayant la plus faible expression de *Dlx4*, a été réalisée à l'aide d'un plasmide dans lequel a été inséré l'ADNc de *Dlx4*. Si l'hypothèse de départ est valable, l'augmentation de la prolifération des cellules A3N devrait être visible. Dans le même temps, l'inactivation de l'expression de *Dlx4* dans le sous-clone PG1, ayant la plus forte expression, a été réalisée par une approche d'ARN interférence ciblant spécifiquement *Dlx4*. Par ailleurs, afin de comprendre le rôle du transcrit *BP2*, celui-ci a été transfecté dans les cellules A3N et PG1 dans le but d'observer si le transcrit a un rôle dans la prolifération tumorale de façon dépendante ou non de l'expression de *Dlx4* (ratio).

### 1. Etude de l'implication de *Dlx4* dans la prolifération tumorale

#### 1.1. Surexpression de *Dlx4*

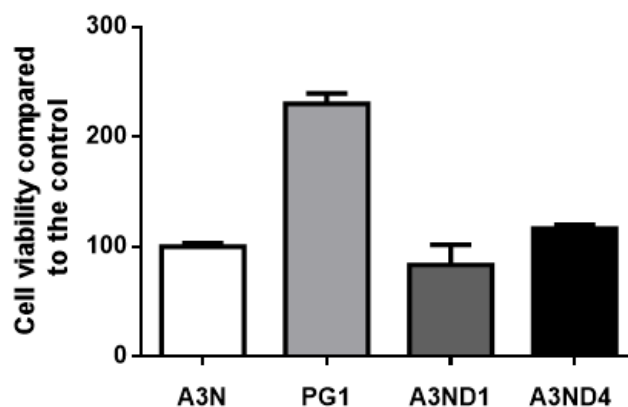
Le vecteur d'expression de *Dlx4*, obtenu en clonant la majeure partie de l'ADNc de *Dlx4*, a été transfecté dans le clone A3N. Après une sélection des cellules ayant intégré le plasmide de façon stable, le niveau d'expression de *Dlx4* a été évalué par RT-qPCR dans les différentes cultures. Les résultats obtenus (**Figure 55**) pour les cultures utilisées lors de l'expérimentation *in vivo* sont présentés ci-dessous. Les deux cultures retenues, A3ND1 et A3ND4, surexpriment bien *Dlx4* par rapport au clone natif A3N. L'A3ND1 surexprime 6 fois plus *Dlx4* que la cellule A3N native et l'A3ND4 le surexprime 40 fois plus. Au final, ceci permet d'avoir une culture exprimant *Dlx4* de façon équivalente au PG1, et une culture l'exprimant beaucoup plus.



**Figure 55 | Analyse de l'expression transcriptionnelle de *Dlx4* dans les cellules A3N le surexprimant**

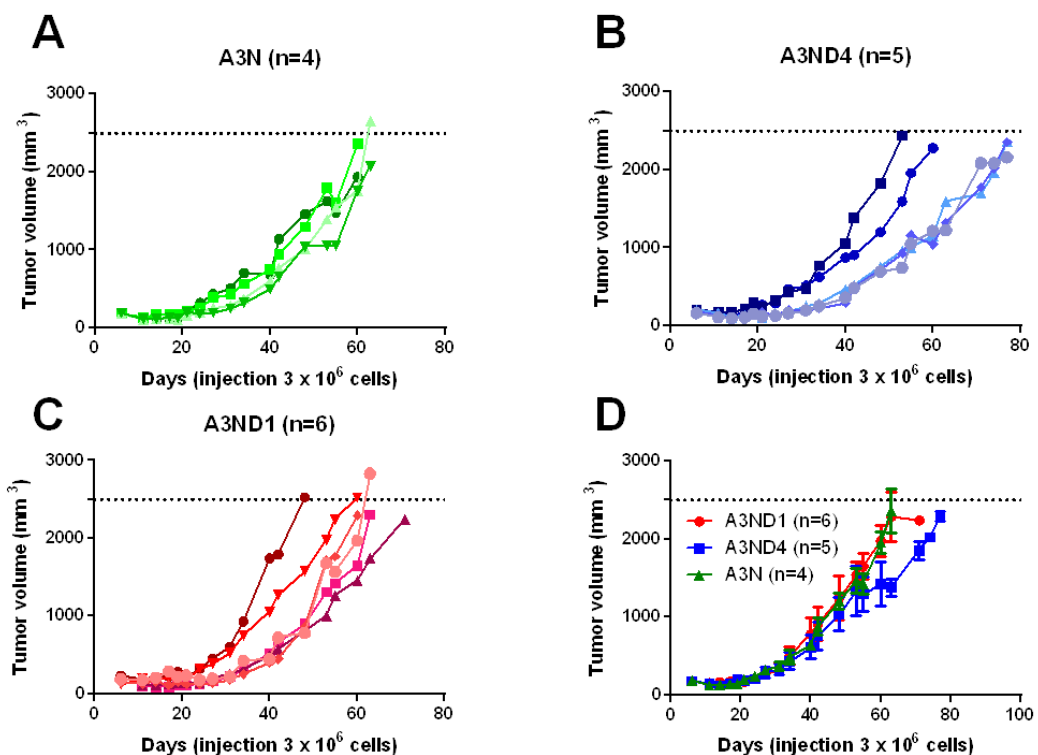
L'expression des transcrits de *Dlx4* a été mesurée pour les cultures A3N et PG1 natives ainsi que pour les cultures surexprimant *Dlx4* (A3ND1 et A3ND4). Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au transcrit de l'ACTB et exprimés comme la moyenne des échantillons  $\pm$  écart-type. Test de Student : \*\* $p < 0.01$  ; \*  $p < 0.05$  ; ns : non significatif.

Préalablement à l'expérience *in vivo*, des tests de viabilité cellulaire *in vitro* (WST-1) ont été réalisés. Les résultats de ces tests ne montrent aucune différence significative des capacités prolifératives des cellules A3ND1 et A3ND4, surexprimant *Dlx4*, par rapport aux cellules natives A3N (**Figure 56**). Cependant, ces tests de viabilité confirment la différence de prolifération entre les cellules A3N et PG1.



**Figure 56 | Viabilité cellulaire des clones A3N surexprimant *Dlx4***  
Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  SD rapportée à la cellule A3N.

Par la suite, les cultures surexprimant *Dlx4* ont été injectées à des souris C57BL/6J*Rj* afin d'établir un suivi de la vitesse de progression tumorale. Les résultats obtenus montrent clairement qu'il n'y a pas de différence significative de prolifération *in vivo* entre les tumeurs induites par l'injection de cellules natives (A3N) ou surexprimant *Dlx4* (**Figure 57**). Un départ rapide de la croissance tumorale avec les cellules surexprimant *Dlx4* n'a pas été observé comme cela aurait pu être attendu (similaire au PG1). Toutefois, une légère hétérogénéité est observée dans la vitesse de prolifération au sein des groupes de souris injectés avec les cellules modifiées pour surexprimer *Dlx4*. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les données obtenues *in vitro* à l'aide du test de viabilité cellulaire.



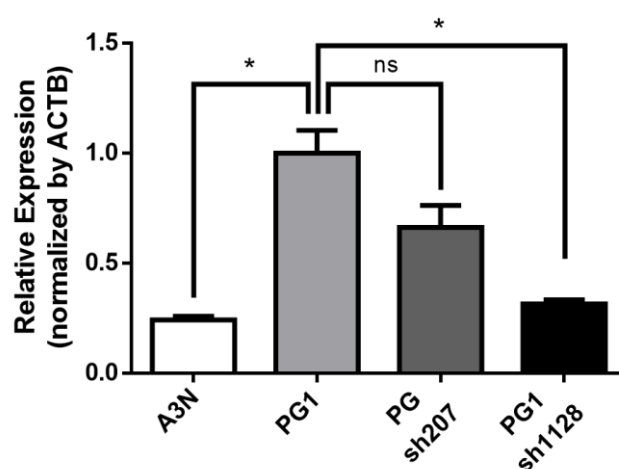
**Figure 57 | Effet de la surexpression de *Dlx4* sur la vitesse de prolifération des clones A3N *in vivo***

Chaque groupe de souris a été injecté avec 3 millions de cellules A3N (A), A3ND4 (B) ou A3ND1 (C). Le nombre d'individus pour chaque groupe est respectivement de (n=4), (n=5) et (n=6). La valeur moyenne des volumes tumoraux pour chaque groupe d'individus  $\pm$  SEM a été représentée (D) et la différence de prolifération testée avec un Test de Kruskal-Wallis.



## 1.2. Inhibition de *Dlx4* par shRNA

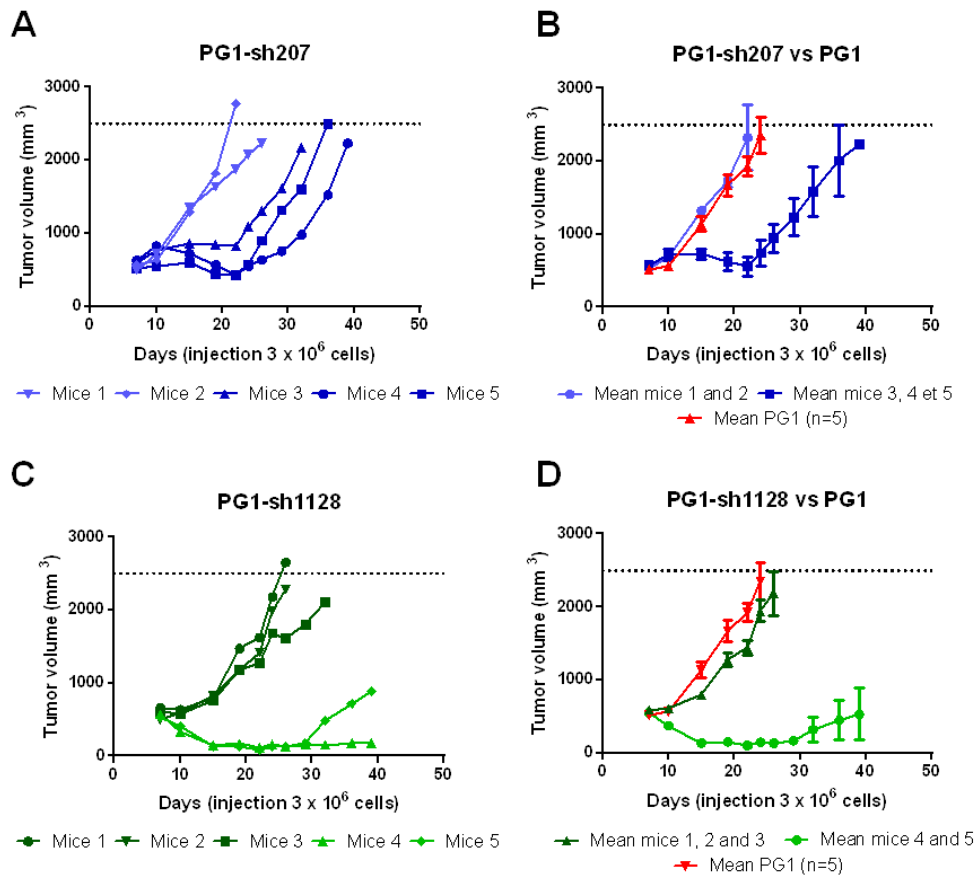
La lignée MOS-J PG1 a été transduite à l'aide de différentes particules lentivirales contenant la séquence de shARN dirigée contre *Dlx4*. Après une première amplification, les cellules ont été triées par rapport à l'expression de la GFP, permettant d'obtenir des populations oligoclonales exprimant les shARNs. Les cellules ont ensuite été étudiées pour l'expression de *Dlx4*. Les résultats obtenus montrent que le shARN 207 diminue de 30% l'expression de *Dlx4*, même si ce résultat ne ressort pas significatif (**Figure 58**). Concernant le shARN 1128, celui-ci permet de diminuer de 70 % l'expression de *Dlx4* (**Figure 58**).



**Figure 58 | Analyse de l'expression transcriptionnelle de *Dlx4* dans les cellules PG1 transduites par les shARN anti-*Dlx4***

L'expression des transcrits de *Dlx4* a été mesurée pour les cultures A3N et PG1 natives ainsi que pour les cultures transduites par les sh207 et sh1128. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au transcrite de l'ACTB et exprimés comme la moyenne des échantillons  $\pm$  écart-type. Test de Student : \*  $p < 0.05$  ; ns : non significatif.

Après validation des niveaux d'expression du gène *Dlx4*, le clone PG1 et ses formes transduites par les shARNs (sh207 et sh1128) ont été injectés à des souris C57BL/6JRj. Les résultats concernant le suivi de la progression tumorale de ces animaux sont fournis ci-dessous (**Figure 59**). Le suivi individuel des animaux pour le sh207 (**Figure 59-A**) et le sh1128 (**Figure 59-C**) permet d'observer que la progression des tumeurs induites n'est pas homogène au sein des différents groupes d'animaux, contrairement à ce qui est habituellement observé avec les cellules PG1. De plus, alors que les cellules PG1 induisent une tumeur dans 100 % des cas, cela ne semble pas être le cas pour le sh1128.



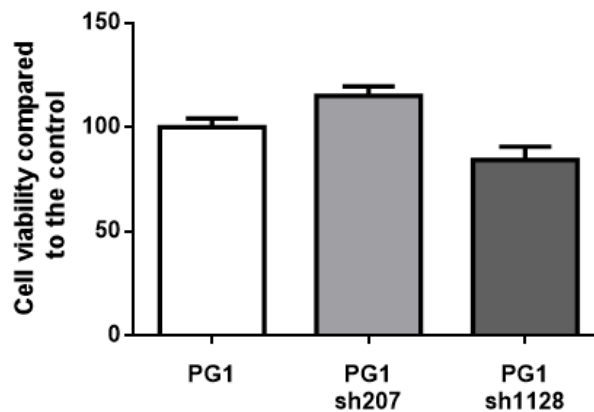
**Figure 59 | Etude de l'effet de l'inhibition de *Dlx4* sur la vitesse de prolifération du clone PG1 *in vivo***

Chaque groupe de souris a été injecté avec 3 millions de cellules PG1-sh207 (A) ou PG1-sh1128 (C) et comparé à un autre groupe de souris ayant reçu les cellules natives PG1 (B et D). Au sein des différents groupes (A) et (C), les individus présentant un développement tumoral similaire ont été regroupés afin de comparer leurs tendances par rapport aux individus ayant reçu les cellules PG1. La valeur moyenne des volumes tumoraux pour chaque groupe d'individus  $\pm$  SEM a été représentée et la différence de prolifération testée avec un Test de Kruskal-Wallis.

L'étude des résultats obtenus avec le sh207 (**Figure 59-A**) met en évidence l'existence de deux groupes distincts (**Figure 59-B**) : un groupe de deux individus ayant une croissance tumorale identique à celle de la cellule PG1, et un autre groupe de trois individus, dont les tumeurs sont parties avec environ 10 jours de retard. Ces résultats suggèrent que le sh207 a bien un effet inhibiteur sur *Dlx4*, malgré les observations non significatives faites sur l'expression de ce transcrite.

En ce qui concerne le sh1128, l'analyse des courbes de progression tumorale (**Figure 59-C**) permet également d'observer deux groupes d'individus distincts (**Figure 59-D**) : trois individus dont la progression est similaire aux cellules natives PG1, et deux individus dont la tumeur est partie très tard voire pas du tout. De la même façon, ce shARN qui induit une baisse de l'expression du transcrite de *Dlx4* de 70% semble retarder ou inhiber la croissance tumorale chez certains individus uniquement.

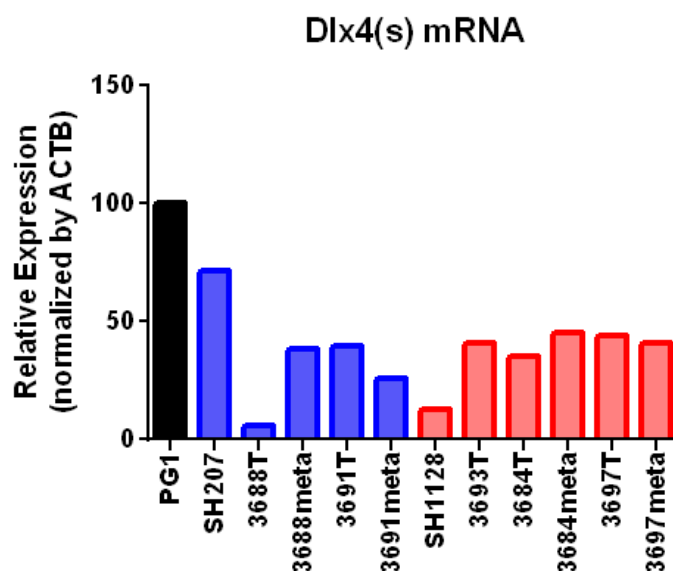
L'ensemble des résultats obtenus semble être en accord avec l'hypothèse selon laquelle *Dlx4* jouerait un rôle dans la prolifération tumorale. En effet, malgré la présence d'individus chez lesquels les shARNs ne semblent pas avoir d'effet (3 individus pour le sh1128 et 2 individus pour le sh207), les observations faites montrent un retard dans la croissance des tumeurs, voire même une absence de cette progression. Ces résultats reliés à ceux de l'analyse transcriptionnelle semblent cohérents, dans le sens où l'effet anti-prolifératif le plus marquant est associé au sh1128. Toutefois, les résultats de cette expérimentation *in vivo* sont en contradiction avec des tests de viabilité cellulaire *in vitro*, réalisés en parallèle, qui n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative de prolifération entre les cellules natives ou transduites par les shARN anti-*Dlx4* (**Figure 60**).



**Figure 60 | Viabilité cellulaire des clones issues des cellules PG1 transduites par les shARN anti-*Dlx4***

Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  SD rapportée à la cellule PG1.

Pour aller plus loin dans la compréhension des différents résultats obtenus, certaines pièces tumorales et métastases ont été remises en culture au fur et à mesure de l'avancée de l'expérience précédente. Les différents clones obtenus ont donné naissance à plusieurs lignées cellulaires qui ont été analysées pour l'expression de *Dlx4*.

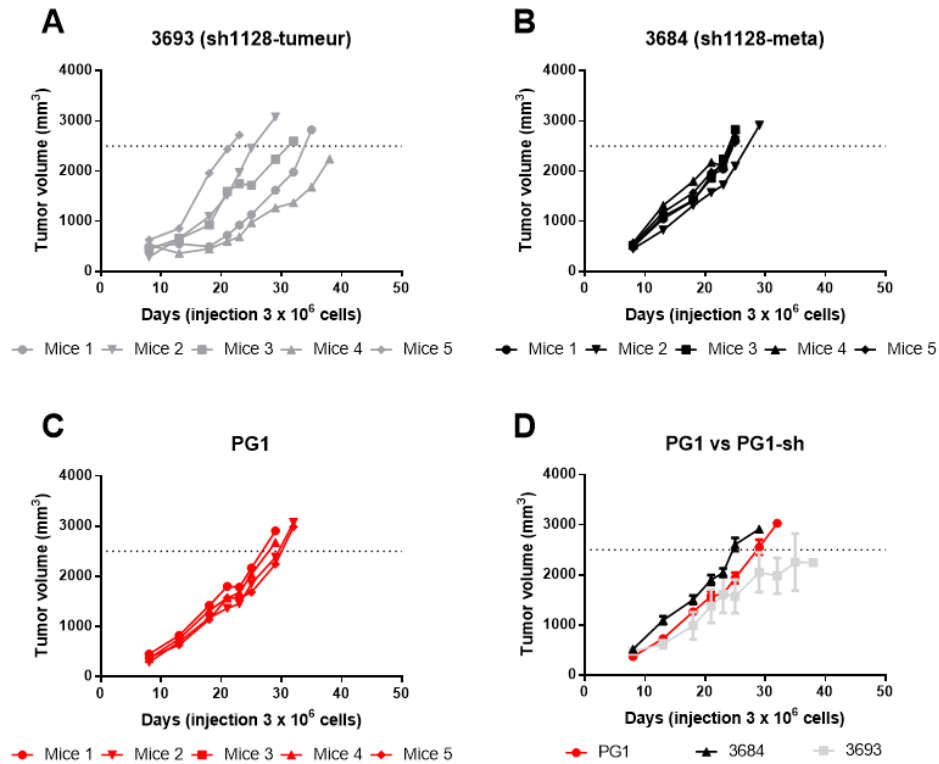


**Figure 61 | Analyse de l'expression transcriptionnelle de *Dlx4* dans les cellules issues des pièces tumorales remises en culture**

L'expression des transcrits de *Dlx4* a été mesurée dans les différentes lignées obtenues après remise en culture de pièce tumorale (T) et de métastases (meta). Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au transcrit ACTB et exprimés comme la moyenne des échantillons  $\pm$  écart-type.

Les données obtenues sont très contrastées, puisque les différents clones issus de l'injection du sh207 ont un taux d'expression de *Dlx4* plus faible qu'auparavant (**Figure 61**). Pour le sh1128, le résultat est inverse, les différents clones ont tous un taux d'expression de *Dlx4* plus élevé (**Figure 61**). De façon intéressante, à l'exception des éléments de la souris 3688, la plupart des métastases remises en culture ont un taux d'expression de *Dlx4* proche des cellules récupérées au niveau de la pièce tumorale. Globalement, ces résultats semblent indiquer que l'expression de *Dlx4*, dans ces nouvelles cultures, converge vers une valeur stable représentant 40 à 50 % de l'expression de *Dlx4* par les cellules PG1. Ainsi, il semblerait que la perturbation de *Dlx4* dans les cellules PG1 conduite à une sélection de cellules tumorales « résistantes » (ou plus stable) possédant une expression de *Dlx4* intermédiaire.

Toujours dans un objectif de compréhension les clones 3693T et 3684M, caractérisés respectivement par une faible et une forte expression de *Dlx4* (issues du sh1128), ont été injectés, de façon similaire aux premières cellules modifiées par des shARN, à des souris C57BL/6JRj (**Figure 62**).



**Figure 62 | Courbe de croissance des tumeurs induites à l'aide des cultures issues de la première expérience d'inhibiteur de *Dlx4* par shARN**

Les volumes tumoraux pour chaque individu injecté avec les cellules 3693 possédant un faible taux de *Dlx4* (A), les cellules 3684 possédant un fort taux de *Dlx4* (B) et les cellules natives PG1 (C) sont représentés. La moyenne des volumes tumoraux pour chaque groupe d'individus +/- SEM a été calculée et représentée (D) pour faciliter la comparaison des différents groupes. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour tester la significativité des valeurs ; ns : non significatif.

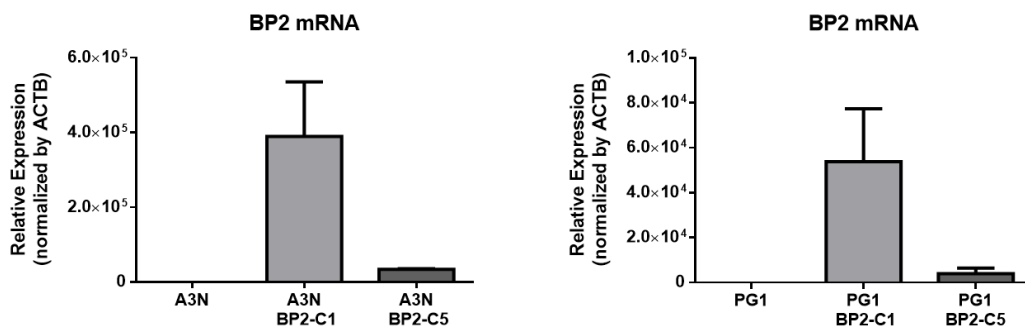
Les résultats obtenus sont très hétérogènes pour la culture 3693T (**Figure 62-A**), alors qu'ils le sont beaucoup moins pour la culture 3684M (**Figure 62-B**). Ainsi, la moyenne des individus injectés avec ces clones tend à se rapprocher de celle des individus ayant reçu les cellules natives PG1, signifiant qu'il n'y a « plus d'effet » dû à l'inhibition de *Dlx4* comme observé dans 50 % des cas sur l'expérience précédente (**Figure 59** et **Figure 62**). Le fait que la progression des tumeurs des souris induites à l'aide de la culture 3693T soit très hétérogène signifie

sans doute que des processus d'échappement se mettent en place au cours du développement des tumeurs.

Afin de s'affranchir des problèmes de stabilité de l'inhibition de *Dlx4*, il a été décidé de sous-cloner les shARNs dans des plasmides permettant de contrôler l'expression des transcrits par un système de réponse à la tétracycline Tet-On. L'objectif principal de cette nouvelle expérience étant d'induire normalement les tumeurs et de stopper la progression tumorale après quelques jours en activant la cassette d'expression du shARN. Si *Dlx4* est réellement impliqué dans la prolifération des tumeurs, un arrêt ou une diminution de la vitesse de croissance des tumeurs devrait être observé. Pour l'heure, le clonage des différents éléments a été réalisé et les particules lentivirales restent à produire afin de valider la fonctionnalité du système.

### 1.3. Etude de l'implication de BP2 dans la prolifération cellulaire

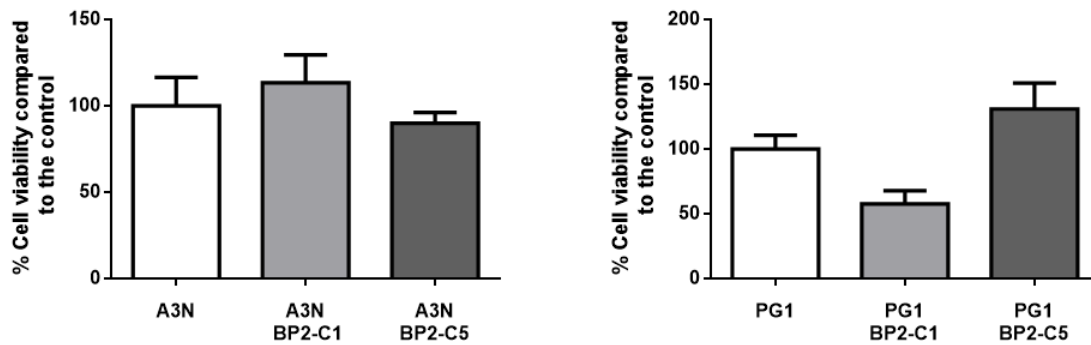
Suite à la découverte d'un nouveau transcrite codant pour *Dlx4*, et ne connaissant pas ses effets notamment sur la prolifération cellulaire, il a été décidé d'induire une surexpression de BP2 dans les cellules A3N et PG1. Plusieurs clones ont été obtenus, parmi ces derniers les clones dont l'expression de BP2 est présentée ci-dessous (**Figure 63**) ont été retenus pour réaliser des tests de viabilité cellulaire *in vitro*. Ces clones ont été choisis en raison de leurs taux faible et fort d'expression.



**Figure 63 | Analyse de l'expression transcriptionnelle de BP2 dans les cellules transfectées pour surexprimer BP2**

L'expression des transcrits de BP2 a été mesurée pour les cultures A3N et PG1 natives ainsi que pour les cultures transfectées à l'aide du plasmide pcDNA3.1+ BP2. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au transcrite ACTB et exprimés comme la moyenne des échantillons  $\pm$  écart-type.

Les résultats des tests de viabilité cellulaire réalisés pour les différents clones surexprimant BP2 sont très disparates. En effet, pour les clones issus de la lignée A3N, aucune différence significative n'est mise en évidence, contrairement aux cellules PG1 où un clone (PG1BP2-C1) semble avoir une prolifération plus lente ( $p = 0.067$ ). Ainsi, ces tests ne permettent pas de conclure sur le caractère anti- ou pro-prolifératif de BP2.

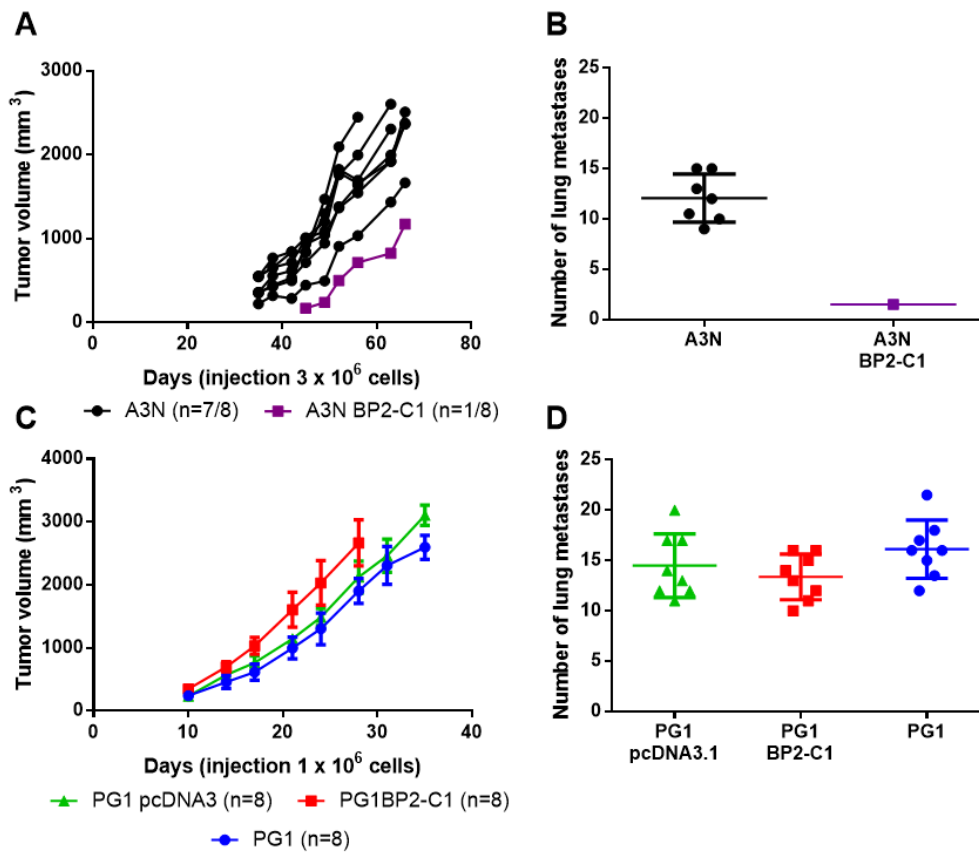


**Figure 64 | Viabilité cellulaire des clones surexprimant BP2**  
Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  SD rapportée à la cellule native.

Après quoi, les clones présentant la plus forte expression de BP2 ont été injectés à des souris C57BL/6JRj, comme cela est décrit dans le « Matériel et méthodes ». Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous pour le suivi tumoral et le nombre de métastases des différents individus (**Figure 65**).

Parmi les individus injectés avec la lignée A3N modifiée pour surexprimer BP2 (A3NBP2-C1), il s'avère qu'une seule souris a développé une tumeur de façon lente sans atteindre le point éthique (**Figure 65**). Le sacrifice de cet animal a permis d'observer la présence d'une unique métastase pulmonaire alors que les individus ayant reçu les cellules natives A3N ont développé des tumeurs de façon habituelle et de nombreuses métastases (**Figure 65**).

Concernant les individus ayant reçu les cellules PG1 modifiées pour surexprimer BP2, les données recueillies indiquent qu'il n'y a pas de différence significative dans la progression tumorale des cellules modifiées (PG1BP2-C1), contrôles (PG1 pcDNA3.1), et natives (PG1) (**Figure 65**). De même, au niveau du nombre de métastases aucune différence n'est observée (**Figure 65**).



**Figure 65 | Effet de la surexpression de BP2 sur la vitesse de prolifération des clones A3N et PG1 *in vivo***

Les individus ayant reçu les cellules A3N natives ou modifiées ont été injectés avec 3 millions de cellules alors que ceux injectés avec les cellules PG1 ont reçu 1 million de cellules. La croissance tumorale (A) pour chaque individu et le nombre de métastases (B) ont été représentés pour les cellules A3N et A3NBP2C1. La moyenne des volumes tumoraux  $\pm$  SEM (C) et le nombre de métastases (D) ont été représentés pour les cellules PG1, PG1-pcdna3 et PG1BP2C1. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour tester la significativité des valeurs ; ns : non significatif.

Les résultats obtenus lors de cette expérimentation sont contradictoires dans le sens où dans la lignée A3N, la surexpression de BP2 empêche la prise des tumeurs alors que dans la lignée PG1, la même modification n'a aucun effet sur le développement des tumeurs et des métastases associées. Le renouvellement de cette expérience, avec l'ajout de clones supplémentaires, est nécessaire afin de valider le résultat observé avec les cellules A3N. En effet, si le résultat se confirme, une analyse plus approfondie des effets de BP2 devra être réalisée au sein des cellules A3N notamment par rapport au ratio BP2/*Dlx4*.

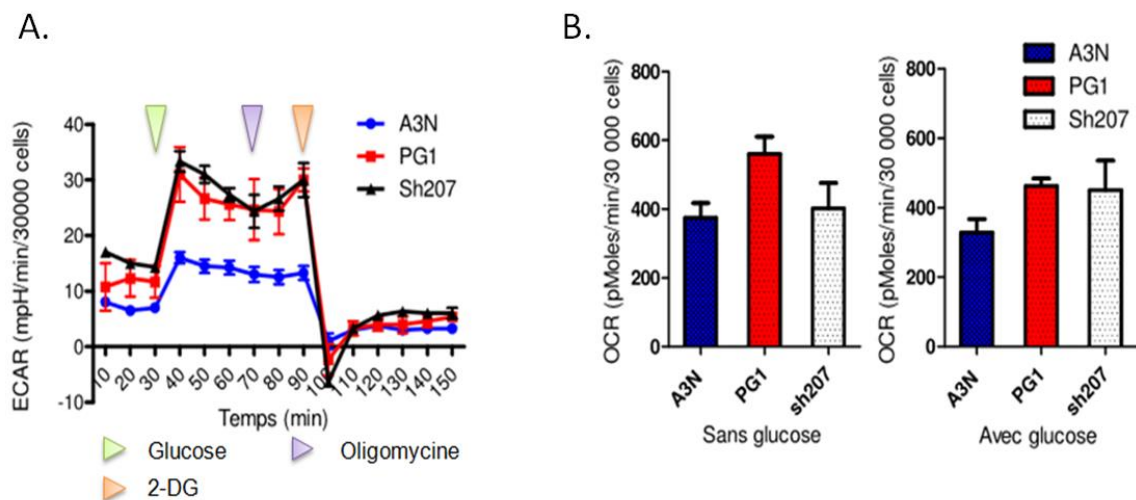


## 2. Etude du métabolisme énergétique dans la cellule ostéosarcoma- teuse en liaison avec l'expression de *Dlx4*

Au vu de la différence de prolifération entre les cellules A3N et PG1 et des résultats présentés précédemment suggérant que *Dlx4* ne puisse pas être seul responsable de cette différence, il semblait intéressant d'analyser les capacités glycolytiques et oxydatives de ces deux types de cellules, souvent affectées dans les cellules tumorales et connues pour impacter la prolifération cellulaire [477]. De plus, suite à la transduction des cellules PG1 par les shARNs ciblant *Dlx4*, une très forte acidification du milieu a été observée suggérant un rôle potentiel de *Dlx4* dans le métabolisme énergétique.

Une collaboration avec Mme Claire PECQUEUR du centre de recherche en cancérologie Nantes – Angers (UMR 892), qui possède une expertise dans ce domaine, a été entreprise. Son équipe possède un analyseur de flux extracellulaire (XF24 Analyzer, Seahorse) permettant d'étudier le métabolisme cellulaire à l'aide des kits XF cell mito stress et XF glycolysis stress kit (Seahorse).

Ainsi, les cellules A3N, PG1 et PG1-sh207 ont été utilisées pour réaliser cette étude. Les résultats obtenus concernant l'analyse de la glycolyse sont présentés ci-dessous (**Figure 66**). Le suivi de l'acidification extracellulaire et de la consommation d'oxygène ont permis d'évaluer la glycolyse basale, la capacité glycolytique maximale et les réserves en glucose d'une part et de mesurer le couplage de la glycolyse avec la chaîne respiratoire d'autre part. De façon remarquable, l'analyse de l'acidification extracellulaire induite par l'ajout de glucose (**Figure 66-A**) semble mettre en évidence une efficacité de glycolyse plus importante chez les cellules PG1 et sh207 comparativement aux cellules A3N. Ces résultats sont cohérents avec les différences de proliférations observées précédemment chez ces cellules. Par la suite, l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthétase) permettant de bloquer la synthèse d'ATP mitochondriale n'a aucun effet sur les trois lignées étudiées, alors qu'une augmentation du pH extracellulaire aurait dû être observée. En effet l'oligomycine en bloquant la synthèse d'ATP mitochondriale a pour conséquence de forcer la glycolyse pour compenser le manque d'ATP mitochondrial (Cf. Matériel et méthodes), permettant ainsi d'évaluer la capacité maximale de la glycolyse. Pour terminer, les réserves en glucose des cellules ont été évaluées en ajoutant un analogue du glucose, le 2DG, qui va bloquer la glycolyse. Les résultats obtenus semblent indiquer que les trois cellules possèdent un stock de glucose similaire.



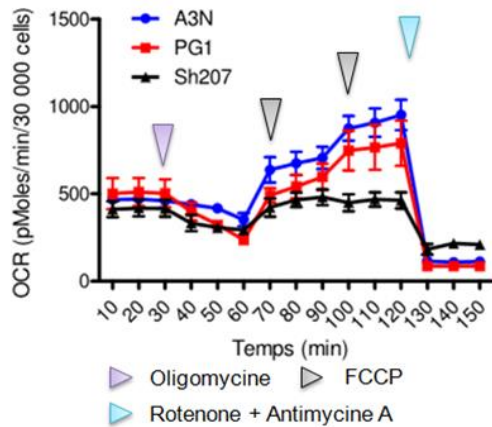
**Figure 66 | Etude de la glycolyse chez les cellules A3N, PG1 et sh207**

L'acidification extracellulaire induite par la glycolyse (A) et la consommation d'oxygène en absence ou en présence de glucose (B) ont été évaluées pour les clones A3N, PG1 et sh207 (sur 30 000 cellules pour chaque réplicat). Les valeurs présentées sont exprimées comme la moyenne des échantillons  $\pm$  écart-type avec  $n=3$ .

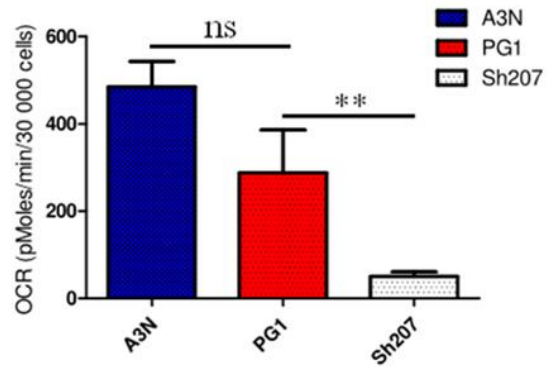
Dans le même temps, le suivi du taux d'utilisation de l'oxygène en absence de glucose et de pyruvate (**Figure 66-B**) semble montrer une consommation basale de l'oxygène plus élevée chez les cellules PG1 que chez les cellules A3N. Concernant les cellules sh207, le niveau d'oxygène consommé se rapproche de celui des cellules A3N. Par ailleurs, après ajout de glucose, l'utilisation de l'oxygène pour les cellules PG1, et de façon moins marquée pour les cellules A3N, diminue. Ces observations sont cohérentes, en effet la glycolyse générant de l'énergie, la synthèse d'ATP mitochondriale est alors moins sollicitée ce qui conduit à une diminution de l'utilisation d'oxygène.

Par la suite, les capacités respiratoires de la mitochondrie ont été mesurées (**Figure 67**). Les données obtenues après ajout d'oligomycine permettent de constater que les trois cellules ont la même efficacité de couplage entre la phosphorylation et la consommation d'oxygène. Après quoi, l'ajout de FCCP à plusieurs reprises permet d'évaluer les réserves de la mitochondrie en cofacteurs (NADH et FADH) (Cf. Matériel et méthodes). Ainsi, l'évaluation du stock de ces derniers est mesurée en retirant la consommation en oxygène de base à la consommation d'oxygène la plus haute obtenue par ajout de FCCP.

A.



B.



### Figure 67 | Etude de la chaîne respiratoire chez les cellules A3N, PG1 et sh207

La consommation en oxygène de la mitochondrie (A) et les réserves en cofacteurs respiratoires (B) ont été évaluées pour les clones A3N, PG1 et sh207. Les valeurs présentées sont exprimées comme la moyenne des échantillons + écart-type avec  $n=3$ . Test de Student : \*\* $p < 0.01$  ; ns : non significatif.

Les résultats obtenus (**Figure 67**) permettent de constater que le sh207 ne répond pas à l'ajout de FCCP et reste à un niveau de consommation d'oxygène basal contrairement aux cellules A3N et PG1 pour qui une augmentation de la respiration est observée. De façon plus précise, l'évaluation des réserves mitochondriales en cofacteurs permet de mettre en évidence un niveau très faible de ces derniers chez les cellules sh207 comparativement aux cellules A3N et PG1 pour lesquelles les stocks sont similaires. Ces résultats suggèrent que les cellules transduites par le sh207 ont une anomalie de renouvellement ou de biosynthèse des cofacteurs enzymatiques (NADH ou FADH).

### III- Régulation génique médiée par les transcrits de *Dlx4*

Des analyses par qPCR quantitative ont été réalisées sur les différentes lignées modifiées au cours de cette étude, et utilisées *in vivo*, afin d'identifier de potentielles cibles transcriptionnelles des isoformes de *Dlx4*.

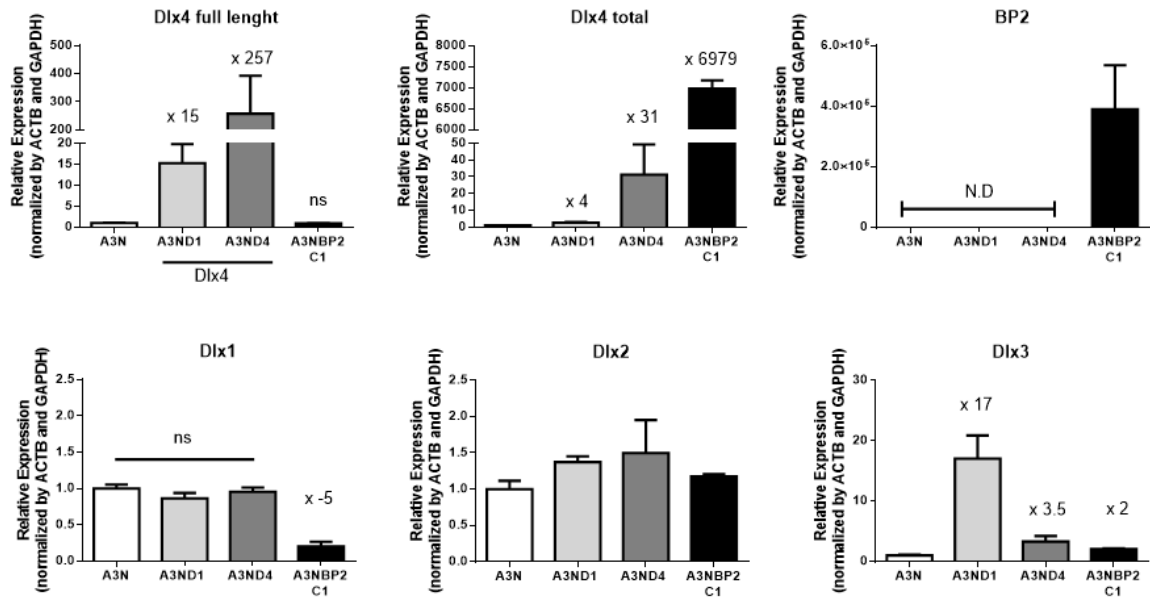
#### 1. Impact de la surexpression de *Dlx4* et de *BP2*

Les effets de la surexpression de *Dlx4* ont été analysés dans les clones A3ND1 et A3ND4, alors que les effets de la surexpression de *BP2* ont été étudiés dans le clone A3NBP2-C1.

En premier lieu, l'analyse de l'ensemble des transcrits de *Dlx4* (*Dlx4* total) et de ses isoformes (*Dlx4* « full length », *BP1* et *BP2*) permet de confirmer qu'une induction de *Dlx4* a bien été réalisée dans les clones A3ND1 et A3ND4, avec un taux beaucoup plus important pour le clone A3ND4 (**Figure 68**). En ce qui concerne le clone surexprimant *BP2*, A3NBP2-C1, l'expression de ce transcrit est convenablement détectée par les amorces reconnaissant les trois isoformes de *Dlx4* mais ne l'est pas avec les amorces spécifiques de la forme longue, comme attendu (**Figure 68**). De même, les amorces spécifiques de *BP2* ne reconnaissent pas la forme longue. Toutes ces données confirment la spécificité de nos systèmes d'expression et de détection.

Ainsi, la recherche de cible transcriptionnelle pour *Dlx4* et *BP2* s'est tout d'abord intéressée à mettre en évidence les modulations des autres gènes de la famille *Dlx* (Figure 68). En effet, les gènes *Dlx* sont connus pour se réguler entre eux. Les résultats obtenus confirment cette hypothèse puisqu'il s'avère que *Dlx4* module à la hausse le gène *Dlx3* dans des proportions plus ou moins variables (**Figure 68**). L'isoforme *BP2* régule *Dlx3*, mais dans une moindre mesure par rapport à *Dlx4* (**Figure 68**). Cependant *BP2* régule fortement à la baisse le niveau d'expression de *Dlx1* alors que la surexpression de *Dlx4* n'a aucun effet sur *Dlx1* (**Figure 68**).

Concernant l'expression de *Dlx2*, aucun effet significatif n'est observé que ce soit chez les clones surexprimant *Dlx4* ou *BP2* (**Figure 68**). Enfin, *Dlx5*, *Dlx6* et *BP1* n'ont pas été détectés dans ces cellules quelles que soient les conditions.

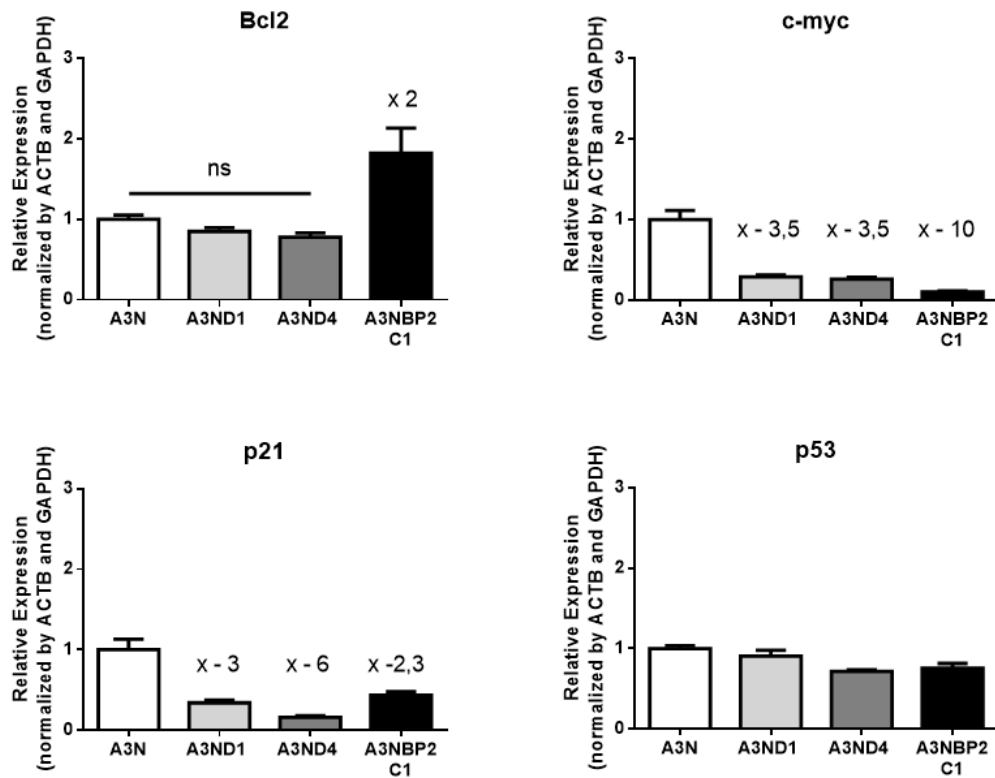


**Figure 68 | Effet des surexpressions de *Dlx4* et de *BP2* sur l'expression des gènes *Dlx***

L'expression des différents gènes *Dlx* a été évaluée par qPCR dans les cellules A3N natives, les cellules A3N surexprimant *Dlx4* (A3ND1 et A3ND4) et les cellules A3N surexprimant *BP2*. Les résultats fournis sont exprimés comme l'expression relative moyenne  $\pm$  SD par rapport aux gènes de référence et rapportés par rapport à l'expression de ces gènes dans les cellules contrôles A3N. Le nombre de réplicats pour chaque échantillon est de n=6. Les résultats pour les gènes *Dlx5*, *Dlx6* et *BP1* ne sont pas représentés car non-exprimés.

Dans un deuxième temps, plusieurs gènes connus pour être impliqués dans le contrôle de l'apoptose ou du cycle cellulaire ont été étudiés en rapport avec les modulations induites pour *Dlx4* et *BP2* (**Figure 69**). Les résultats obtenus indiquent que la surexpression de *Dlx4* dans les cellules A3N n'a aucun effet sur l'expression de *Bcl-2* et de *p53* (**Figure 69**). Par contre, *Dlx4* diminue de façon significativement importante l'expression des gènes *c-myc* et *p21* (**Figure 69**).

En ce qui concerne l'effet de *BP2* sur ces mêmes gènes, il s'avère que *BP2* tout comme *Dlx4* régule à la baisse les gènes *c-myc* et *p21*, mais n'a aucun effet sur *p53*. Cependant, contrairement à *Dlx4*, *BP2* semblent induire le gène *Bcl-2* (**Figure 69**).

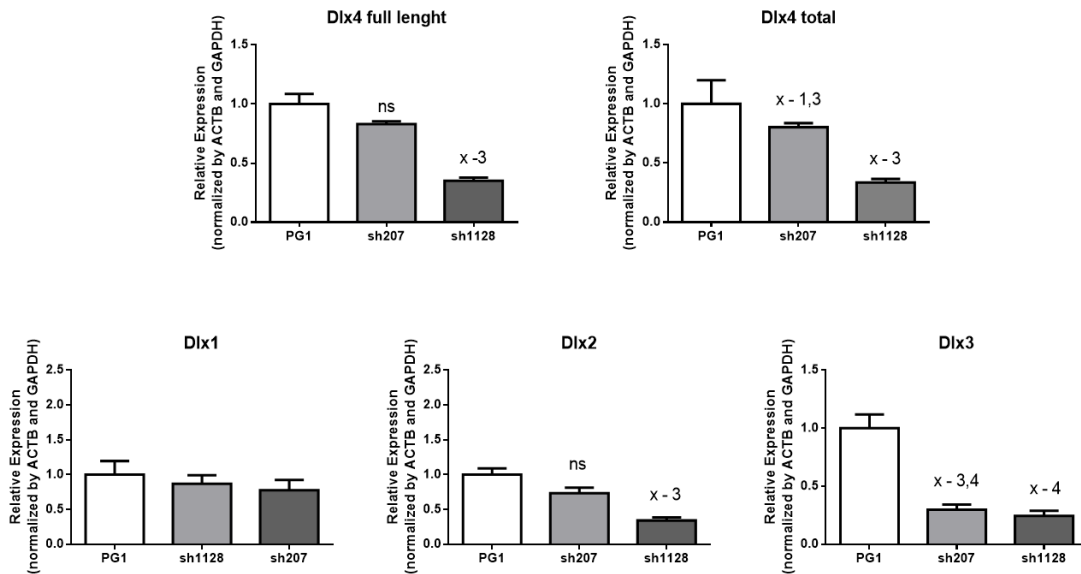


**Figure 69 | Effet des surexpressions de *Dlx4* et de *BP2* sur l'expression de *Bcl-2*, *c-myc*, *p21* et *p53***

L'expression des gènes *Bcl-2*, *c-myc*, *p21* et *p53* a été évaluée par qPCR au sein des cellules A3N natives, des cellules A3N surexprimant *Dlx4* (A3ND1 et A3ND4) et des cellules A3N surexprimant *BP2*. Les résultats fournis sont exprimés comme l'expression relative moyenne  $\pm$  SD par rapport aux gènes de référence et rapportés par rapport à l'expression de ces gènes dans les cellules contrôles A3N. Le nombre de répliqués pour chaque échantillon est de  $n=6$ .

## 2. Impact de l'inhibition de *Dlx4* par shARN

De la même façon que pour les clones surexprimant *Dlx4* et *BP2*, une analyse par qPCR a été réalisée sur les cellules PG1 ayant été transduites par le sh207 et le sh1128.



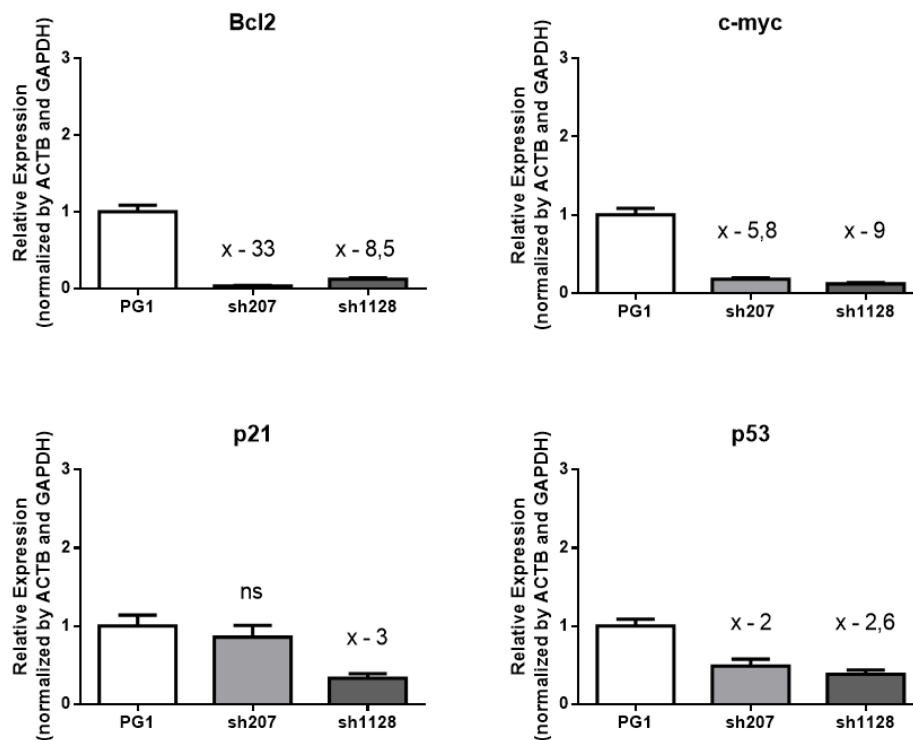
**Figure 70 | Effet de l'inhibition de *Dlx4* par les shARN 207 et 1128 sur les gènes *Dlx***

L'expression des différents gènes *Dlx* a été évaluée par qPCR au sein des cellules PG1 natives, des cellules PG1 transduites par le sh207 et par le sh1128. Les résultats fournis sont exprimés comme l'expression relative moyenne  $\pm$  SD par rapport aux gènes de référence et rapportés par rapport à l'expression de ces gènes dans les cellules contrôles A3N. Le nombre de réplicats pour chaque échantillon est de  $n=6$ . Les résultats pour les gènes *Dlx5*, *Dlx6*, *BP1* et *BP2* ne sont pas représentés car non-exprimés.

Tout d'abord l'analyse de l'ensemble des transcrits de *Dlx4* et de ses isoformes permet de valider l'inhibition de la forme longue de *Dlx4*, comme observé précédemment lors de la création des clones pour les expériences *in vivo* (**Figure 70**). À noter, qu'aucune détection des transcrits *BP1* et *BP2* n'est observée que ce soit dans les cellules natives PG1, comme dans les cellules modifiées (données non montrées).

Au niveau de l'expression des différents gènes *Dlx*, le gène *Dlx1* ne semble pas impacté par l'inhibition de *Dlx4* (**Figure 70**). Par contre, l'inhibition de *Dlx4* diminue l'expression de *Dlx2* et *Dlx3*, et ce de façon plus importante avec le sh1128 (**Figure 70**). De la même façon, et pour la même raison que citée précédemment, les gènes *Dlx5* et *Dlx6* ne sont pas détectés.

En ce qui concerne les effets de l'inhibition de *Dlx4* sur certains gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose ou du cycle cellulaire, les résultats obtenus montrent que l'inhibition de *Dlx4* induit une diminution importante (x33) de l'expression de *Bcl-2* (**Figure 71**).



**Figure 71 | Effet de l'inhibition de *Dlx4* par les shARN 207 et 1128 sur les gènes *Bcl-2*, *c-myc*, *p21* et *p53***

L'expression des gènes *Bcl-2*, *c-myc*, *p21* et *p53* a été évaluée par qPCR au sein des cellules PG1 natives et des cellules PG1 transduites par le sh207 et par le sh1128. Les résultats fournis sont exprimés comme l'expression relative moyenne  $\pm$  SD par rapport aux gènes de référence et rapportés par rapport à l'expression de ces gènes dans les cellules contrôles A3N. Le nombre de réplicats pour chaque échantillon est de n=6.

Dans une moindre mesure, l'inhibition de *Dlx4* conduit également à la diminution de l'expression de *c-myc* et de *p53* (**Figure 71**). Enfin, l'inhibition de *Dlx4* aurait tendance à diminuer l'expression de *p21*, en particulier dans les cellules transduites par le sh1128. En effet, la diminution observée avec le sh207 n'est pas significative (**Figure 71**).

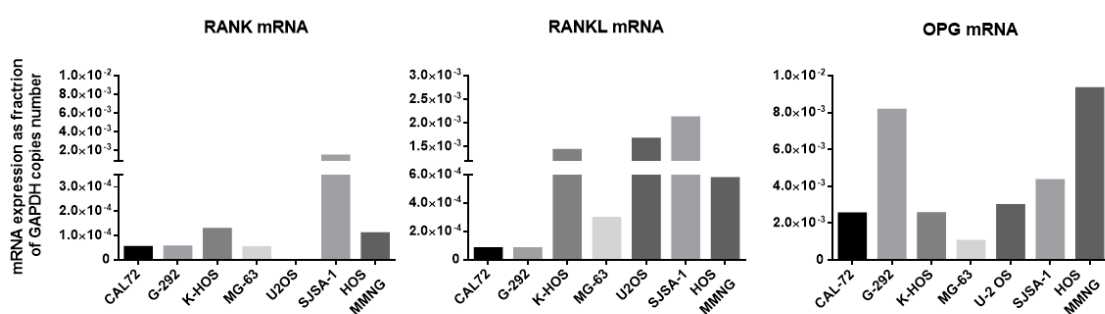


**Partie II : Implication de la signalisation RANK/RANKL dans la physiopathologie des ostéosarcomes**

L'objectif de cette étude était de déterminer si l'expression du gène *Rank* constitue un marqueur d'agressivité permettant de prédire le comportement des cellules tumorales vis-à-vis de la prolifération, de la migration (métastases) et de l'ostéolyse péri-tumorale induite. Certaines cellules ostéosarcomateuses expriment ce récepteur, mieux connu pour son rôle primordial dans le processus de résorption osseuse. Ce processus est détourné dans l'ostéosarcome conduisant à une importante ostéolyse péri-tumorale. Ainsi, l'impact de la présence du récepteur RANK dans les cellules tumorales a été étudié en injectant *in vivo* des cellules modifiées pour surexprimer ce dernier.

## I- Expression transcriptionnelle des éléments de la triade RANK/RANKL/OPG

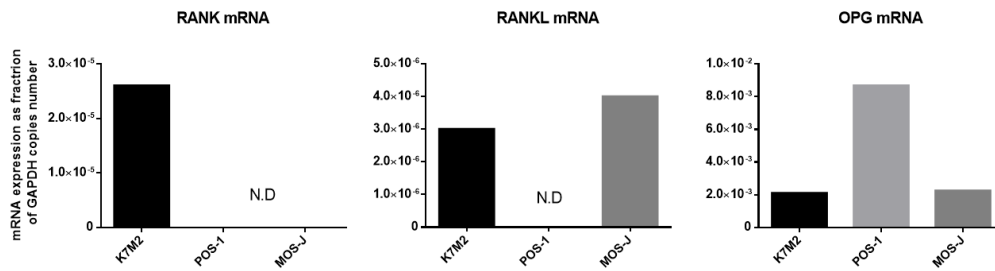
Une analyse de l'expression des différents éléments de la triade RANK/RANKL/OPG a été réalisée par PCR quantitative dans les différentes lignées d'ostéosarcomes humains (**Figure 72**) et murins (**Figure 73**) disponibles au laboratoire. Les résultats obtenus sur les lignées humaines démontrent que RANK est exprimé à des taux plus ou moins variables dans la quasi-totalité des lignées étudiées, à l'exception de la lignée U2OS (**Figure 72**). Pour ce qui est de RANKL et d'OPG, il s'avère que toutes les lignées les expriment avec une proportion d'OPG plus importante que celle de RANKL ( $10^{-3}$  vs  $10^{-4}$ ) (**Figure 72**).



**Figure 72 | Expression relative des transcrits RANK, RANKL et OPG dans les lignées humaines d'ostéosarcomes**

L'expression des différents transcrits a été normalisée par rapport à un gène de référence, la GAPDH.

Concernant les lignées murines d'ostéosarcomes, ces dernières expriment toutes l'OPG de façon importante (**Figure 73**). Cependant contrairement aux cellules humaines, la lignée K7M2 semble être la seule à exprimer de façon détectable le récepteur RANK (**Figure 73**). Enfin, les cellules K7M2 et MOS-J expriment RANKL contrairement aux cellules POS-1 (**Figure 73**).



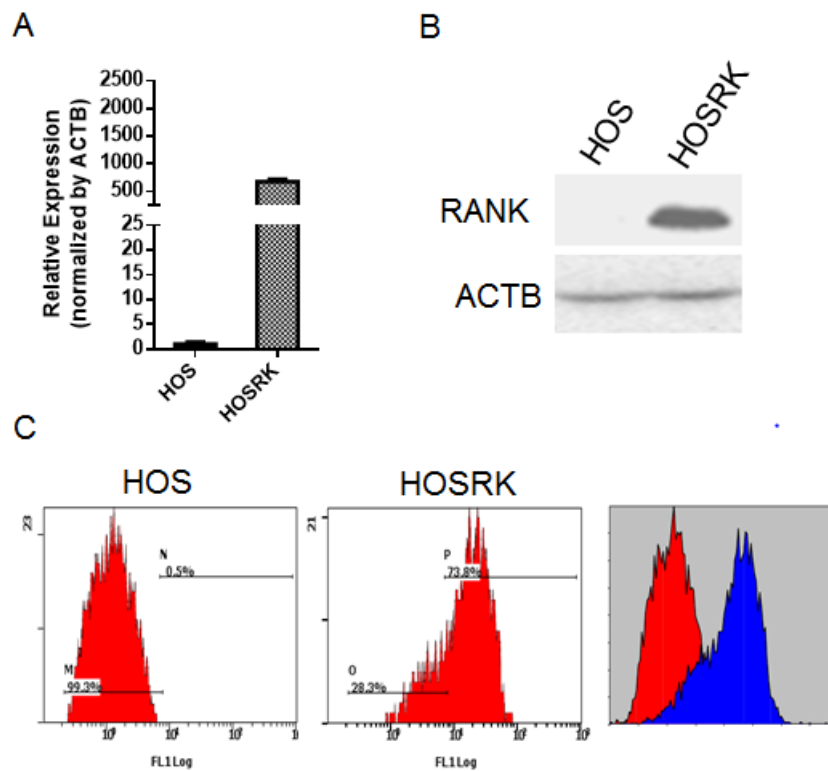
**Figure 73 | Expression relative des transcrits RANK, RANKL et OPG dans les lignées murines d'ostéosarcomes**

L'expression des différents transcrits a été normalisée par rapport à un gène de référence, la GAPDH.

## II- Création de lignées modifiées pour exprimer RANK

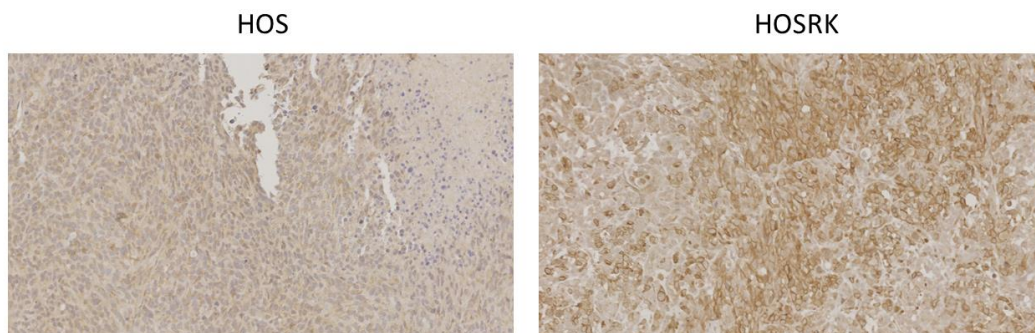
Afin d'étudier l'impact de l'expression de RANK par les cellules d'ostéosarcomes, il a été décidé de modifier son expression dans deux modèles différents. Un modèle murin qui utilisera les sous clones PG1 et A3N issus de la lignée murine d'ostéosarcome MOS-J, et un modèle humain qui utilisera la lignée K-HOS. La surexpression de RANK dans ces cellules a été réalisée par transduction à l'aide de particules lentivirales contenant le gène RANK comme décrite dans la partie « Matériels et méthodes ». Les clones obtenus ont été analysés par qPCR, western-blot et cytométrie en flux pour les cellules transduites avec RANK humain. Ces analyses démontrent bien l'expression de RANK au niveau transcriptionnel et protéique (**Figure 74**).

Par ailleurs, les cellules HOS modifiées pour surexprimer RANK ont été injectées *in vivo* pour vérifier la prise des tumeurs et l'expression de RANK par immunohistologie. Les données obtenues (**Figure 75**) permettent de confirmer l'expression de RANK notamment au niveau de la membrane cellulaire.



**Figure 74 | Validation de la surexpression de hRANK dans la lignée HOS**

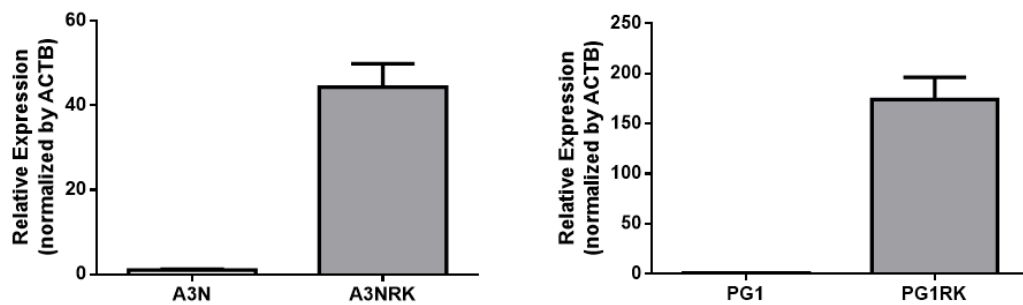
La surexpression de RANK dans les cellules HOS a été validée par qPCR quantitative (A), Western Blot (B) et cytométrie en flux (C).



**Figure 75 | Validation de la surexpression de hRANK dans les tumeurs induites par la lignée HOSRK**

Immunomarquage réalisé avec un anticorps anti-RANK sur les tumeurs induites à l'aide des cellules HOS natives et à l'aide des cellules modifiées pour l'expression de RANK.

Concernant les cellules A3N et PG1 transduites pour surexprimer RANK, ces dernières ont été analysées uniquement pour leur expression transcriptionnelle. En effet, de nombreuses difficultés ont été rencontrées en ce qui concerne la détection de RANK au stade protéique, puisqu'aucun des anticorps testés n'a permis de détecter spécifiquement et proprement la forme protéique de RANK. Néanmoins, au vu des taux d'expression transcriptionnelle de RANK (**Figure 76**), et suite à la vérification par séquençage de la séquence codante, il est peu probablement que RANK ne soit pas exprimé au niveau protéique.



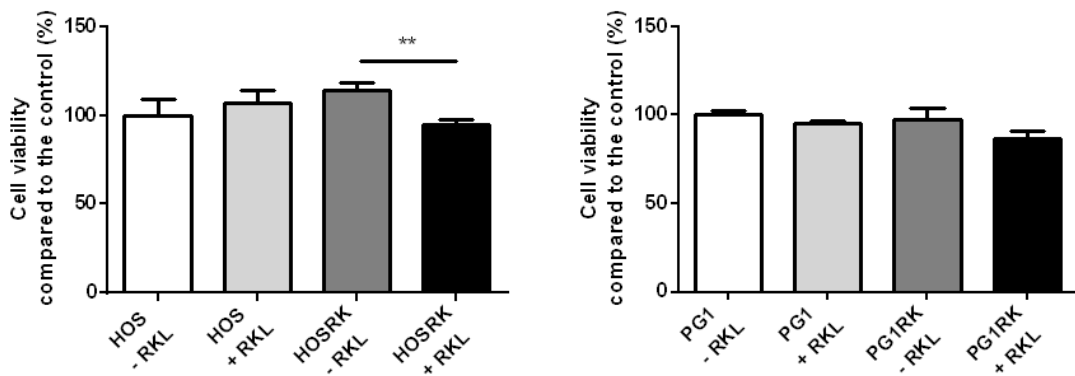
**Figure 76 | Validation de la surexpression de mRANK dans les cellules A3N et PG1**

La surexpression de RANK dans les cellules A3N et PG1 a été validée par qPCR quantitative. Les valeurs sont représentées comme la moyenne de l'expression relative  $\pm$  SD rapportée au gène de référence et à l'échantillon contrôle.

### III- Effet de l'expression de RANK sur la prolifération cellulaire

#### 1. Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été étudiée *in vitro* pour les cellules HOS et PG1 modifiées pour l'expression de RANK. Une partie des cellules a été traitée pendant 24 h avec du RANKL soluble.



**Figure 77 | Viabilité cellulaire des cellules surexprimant ou non RANK**

Les cellules HOS et PG1 exprimant (HOSRK ou PG1RK) ou non RANK (HOS ou PG1) ont été étudiées pour leur viabilité cellulaire en présence ou en absence de RANKL soluble (100ng/ml) humain ou murin.

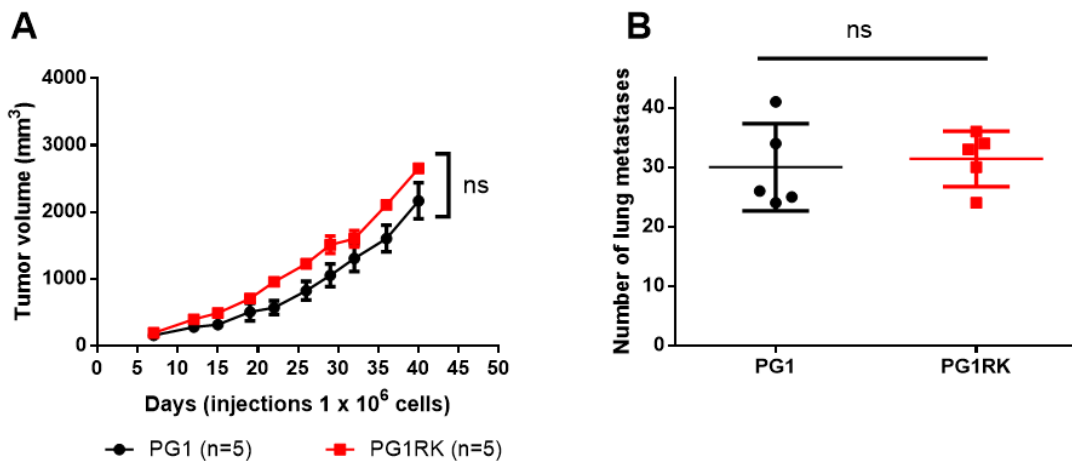
Tout d'abord, les résultats montrent que l'addition de RANKL sur les cellules natives n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire que ce soit pour les cellules HOS ou PG1 (**Figure 77**). De même, l'expression de RANK dans les cellules d'ostéosarcomes humaines et murines ne modifie pas la viabilité cellulaire de ces cellules (**Figure 77**). Cependant la stimulation des cellules exprimant RANK a tendance à diminuer légèrement la viabilité cellulaire, et ce de façon faiblement significative uniquement pour les cellules humaines (**Figure 77**).

## 2. Etude de la croissance tumorale *in vivo*

La vitesse de prolifération des cellules modifiées pour exprimer RANK a également été étudiée en injectant ces cellules chez la souris afin d'induire et de suivre la vitesse de croissance des tumeurs induites. Cette étude a été réalisée à la fois au sein d'un environnement immunocompétent (C57BL/6JRj) et d'un environnement immunodéficient (NMRI-nudes) en utilisant les cellules PG1 et A3N. Ceci afin d'étudier l'importance de l'immunité sur le développement des tumeurs exprimant RANK. Par ailleurs, les cellules humaines (HOS) ont été utilisées dans un environnement immunodéficient (NMRI-nude).

### 2.1. Croissance tumorale au sein d'individus immunocompétents

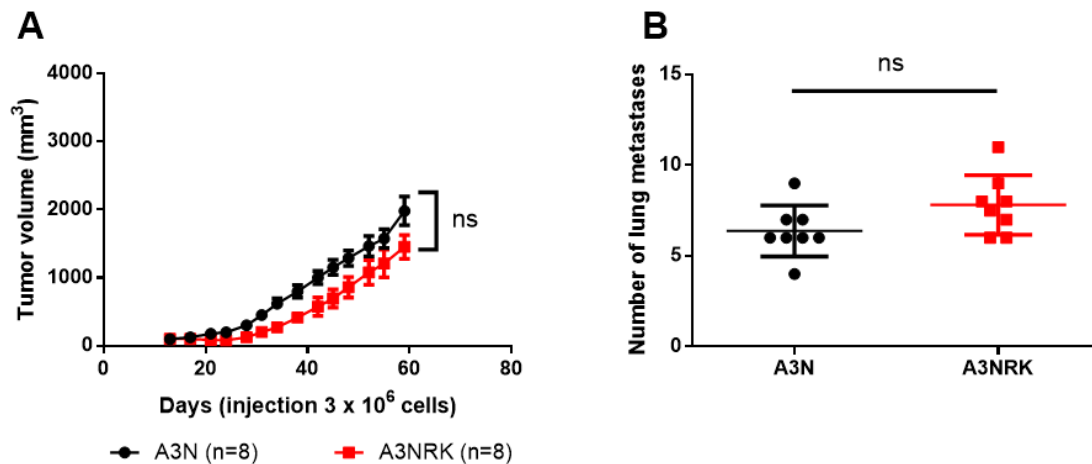
L'expression de RANK par les cellules PG1 ne semble pas impacter la vitesse de croissance des tumeurs induites chez la souris immunocompétente comme le montrent les résultats ci-dessous (Figure 78).



**Figure 78 | Injection des cellules PG1 surexprimant RANK ou non chez des souris immunocompétentes**

Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites chez des souris immunocompétentes C57BL/6JRj injectées avec un million de cellules PG1 surexprimant RANK (n=5) ou non (n=5). Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif.

L'expérience réalisée avec les cellules A3N natives et modifiées pour exprimer RANK donne les mêmes résultats que celle réalisée avec les cellules PG1 (**Figure 79**). En effet, mis à part un délai plus long dans l'obtention des tumeurs comparativement au PG1, aucune différence significative de croissance n'est observée entre les cellules natives et modifiées pour exprimer RANK (**Figure 79**).



**Figure 79 | Injection des cellules A3N surexprimant RANK ou non chez des souris immunocompétentes**

Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites chez des souris immunocompétentes C57BL/6Jrj injectées avec trois millions de cellules A3N surexprimant RANK (n=8) ou non (n=8). Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif.

En résumé, ces deux expériences permettent de conclure que l'expression de RANK par les cellules d'ostéosarcomes n'a aucun effet sur la croissance tumorale dans un environnement immunocompétent.

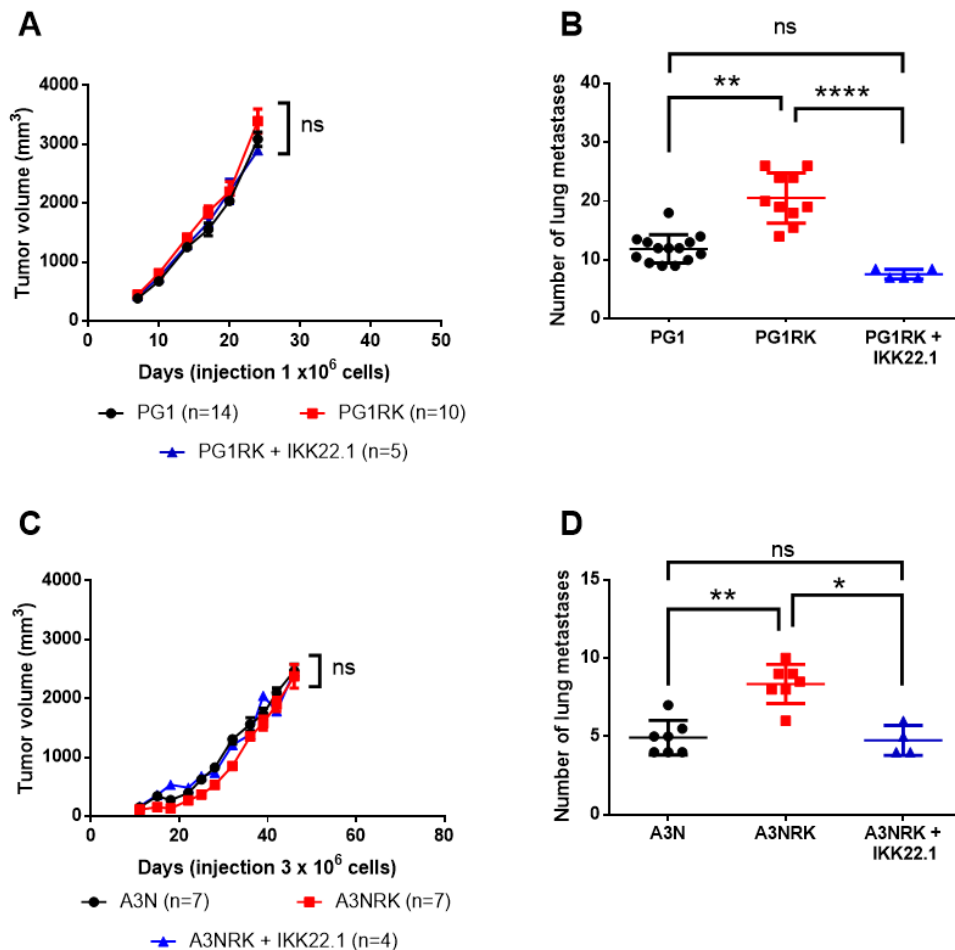
## 2.2. Croissance tumorale au sein d'individus immunodéficients

Les cellules murines ont ensuite été injectées chez des souris immunodéficientes NMRI-nudes afin d'évaluer l'importance du lymphocyte T dans le développement des tumeurs exprimant RANK. En effet les lymphocytes sont une source importante de RANKL.

Dans un premier temps, les résultats montrent que le développement des tumeurs est beaucoup plus rapide chez les individus immunodéficients que chez les individus immunocom-



pétents. En effet, les tumeurs induites à l'aide des cellules PG1 se développent en 28 jours chez des individus immunodéficients (**Figure 80**) alors qu'elles se développent en 40 jours chez les individus immunocompétents (**Figure 78**). De la même façon, un délai de développement plus court (env 42 jours) est observé chez les souris immunodéficientes pour les tumeurs induites par les cellules A3N (**Figure 80**) comparativement aux souris immunocompétentes (env. 60 jours) (**Figure 79**).

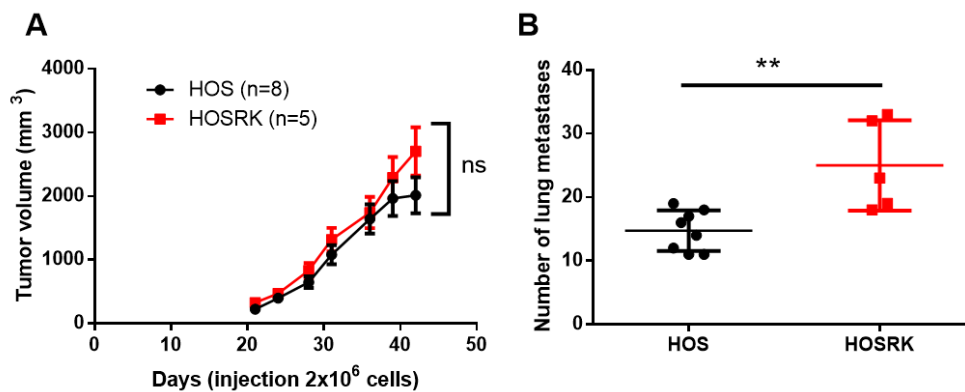


### Figure 80 | Injection des cellules murines d'ostéosarcomes surexprimant RANK ou non chez des souris immunodéficientes

Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites avec un million de cellules PG1 surexprimant RANK (n=10) ou non (n=14). Croissance tumorale (C) et nombre visible de métastases (D) des tumeurs induites avec trois millions de cellules A3N surexprimant RANK (n=7) ou non (n=7). Pour chaque expérience, une partie des individus ayant reçu les cellules PG1RK (n=5) et A3NRK (n=4) ont été traités avec un anticorps bloquant RANK-Ligand (IKK22.5). Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif ; \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01 ; \*\*\*\* p < 0.0001.

Au-delà de ce résultat concernant le développement des tumeurs natives, les données obtenues indiquent que l'expression de RANK par les tumeurs, que ce soit pour les cellules PG1 ou A3N, ne modifie pas la vitesse de croissance des tumeurs exprimant RANK chez des souris immunodéficientes (**Figure 80**).

Ce résultat a par la suite été validé à l'aide du modèle d'ostéosarcome HOS, toujours chez les souris NMRI-nudes, en injectant les cellules HOS natives et modifiées pour exprimer RANK. Les résultats obtenus valident les observations faites précédemment avec les cellules murines PG1 et A3N (**Figure 81**). C'est-à-dire que l'expression de RANK par les cellules tumorales n'influence pas la prolifération tumorale.



**Figure 81 | Injection des cellules HOS surexprimant RANK ou non chez des souris immunodéficientes**

Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites chez des souris immunodéficientes NMRI-nudes injectées avec deux millions de cellules HOS surexprimant RANK (n=8) ou non (n=5). Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif ; \*\* p < 0.01.

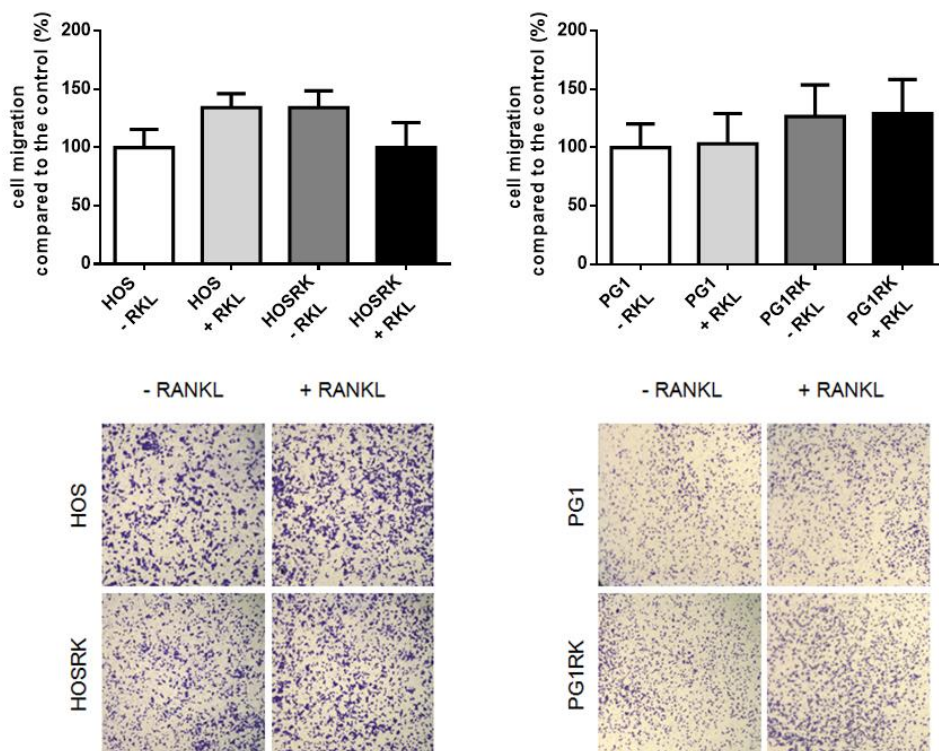
### 3. Effet du blocage de RANKL sur la croissance tumorale

L'effet du blocage de RANKL dans l'environnement a été étudié en injectant un groupe de souris à l'aide d'un anticorps anti-RANKL (IKK22.5). Les résultats obtenus indiquent que le blocage de RANKL n'a aucun effet sur la croissance des tumeurs et ce quelles que soient les cellules prises en compte (exprimant RANK ou non) (**Figure 80**).

## IV- Effet de l'expression de RANK sur la migration cellulaire et la dissémination métastatique

### 1. Analyse de la migration cellulaire *in vitro*

Afin de déterminer si l'expression de RANK constitue un élément favorisant la migration cellulaire, les cellules HOS et PG1 natives et modifiées pour l'expression de RANK ont été soumises à un test de migration en chambre de Boyden en présence comme en absence de RANKL soluble. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative dans les capacités migratoires des cellules exprimant RANK ou non, et ce quel que soit le modèle utilisé (**Figure 81**). De plus, l'addition de RANKL sur ces cultures ne modifie en rien ces résultats (**Figure 82**).



**Figure 82 | Etude de la migration *in vitro* des cellules HOS et PG1 modifiées ou non pour l'expression de RANK**

La migration des cellules HOS (A) et PG1 (B), exprimant RANK ou non, a été étudiée en chambre de Boyden en présence comme en absence de RANKL soluble. Les données sont présentées comme la moyenne  $\pm$  SE des 6 réplicats réalisés. Pour chaque échantillon, une vue représentative des champs observés est fournie. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif.

## 2. Dissémination métastatique *in vivo*

À l'issue des expériences *in vivo* déjà décrites pour l'étude de la croissance tumorale, le nombre de métastases pulmonaires visibles pour chaque individu a été compté. Comme pour l'étude des effets de RANK sur la croissance tumorale, les résultats ont été analysés par rapport à l'environnement immunitaire.

### 2.1. Effet de l'expression de RANK sur la dissémination métastatique chez des individus immunocompétents

Le nombre de métastases dénombré après sacrifice des souris C57BL/6JRj injectées avec les cellules PG1, exprimant RANK ou non, ne montre pas de différence significative dans les capacités migratoires des cellules entre les deux groupes d'individus (**Figure 78**). Ces résultats ont été confirmés par la même expérience réalisée avec les cellules A3N, puisqu'aucune différence concernant le nombre de métastases n'est observée entre les individus ayant reçu les cellules RANK et ceux ayant reçu les cellules natives (**Figure 79**).

### 2.2. Effet de l'expression de RANK sur la dissémination métastatique chez des individus immunodéficients

L'évaluation du nombre de métastases chez des individus immunodéficients ayant reçu les cellules PG1, surexprimant ou non RANK, montrent clairement et ce de façon significative une augmentation du nombre de métastases chez les individus ayant été injectés à l'aide des cellules PG1RK qui surexpriment RANK (**Figure 80**). Ce résultat est également confirmé dans l'expérience réalisée à l'aide des cellules A3N. En effet, une augmentation significative du nombre de métastases est observée entre les individus ayant reçu les cellules A3N natives et ceux ayant reçu les cellules A3N modifiées pour surexprimer RANK (**Figure 80**).

Enfin, les observations réalisées suite à l'injection des cellules murines chez la souris NMRI-nudes ont été confirmées avec le modèle xénogénique utilisant les cellules HOS. En effet, les résultats obtenus montrent une augmentation du nombre visible de métastases chez les individus ayant reçu les cellules HOS modifiées pour surexprimer RANK comparativement aux individus ayant reçu les cellules HOS natives (**Figure 81**). En conclusion, l'ensemble de ces

résultats semblent indiquer que l'expression de RANK favoriserait la dissémination métastatique dans un contexte d'immunodéficience.

### 3. Effet du blocage de RANKL sur la dissémination métastatique

Parmi les souris immunodéficientes injectées avec les cellules PG1 et A3N modifiées pour exprimer RANK, une partie a été traitée avec un anticorps bloquant RANKL (**Figure 80**). Bien que le blocage de RANKL n'ait aucun effet sur la croissance tumorale, il s'avère que ce blocage agit de façon intéressante sur la dissémination métastatique. En effet, pour ces deux expériences (PG1 et A3N), une forte diminution du nombre de métastases est observée chez les individus traités avec l'anticorps anti-RANKL (IKK22.5) comparativement aux individus ayant reçu les cellules exprimant RANK seul (**Figure 80**). De plus, ce traitement semble réduire le nombre de métastases au-delà du niveau basal observé pour les cellules natives, en tout cas pour les cellules PG1 (**Figure 80**).

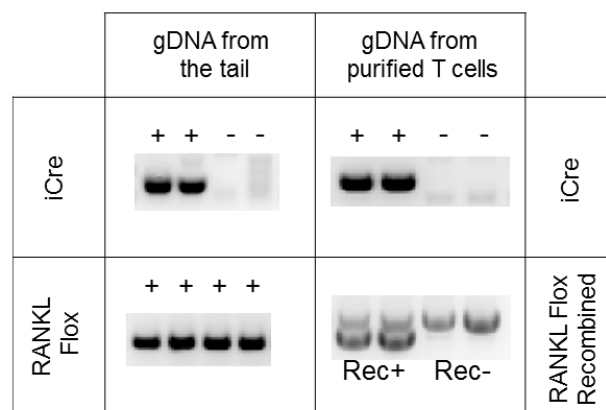
## V- Effet des modulations de la signalisation RANK /RANKL chez la souris hôte

Au-delà des modifications cellulaires de l'expression de RANK dans les lignées d'ostéosarcomes, l'implication de la signalisation RANK/RANKL a également été étudiée à l'aide de modèles génétiquement modifiés. Ainsi, les cellules natives ou surexprimant RANK ont été injectées à des souris invalidées pour RANKL spécifiquement dans les lymphocytes T, et à des souris transgéniques surexprimant RANK au sein de la lignée mono-cytes/macrophages.

### 1. Effet de l'inactivation de RANKL dans les lymphocytes T

Des souris RANKL<sup>flox/flox</sup> ont été croisées avec des souris LCK-Cre afin d'obtenir des individus invalidés spécifiquement pour RANKL dans les lymphocytes T (souris RANKL<sup>ΔT</sup>). Le géotypage et l'efficacité de la recombinaison de ces individus ont été contrôlés selon le protocole décrit dans le « Matériel et méthodes », et un extrait des données est présenté ci-dessous (**Figure 83**).

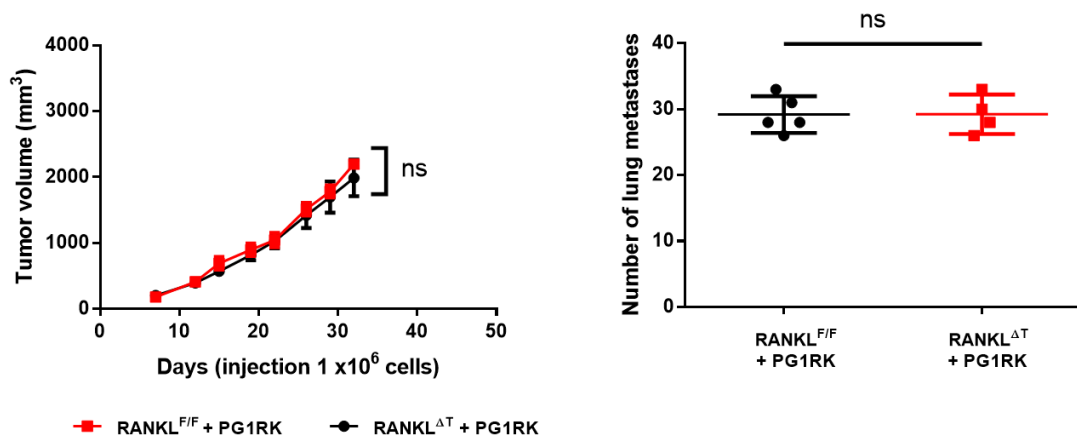
Dans un premier temps, avant les expériences, l'extraction de l'ADN génomique de la queue des souris permet de valider la présence de la Cre et la présence des allèles Flox pour RANKL (**Figure 83**). Par la suite, la recombinaison des souris est validée après sacrifice des animaux à partir de l'ADNg extrait des lymphocytes T issus de la rate. Ainsi, les PCRs réalisées permettent de confirmer la recombinaison de RANKL (Rec+) ou non (Rec-) (**Figure 83**).



**Figure 83 | Géotypage et validation de la recombinaison des souris RANKL<sup>ΔT</sup>**

La sélection des individus a été réalisée par PCR en analysant la présence de la iCre et de l'allèle RANKL Flox. A la fin des expérimentations, les rates des individus ont été récupérées afin d'en purifier les lymphocytes T pour valider la recombinaison sur l'ADNg de ces derniers.

En raison d'un faible nombre d'individus recombinés, une première expérience a été réalisée en injectant uniquement les cellules PG1 surexprimant RANK chez les individus recombinés ou non. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative dans la croissance tumorale au sein des groupes de souris étudiés, comme cela pouvait être attendu (**Figure 84**). Concernant la dissémination métastatique, les souris présentant des lymphocytes T déficients en RANKL développent le même nombre de métastases que les souris ayant des lymphocytes T sains (**Figure 84**). Ainsi, le RANKL lymphocytaire ne semble pas impliqué dans le processus de migration des tumeurs exprimant RANK.



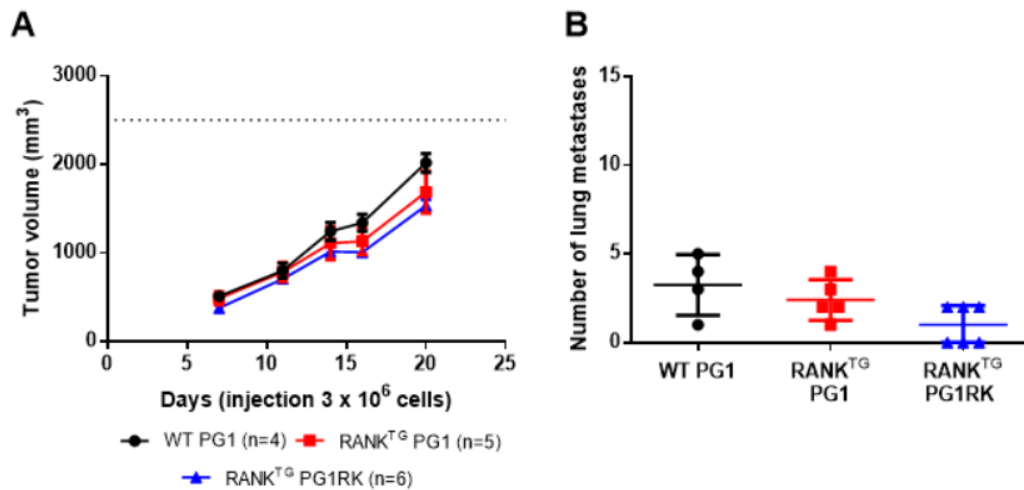
**Figure 84 | Injection des cellules PG1 surexprimant RANK chez des souris invalidées ou non pour RANKL dans les lymphocytes T**

Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites chez des souris invalidées (n=4) ou non (n=5) injectées avec un million de cellules PG1 surexprimant RANK. Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne ± SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif.

## 2. Effet de la surexpression de RANK dans le lignée monocytes/macrophages

L'effet de l'injection des cellules surexprimant RANK a également été analysé au sein d'un environnement immunitaire perturbé concernant la signalisation RANK grâce à des souris génétiquement modifiées pour surexprimer RANK dans le lignée monocytes/macrophages. Ces souris présentent une ostéoporose juvénile et une masse corporelle plus faible, ainsi qu'une hypertrophie des ganglions lymphatiques secondaires et de la rate [478,479].

Après validation du phénotype des souris, les cellules PG1 modifiées ou non pour exprimer RANK ont été injectées à des souris sauvages (WT) ou à des souris RANK transgène (RANK<sup>Tg</sup>). Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative dans la croissance tumorale des différentes tumeurs induites, et ce quel que soit le fond génétique des souris (**Figure 85**). Ce qui signifie que la surexpression de RANK par le linéage monocytes/macrophages n'influence pas la vitesse de prolifération des cellules tumorales.



**Figure 85 | Injection des cellules PG1 surexprimant RANK chez les souris RANK transgène**

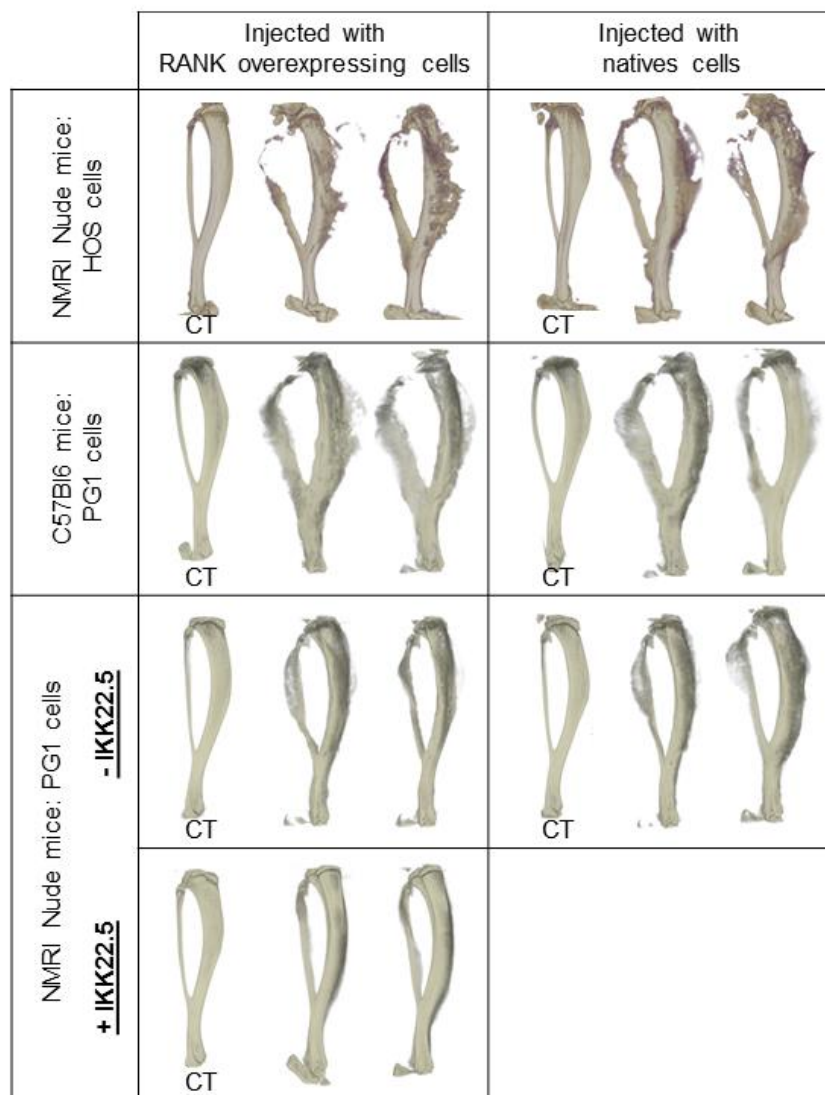
Croissance tumorale (A) et nombre visible de métastases pulmonaires (B) des tumeurs induites chez des souris sauvages ou RANK<sup>Tg</sup> injectées avec deux millions de cellules PG1 surexprimant RANK. Les courbes de croissance sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SEM. Toutes les données ont été analysées par un test de Kruskal Wallis : ns = non significatif.

Concernant le nombre de métastases observées entre les différents groupes d'individus, aucune différence significative n'est observée lors de l'injection des cellules PG1 chez des individus RANK<sup>Tg</sup> comparativement à des individus sauvages (Figure 85). Pour ce qui est de l'injection de cellules surexprimant RANK chez des individus RANK<sup>Tg</sup>, l'absence de métastases est observée dans environ 50 % des cas comparativement aux individus (sauvages comme RANK<sup>Tg</sup>) injectés avec des cellules PG1 (**Figure 85**).



## VI- Effet de l'expression de RANK sur l'ostéolyse et l'ostéoformation tumorale

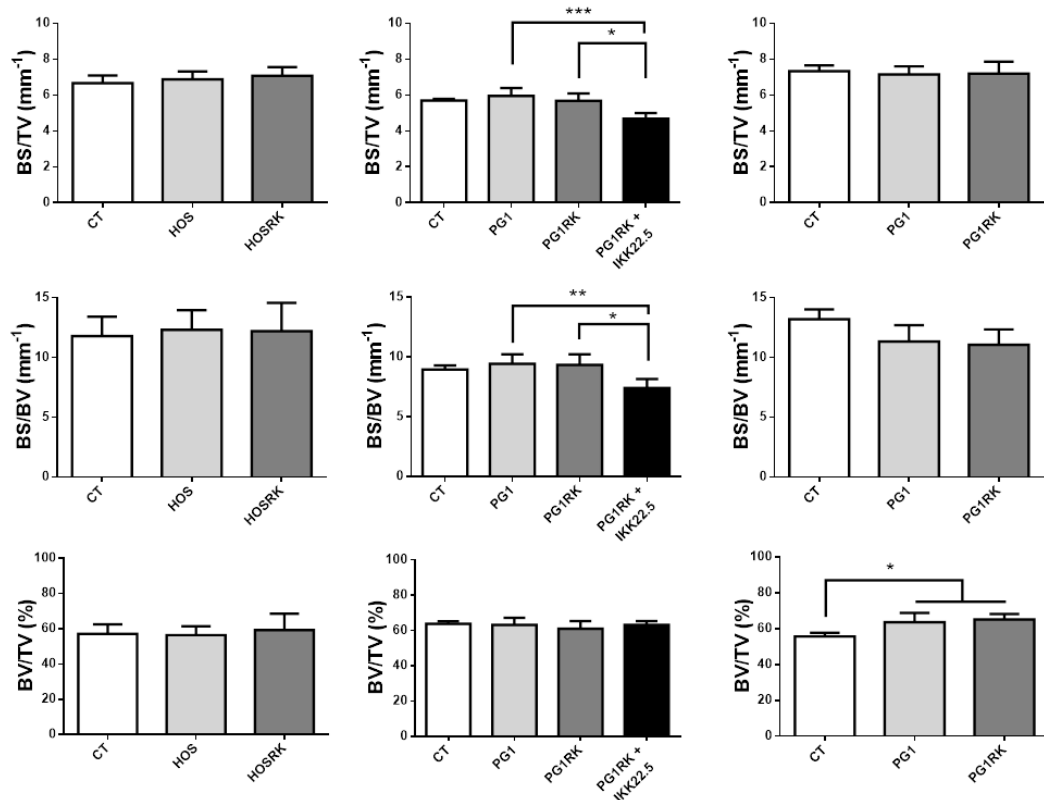
L'impact de l'injection des cellules surexprimant RANK sur l'ostéolyse induite par les tumeurs a été analysé dans les différents modèles *in vivo* utilisés précédemment par imagerie aux rayons X (microCT). Les données obtenues (**Figure 86**) semblent indiquer que l'expression de RANK par les tumeurs n'a aucun effet sur l'ostéolyse péri-tumorale. Seule l'utilisation de l'anticorps anti-RANKL protège l'os de l'ostéolyse et de l'ostéoformation (**Figure 86**).



**Figure 86 | Vues en 3 dimensions des tibias des souris injectées au cours de l'étude de l'expression de RANK par les ostéosarcomes**

Pour chaque expérience et groupe d'individus, une ou des vues représentatives ont été sélectionnées pour les pattes contrôle contralatérale (CT), pour les pattes ayant reçu les tumeurs et pour les pattes traitées avec l'anticorps anti-RANKL IKK22.5.

Les observations réalisées sur les vues en 3 dimensions (3D) des tibias reconstruits ont été renforcées par une analyse des paramètres osseux réalisée comme expliqué dans la partie « Matériel et méthodes ». Les données obtenues confirment les observations faites. En effet pour les individus injectés avec les cellules HOS ou HOSRK aucune variation significative des paramètres osseux n'est observée (**Figure 87**). En ce qui concerne les individus injectés avec les cellules PG1 ou PG1RK, la seule différence significative est observée pour le BV/TV (%) entre les pattes contrôles contra-latérales et celles ayant reçu des cellules tumorales (**Figure 87**). Ceci s'explique par le caractère très ostéolytique et ostéoformateur des cellules MOS-] PG1.

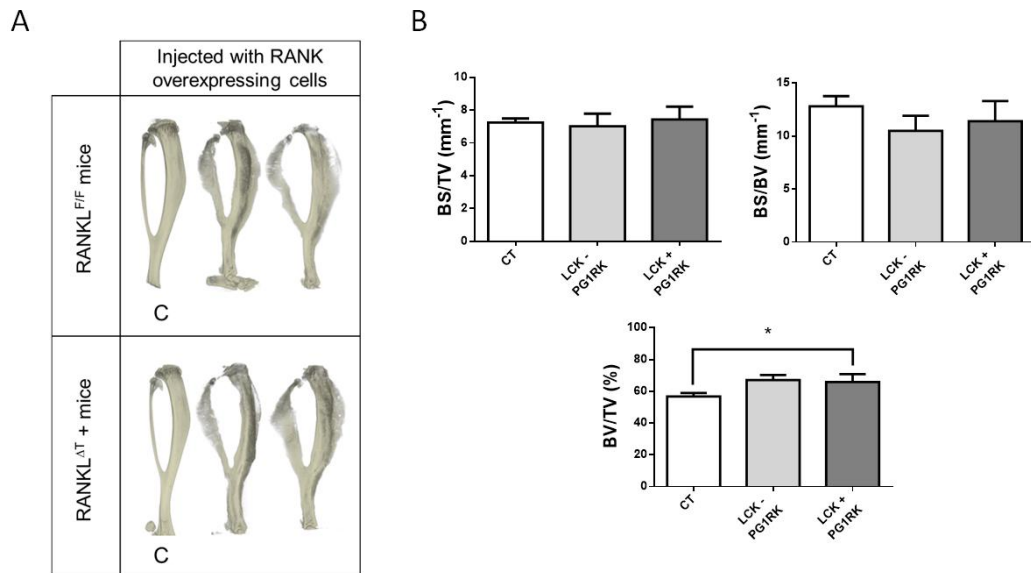


**Figure 87 | Analyse des paramètres osseux des tibias issus des expérimentations de l'étude sur RANK**

Pour chaque expérience et groupe d'individus, des analyses quantitatives à l'aide du logiciel Ctan ont été réalisées sur 450 coupes des images acquises par  $\mu$ CT. Les données pour le BS/TV (mm<sup>-1</sup>), le BS/BV (mm<sup>-1</sup>) et le BV/TV (%) sont représentées comme la moyenne  $\pm$  SD, et ont été analysées par un Test de Kruskal-Wallis : ns = non significatif ; \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001.

Enfin, des effets significatifs sur les différents paramètres osseux sont observés lors du traitement des individus à l'aide de l'anticorps IKK22.5 (**Figure 87**). La réduction des paramètres BS/TV et BS/BV indique que l'os a conservé une structure normale, mais qu'en contrepartie ce dernier s'est légèrement « épaissi/condensé » à cause du blocage de la résorption osseuse (**Figure 87**). À noter que dans un environnement immunodéficient, aucune différence significative du paramètre BV/TV n'est observée entre les pattes contralatérales et celles ayant reçu des cellules PG1 contrairement à l'observation faite précédemment chez des individus immunocompétents (**Figure 87**). Cela suggère un potentiel rôle du système immunitaire dans les processus de résorption tumorale.

Par ailleurs, l'analyse de la structure et des paramètres osseux a également été réalisée chez les souris RANKL<sup>ΔT</sup> comparativement aux individus sauvages (**Figure 88**). Les données obtenues ne montrent pas de différence significative dans l'ostéolyse et l'ostéoformation induite entre ces deux populations (**Figure 88**). Seule, une augmentation du BV/TV est observée entre les pattes contrôles contralatérales et les pattes ayant reçu les cellules PG1RK, comme cela a été observé chez des individus immunocompétents (**Figure 88**). Ainsi, le RANKL lymphocytaire ne semble pas impliqué dans les processus d'ostéolyse et d'ostéoformation tumorale.



**Figure 88 | Vue en 3D et analyse des paramètres osseux des tibias issus de l'expérimentation réalisée chez la souris RANKL<sup>ΔT</sup>**

Vues en 3D représentatives (A) et analyses quantitatives (B) des tibias de chaque groupe de souris utilisées au cours de l'expérience sur les souris RANKL<sup>ΔT</sup>. Les données pour le BS/TV (mm<sup>-1</sup>), le BS/BV (mm<sup>-1</sup>) et le BV/TV (%) sont représentées comme la moyenne ± SD, et ont été analysées par un Test de Kruskal-Wallis : ns = non significatif ; \* p < 0.05.

## VII- Effets transcriptionnels liés à la surexpression de RANK dans la cellule ostéosarcomateuse et à la stimulation par RANKL

Une analyse transcriptionnelle des effets induits par l'ajout de RANKL soluble sur les cellules HOS surexprimant RANK comparativement aux cellules natives a été réalisée. Cette étude s'est intéressée à rechercher les effets sur plusieurs oncogènes et sur les grandes fonctions cellulaires (prolifération et apoptose, différenciation et migration) à travers l'analyse de gènes connus pour être impliqués dans ces processus. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 20**).

### 1. Effet de l'addition de RANKL sur les transcrits de la triade RANK/RANKL/OPG

Les résultats des PCR quantitatives analysant l'impact de l'ajout de RANKL sur les cellules HOS et sur les cellules HOSRK montrent que l'addition de RANKL sur ces cellules induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle de RANKL suggérant une « autoactivation » de ces cellules (**Tableau 20**). L'augmentation de RANKL est beaucoup plus élevée dans les cellules surexprimant RANK que dans les cellules natives. Ceci est en corrélation avec le taux d'expression de RANK dans ces différentes cellules (**Tableau 20**).

De plus l'addition de RANKL n'a aucun effet sur les niveaux d'expression des transcrits d'OPG et de RANK aussi bien au sein des cellules HOS natives que des cellules surexprimant RANK (**Tableau 20**).

### 2. Effet de l'addition de RANKL sur l'apoptose et la prolifération cellulaire

Les effets de RANKL sur l'apoptose et la prolifération des cellules ostéosarcomateuses exprimant RANK ou non ont été évalués en analysant l'expression des gènes p53, p21, Bcl-2 et Bax (**Bcl-2-associated X protein**). Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative pour l'expression des gènes Bax, Bcl-2 et p53 (**Tableau 20**). Cependant une augmenta-

tion significative du niveau d'expression (x4) de p21 est observée chez les cellules HOSRK lorsque ces dernières sont stimulées par RANKL (**Tableau 20**).

### 3. Effet de l'addition de RANKL sur la différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire des cellules d'ostéosarcomes HOS a été abordée au travers de l'analyse de plusieurs marqueurs de l'ostéoblaste. Bien qu'aucune des cibles analysées ne bouge lors de l'addition de RANKL sur les cellules natives, le résultat est différent pour les cellules HOSRK (**Tableau 20**). En effet, l'addition de RANKL sur les cellules HOSRK induit une augmentation de l'expression de la BMP2, de l'ostéopontine (OP) et de la BSP (**Tableau 20**). L'expression de la BSP étant plus largement augmentée que celle de BMP2 et de l'ostéopontine (OP) (**Tableau 20**). À l'inverse, l'addition de RANKL sur les cellules HOSRK diminue l'expression de Sox9 et du Coll1A. Ainsi, ces données suggèrent que l'addition de RANKL sur les cellules HOS surexprimant RANK pousse les cellules vers le stade d'ostéoblaste mature.

### 4. Effet de l'addition de RANKL sur la migration cellulaire

Les effets suspectés de RANKL sur la migration cellulaire ont été étudiés en partie en analysant plusieurs gènes codant pour des métalloprotéases ou leurs inhibiteurs jouant un rôle dans la dégradation de la matrice osseuse.

Ainsi, parmi les gènes étudiés, il s'avère que l'addition de RANKL sur les cellules HOSRK induit l'expression de la MMP9, de la MMP13 et l'inhibition de TIMP2 (**Tableau 20**). Il faut noter que ces effets ne sont pas retrouvés pour la cellule native (**Tableau 20**).

Par ailleurs, aucune modification des expressions de MMP2 et de TIMP1 n'a été observée lors de l'addition de RANKL sur les cellules HOS comme sur les cellules HOSRK (**Tableau 20**).

## 5. Effet de l'addition de RANKL sur des gènes impliqués dans l'oncogenèse

L'analyse transcriptionnelle des gènes c-flip, c-met et c-myc au sein des cellules HOS stimulées ou non par RANKL ne montre pas de différence significative dans l'expression de ces gènes (**Tableau 20**). Par contre ces gènes, sauf c-met, sont augmentés lors de la stimulation des cellules HOSRK par RANKL (**Tableau 20**).

## 6. Effet de l'addition de RANKL sur d'autres cibles transcriptionnelles

Au cours de ces études, d'autres gènes ont été étudiés comme des cibles de la signalisation RANK. Parmi ces cibles, les gènes NF $\kappa$ B et Nfatc1 sont augmentés lors de l'addition de RANKL sur les cellules HOS surexprimant RANK alors qu'aucun effet n'est observé pour la cellule native (**Tableau 20**).

	Fold Change HOS +RKL vs HOS	Fold Change HOSRK +RKL vs HOSRK
RANK	1,10 ± 0,18	1,58 ± 0,14
RANKL	4,44 ± 1,99	77,94 ± 31,37
OPG	1,00 ± 0,10	1,09 ± 0,12
<b>Apoptose and proliferation</b>		
Bax	1,18 ± 0,12	1,21 ± 0,11
Bcl2	0,96 ± 0,23	1,28 ± 0,15
p21	1,18 ± 0,21	4,22 ± 0,57
p53	1,05 ± 0,08	0,81 ± 0,12
<b>Differentiation</b>		
BMP2	1,21 ± 0,35	3,24 ± 0,51
DKK1	1,12 ± 0,18	0,71 ± 0,09
Runx2	0,99 ± 0,07	0,78 ± 0,54
Sox9	0,85 ± 0,07	-2,14 ± 0,05
Coll1a	0,91 ± 0,07	-6,00 ± 0,05
OC	1,70 ± 0,14	1,41 ± 0,15
OP	1,58 ± 0,12	2,81 ± 0,42
BSP	0,94 ± 0,32	50,25 ± 20,44
<b>Migration</b>		
MMP2	0,76 ± 0,16	0,70 ± 0,06
MMP9	0,97 ± 0,14	7,98 ± 0,97
MMP13	1,24 ± 0,30	11,73 ± 1,41
Timp1	1,07 ± 0,08	1,07 ± 0,12
Timp2	0,95 ± 0,13	0,72 ± 0,11
<b>Oncogenes</b>		
c-flip	0,81 ± 0,07	2,59 ± 0,44
c-met	0,88 ± 0,10	0,90 ± 0,25
c-myc	0,85 ± 0,07	3,58 ± 0,31
<b>Others</b>		
Nfatc1	1,20 ± 0,14	7,13 ± 3,48
Nfkb	1,05 ± 0,22	2,07 ± 0,53
TGF1	1,01 ± 0,07	1,13 ± 0,20

**Tableau 20 | Analyse transcriptionnelle des effets de l'addition de RANKL sur les cellules HOS et HOSRK**

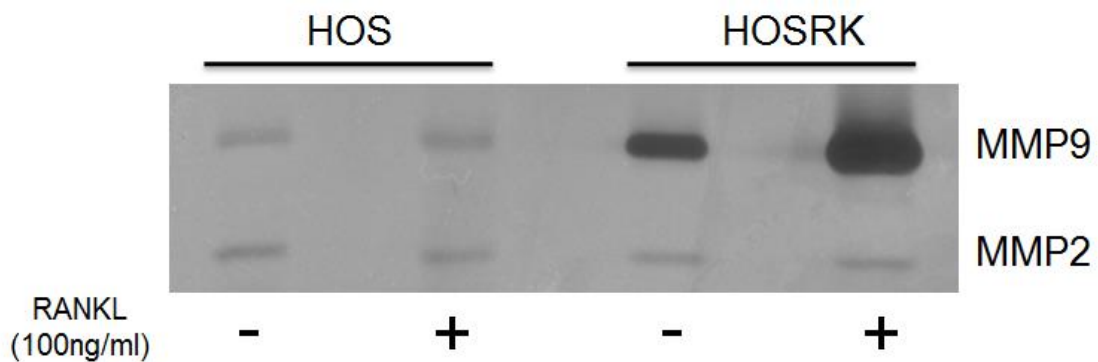
L'analyse transcriptionnelle a été réalisée sur les cellules HOS et HOSRK stimulées ou non pendant 24h à l'aide de RANKL soluble (100ng/ml). Les données sont fournies comme l'expression relative ± SD rapportées aux gènes de référence (ACTB et GAPDH) et aux contrôles non traités.

## VIII- Analyse de l'activité des métalloprotéases MMP2 et MMP9

Afin de confirmer les résultats observés par PCR quantitative, montrant une augmentation des niveaux de transcrits de MMP9, une analyse de l'activité de MMP9 et de MMP2 a été réalisée par zymographie en présence comme en absence de RANKL (**Figure 89**).

Les résultats obtenus montrent une augmentation du niveau basal d'activité de MMP9 dans les cellules modifiées pour surexprimer RANK comparativement aux cellules natives (**Figure 89**). De plus, l'addition de RANKL sur les cellules modifiées induit une forte augmentation de l'activité de MMP9, alors que RANKL n'a aucun effet sur les cellules HOS natives. Ces résultats valident les observations réalisées en PCR quantitative (**Figure 89**).

Concernant l'activité de MMP2, les résultats montrent que l'expression de RANK par les cellules HOS, comme leurs stimulations par du RANKL soluble, ne modifient pas l'activité de cette métalloprotéase (**Figure 89**). Ce résultat est cohérent avec les données issues de l'analyse transcriptionnelle.



**Figure 89 | Analyse de l'activité des métalloprotéases MMP2 et MMP9**

Les surnageants des cellules HOS et HOSRK traités ou non avec du RANKL soluble (100ng/ml) ont été analysés par zymographie sur gel de gélatine.



**Partie III : Relation entre la signalisation RANK/RANKL et les homéogènes *Dlx***

Au cours des études précédentes visant à étudier l'implication des homéogènes *Dlx* et/ou de la signalisation RANK/RANKL dans la physiopathologie de l'ostéosarcome, la présence de liens entre les homéogènes *Dlx* et la signalisation RANK/RANKL a été recherchée.

Pour ce faire, une analyse de l'expression transcriptionnelle de RANK, RANKL et OPG a été réalisée dans des cellules transfectées transitoirement par des plasmides contenant la séquence complète de différents homéogènes *Dlx* (*Dlx2*, *Dlx3* et *Dlx4*), et dans les cellules utilisées dans l'étude du rôle de *Dlx4* dans la physiopathologie de l'ostéosarcome (transfection stable de *Dlx4* et de *BP2*, ainsi que les shARN anti *Dlx4*).

L'analyse inverse, c'est-à-dire des effets de l'expression de RANK sur les homéogènes *Dlx* n'a pas encore été abordée, mais elle le sera prochainement sur les cellules modifiées pour l'expression de RANK.

## **I- Effet de la surexpression transitoire des gènes *Dlx* sur les gènes RANK/RANKL/OPG**

Une transfection transitoire des gènes *Dlx2*, *Dlx4* et *Dlx5* a été réalisée au sein des cellules MOS-J A3N afin d'analyser après 24h, les effets de cette induction sur les gènes de la triade.

L'analyse des gènes *Dlx* confirme l'augmentation des transcrits concernée dans chaque modèle établi (**Tableau 21**), validant l'efficacité des transfections. De même, il est observé que le gène *Dlx5* n'est pas exprimé constitutivement dans les cellules A3N, et que son induction dans ce modèle conduit à l'augmentation des niveaux d'expression des transcrits de *Dlx4* et *Dlx2* (**Tableau 21**). Par ailleurs, l'induction de *Dlx2* semble inhiber l'expression de *Dlx4* (**Tableau 21**).

Concernant les effets des homéogènes *Dlx* sur les membres de la triade RANK/RANKL/OPG, il s'avère que l'expression de RANKL est inhibée par les gènes *Dlx2* et *Dlx4*, alors qu'elle est augmentée par la surexpression de *Dlx5* (**Tableau 21**). Dans le même temps, *Dlx2* et *Dlx5* ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression d'OPG alors que *Dlx4* l'augmente (**Tableau 21**). Concernant l'expression de RANK, aucun signal n'est détecté pour ce transcrit dans les cellules A3N modifiées ou non.

	A3N - Dlx2	A3N - Dlx4	A3N - Dlx5
<b>RANKL</b>	0,38 ± 0,05	0,15 ± 0,03	6,52 ± 1,22
<b>OPG</b>	0,94 ± 0,10	1,87 ± 0,50	1,44 ± 0,14
<b>Dlx2</b>	66,48 ± 9,79	1,38 ± 0,29	2,69 ± 0,74
<b>Dlx4</b>	0,64 ± 0,07	322,73 ± 82,5	4,42 ± 0,41
<b>Dlx5</b>	0	0	1639 ± 170,2

**Tableau 21 | Analyse des effets de l'expression transitoire de *Dlx2*, *Dlx4* et *Dlx5* sur les membres de la triade RANK/RANKL/OPG**

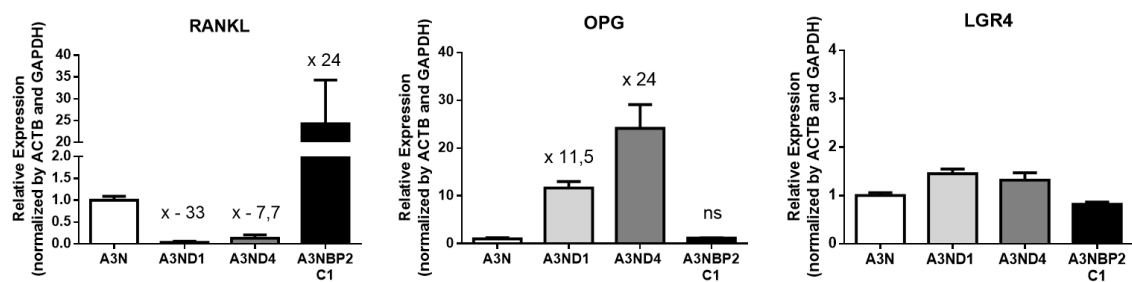
Les données sont fournies comme la moyenne ± SD de l'expression relative des différents échantillons rapportée par rapport aux gènes de référence et aux contrôles transfectés à l'aide d'un vecteur vide.

## **II- Effet de la surexpression stable de *Dlx4* sur les gènes RANK/RANKL/OPG**

Les effets de la surexpression des isoformes de *Dlx4* (*Dlx4* et *BP2*) sur les gènes de la triade RANK/RANKL/OPG, ainsi que sur *LGR4*, ont également été analysés dans les clones stables utilisés pour la réalisation des expériences *in vivo* précédemment décrites.

Les résultats obtenus confirment l'observation faite précédemment sur l'absence d'expression de RANK dans les cellules A3N. En effet, RANK n'est pas détecté dans les différentes cellules utilisées au cours de cette analyse (**Figure 90**).

Concernant les effets de la surexpression de la forme longue de *Dlx4* sur RANKL, les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de l'expérience précédente utilisant des transfections transitoires. En effet, la forme longue de *Dlx4* inhibe très fortement l'expression de RANKL (**Figure 90**). De même, l'effet retrouvé sur le niveau d'expression du transcrite d'OPG est similaire dans le sens où l'expression de la forme longue de *Dlx4* induit l'OPG. Toutefois, l'induction d'OPG est beaucoup plus forte avec les transfections stables (**Figure 90**).



**Figure 90 | Analyse de l'expression des transcrits de RANKL, OPG et LGR4 au sein des lignées A3N modifiées**

L'effet des surexpressions stables des isoformes de *Dlx4* a été analysé par RT-qPCR. Les effets observés sont présentés en positif pour des stimulations et en négatif pour des inhibitions.

En ce qui concerne les effets du second transcrit de *Dlx4*, *BP2*, il s'avère que la surexpression de BP2 induit fortement l'expression de RANKL mais n'a aucun effet sur celle de l'OPG (**Figure 90**). Ces deux effets sont à l'opposé de ceux observés pour *Dlx4*.

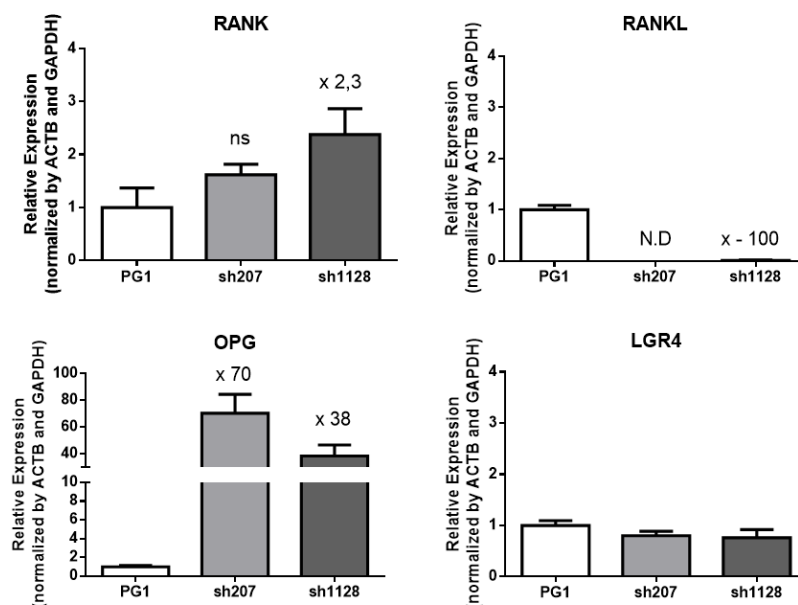
Suite à la découverte récente d'une relation ligand-récepteur entre RANKL et LGR4, l'analyse de l'expression de ce récepteur a été menée dans les cellules A3N surexprimant les isoformes de *Dlx4*. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative dans l'expression de LGR4 au sein des cellules A3N modifiées ou non pour l'expression d'une isoforme de *Dlx4* (**Figure 90**).

### III- Effet de l'inhibition de *Dlx4* sur l'expression des membres de la triade RANK/RANKL/OPG

Les effets de *Dlx4* sur l'expression transcriptionnelle de RANK/RANKL/OPG, ainsi que celle de LGR4, ont également été analysés dans les cellules PG1 transduites à l'aide des shARN anti-*Dlx4*.

Les données obtenues sont surprenantes dans le sens où l'inhibition de *Dlx4*, dans les cellules PG1, induit les mêmes effets que la surexpression de *Dlx4* dans les cellules A3N. En effet, l'inhibition de *Dlx4* dans les cellules PG1 conduit à une forte inhibition de l'expression de RANKL et à une forte augmentation de celle d'OPG (**Figure 91**).

Les cellules PG1 exprimant RANK de façon naturelle, l'effet de *Dlx4* sur l'expression de RANK a pu être analysé. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de *Dlx4* conduit à une faible augmentation du niveau transcriptionnel de RANK, au moins dans les cellules transduites à l'aide du sh1128 (**Figure 91**). Par ailleurs, tout comme pour la surexpression de *Dlx4* dans les cellules A3N, aucune modification de l'expression de LGR4 n'est observée (**Figure 91**).



**Figure 91 | Analyse de l'expression des transcrits de RANKL, OPG et LGR4 au sein des lignées PG1 transduites par les shARN anti-*Dlx4***

L'effet de l'inhibition de *Dlx4* a été analysé par RT-qPCR. Les effets observés sont présentés en positif pour des stimulations et en négatif pour des inhibitions.

# Discussions

## I- Implication des homéogènes *Dlx*, en particulier *Dlx4*, dans la physiopathologie de l'ostéosarcome

Sur la base de données préliminaires montrant une expression aberrante de certains gènes *Dlx*, en particulier *Dlx1* et *Dlx4*, dans l'ensemble des lignées d'ostéosarcomes du laboratoire, une première exploration de l'effet de l'expression de *Dlx4* dans l'ostéosarcome avait été réalisée à l'aide de sous-clones de la lignée MOS-J exprimant différenciellement *Dlx4*. Ces résultats avaient alors permis d'établir l'hypothèse selon laquelle *Dlx4* pourrait être impliqué dans la physiopathologie de l'ostéosarcome sur le plan prolifératif, ostéolytique et ostéoformateur.

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire était ainsi de valider cette hypothèse en modifiant le niveau d'expression de *Dlx4* dans les clones cellulaires issus de la lignée ostéosarcomateuse MOS-J. Pour ce faire, deux stratégies ont été employées : l'une consistant à surexprimer le gène *Dlx4* dans les cellules A3N (exprimant faiblement *Dlx4*) à l'aide d'un vecteur d'expression, et l'autre consistant à l'inhiber dans les cellules PG1 (l'exprimant fortement) par une approche d'ARN interférence (shARN). Dans cette perspective, les outils nécessaires à la réalisation de ces travaux ont été obtenus avec succès (cellules A3N et PG1 modifiées), permettant la réalisation d'une première approche *in vivo*, en parallèle d'études *in vitro*. L'analyse s'est principalement axée sur le rôle de *Dlx4* dans la prolifération cellulaire.

Concernant la surexpression de *Dlx4* dans les cellules A3N, les résultats des expériences menées *in vivo* comme *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle de *Dlx4* dans la prolifération cellulaire (et la croissance tumorale) comme cela était supposé. Par contre l'inhibition de *Dlx4* dans les cellules PG1 a pour sa part fourni des résultats prometteurs. En effet, un retard, voire une absence de développement des tumeurs a pu être observée chez environ 50 % des souris injectées. A l'évidence, l'observation d'un départ tardif de ces tumeurs constitue un premier pas vers la confirmation d'une implication de *Dlx4* dans la croissance (l'agressivité) tumorale.

Néanmoins, les expériences réalisées avec les shARNs montrant une grande diversité de réponse inter-individus, la question de la stabilité de l'expression des shARNs au cours du temps en relation avec l'état prolifératif ou pseudo-différencié de la cellule s'est posée. Pour répondre à cette question, la remise en culture de pièces tumorales et de métastases a été réalisée. Les résultats qui en sont ressortis indiquent que l'expression de *Dlx4* se stabilise sans pour

autant retrouver un niveau d'expression initiale. Au vu de ces résultats, il est possible que l'expression des shARNs et/ou de *Dlx4* ne soit pas stable au cours du cycle cellulaire induisant un effet transitoire ou alternatif des shARNs sur l'expression de *Dlx4*. Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse plus poussée de l'expression de *Dlx4* au cours du temps et du cycle cellulaire devra être envisagée. De même, la réalisation de lignées exprimant les shARNs, voire même *Dlx4*, de façon conditionnelle en s'appuyant sur le système d'expression Tet-On® devrait permettre d'identifier ces variations de façon plus précise et de mieux les contrôler. Cette étude est en cours de réalisation, puisque les shARNs ont été récemment clonés dans des plasmides contenant le système de réponse à la tétracycline.

Les divergences de résultats observées entre les expériences de surexpression et d'inhibition de *Dlx4* montrent que le rôle de *Dlx4* dans la physiopathologie de l'ostéosarcome n'est pas si simple. Cela pose plusieurs questions sur le fonctionnement du système de régulation de *Dlx4* (isoformes, partenaires, épigénèse) et sur son niveau d'implication dans l'ostéosarcome (prolifération, ostéolyse...).

L'existence d'isoformes murines de *Dlx4* a en premier lieu été recherchée étant donné la connaissance de leur présence chez l'homme. En effet, trois isoformes de *Dlx4* sont connues chez l'homme nommées *BP1*, *Dlx7* et *Dlx4* [304,476,480]. La caractérisation et les fonctions du gène *Dlx4* et de ses isoformes restent encore mal définies, et de nombreuses erreurs persistent dans les banques de données (NCBI, Ensembl, Uniprot...). Voici ce que nous pouvons en dire aujourd'hui. L'isoforme *BP1* est surtout connue pour son rôle dans la répression de l'expression de la  $\beta$ -globine alors que cette fonction est perdue pour l'isoforme *Dlx7* [476,480]. Bien que peu de données soient disponibles sur leurs fonctions, de nombreuses études mettent en évidence une expression anormale de *BP1* et de *Dlx7* dans plusieurs cancers. L'expression de *BP1* (*Dlx4* forme longue), relativement élevée, dans le cancer du sein [425,429,453,481–484], les leucémies [421,485], le cancer du poumon [486], du foie [487], du placenta [444], de l'ovaire [445,488,489] et de la prostate [436] serait plutôt de mauvais pronostic concernant l'espérance de vie, la résistance aux traitements [421,490] ou encore l'apparition de métastases. Ainsi, dans ces différents cancers, le potentiel « cancérogène » de *Dlx4* s'exprimerait par la perturbation de plusieurs fonctions comme l'apoptose [444,453,484,491], la prolifération [436,481,483,492,493], la vascularisation [445,489], l'adhésion et la migration cellulaire [431,481,483,488].

Notre recherche des isoformes murines de *Dlx4*, nous a permis de mettre en évidence l'existence de deux transcrits supplémentaires chez la souris dont l'un code pour une protéine



(BP2). L'existence de ces transcrits avait déjà été suggérée par Nakamura et *coll.* [304], mais aucune donnée de séquence ni étude de fonction n'avaient alors été fournies. Pour ce qui est de la correspondance de ces transcrits avec les transcrits de la nomenclature humaine, il semble que l'isoforme que nous avons appelée *Dlx4* au cours de notre étude corresponde à l'isoforme *BP1* humaine, et que notre isoforme *BP2* corresponde à *Dlx7* (**Tableau 22**). En ce qui concerne le transcrit *BP1* murin que nous avons identifié, il pourrait s'agir d'un ARN pré-messager codant pour *BP2*, cette possibilité reste à étudier.

Souris	Humain (selon Berg PE)	Humain (selon NCBI)
<i>Dlx4</i>	BP1	<i>Dlx4</i> - isoforme a
BP2	<i>Dlx7</i>	<i>Dlx4</i> - isoforme b

**Tableau 22 | Correspondance entre les formes murines et humaines de *Dlx4***

La nomenclature des transcrits souris est celle donnée dans ce mémoire, alors que la nomenclature des transcrits humains est celle donnée par Patricie E. Berg (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology) et par la base de données du NCBI (septembre 2016).

La recherche d'une fonction « oncogénique » pour *BP2* a été cherchée par surexpression de cette dernière dans les cellules A3N et PG1. La surexpression n'a pas permis de mettre en évidence de différence de prolifération *in vitro* entre les clones surexprimant ou non *BP2*. Néanmoins, bien que la surexpression de *BP2* dans les cellules PG1 n'ait aucun effet sur la croissance tumorale *in vivo*, comparativement au contrôle, la même expérience réalisée avec les cellules A3N a fourni des résultats intéressants dans la mesure où un unique individu injecté avec les cellules modifiées a développé une tumeur. Ce résultat s'il se confirme constituerait une avancée importante dans la démonstration de l'implication du système *Dlx4* dans le développement de l'ostéosarcome même si le(s) rôle(s) exact(s) des différentes isoformes reste(nt) à déterminer.

Au-delà de l'existence de plusieurs isoformes pour *Dlx4*, la possibilité d'une régulation de type épigénétique (méthylation, microARN, super-enhancers...) de l'expression de *Dlx4* n'est pas à exclure et pourrait grandement compliquer l'analyse des résultats de nos expérimentations. Cette possibilité est soutenue par la richesse de la séquence de l'exon 1 en base guanine et cytosine (83,3 % sur les 120 premières bases et 63,3% sur l'ensemble de l'exon), mais égale-

ment par plusieurs données issues de la littérature qui montrent que le gène *Dlx4* est sujet à la méthylation dans de nombreux cancers et que certaines de ces méthylations constituent un marqueur de mauvais pronostic [494–497]. De façon intéressante, l'hyperméthylation impacterait de façon plus importante la forme courte de *Dlx4* (*Dlx7*), dont l'implication sur le plan cancéreux est peu documentée, via une méthylation de son promoteur [494,495]. La forme longue de *Dlx4* (*BP1*) serait, elle, moins impactée ce qui est cohérent avec les nombreuses données qui montrent que son expression est corrélée avec un mauvais devenir dans de nombreux cancers. Outre la régulation de l'expression du gène *Dlx4* par des mécanismes de méthylation, une étude récente de Xie et coll., dans le cancer du foie, a montré que l'expression de *Dlx4* pouvait être inhibée par le microARN-122 [492]. Cette inhibition de *Dlx4* par ce microARN conduit à une diminution de la viabilité cellulaire et à une diminution des capacités de clonogénicité [492]. Enfin, l'existence d'une régulation plus complexe à l'aide d'un transcrypt antisens ou via des structures de types super-enhancers devra être étudiée. En effet, la prédiction de l'existence d'un transcrypt antisens murin pour *Dlx4* (refGenbank : AK080562)[498], ainsi que la grande similitude de structure des gènes *Dlx* avec certains gènes ayant déjà été décrits pour fonctionner à l'aide de structures de types enhancers suggèrent un fonctionnement similaire pour *Dlx4*. En effet, le second transcrypt de *Dlx4* a un potentiel traductionnel faible, ce qui est cohérent avec les données générales sur le fonctionnement des super-enhancers décrites par Kowalczyk et coll. [499]. L'émergence du rôle de ces structures dans le cancer est très prometteur, et nécessitera d'être abordée dans la suite de cette étude [500].

Par ailleurs, l'existence de régulations croisées entre les gènes *Dlx*, comme décrites dans l'introduction, pourrait également perturber notre analyse concernant l'implication de *Dlx4* dans la physiopathologie de l'ostéosarcome. En effet, au cours de notre étude, des modulations par *Dlx4* ont été observées pour l'expression de plusieurs gènes *Dlx* (**Tableau 23**).

	Surexpression		Inhibition	
	Dlx4 (A3ND1/A3ND4)	BP2	sh207	sh1128
Dlx1		x - 5		
Dlx2				x - 3
Dlx3	x17 / x 3,5	x 2	x - 3,4	x - 4

**Tableau 23 | Résumé des effets de *Dlx4* sur l'expression des autres gènes *Dlx***

Les effets négatifs de *Dlx4* sur l'expression des autres gènes sont représentés en rouge, alors que les effets positifs sont représentés en vert. La couleur grise indique une absence de modification significative de l'expression.

Bien que des effets ponctuels soient uniquement observés sur l'expression de *Dlx1* et *Dlx2*, il semble que le cluster *Dlx1/Dlx2* puisse être une cible de *BP2* (qui pour rappel n'est pas exprimé dans les cellules natives).

Des effets cohérents (inverses entre surexpression et invalidation) sont observés sur le gène *Dlx3*, qui fait partie du même cluster que *Dlx4*. En effet, la surexpression de *Dlx4* stimule l'expression de *Dlx3*, alors que l'inhibition de *Dlx4* la diminue. Cela indique que *Dlx4* régule son propre cluster bigénique.

L'existence de telles régulations croisées des DLX, induit une multitude de possibilités de modulations d'expression de gènes cibles si l'on prend en compte les cibles propres de chaque DLX (DLX4 en particulier) et celles des autres DLX (**Tableau 25** ; [501], article en **Annexe 4**). Enfin il ne faut pas oublier que les DLX ont non seulement des redondances fonctionnelles mais sont aussi capables de s'inhiber les uns les autres et que par conséquent la composition en DLX est un élément à prendre en compte.

	Gènes cibles
DLX1	<i>Activin A, Bmp-4, Fgf10, Ptch1, Shh, Smad4, Tgf-β1</i>
DLX2	<i>Activin A, Amel, Coll 1 α1, Coll 2 α1, Fgf10, Ie12b, Ie56, Ocn, Ptch1, Shh, Sost, Vdr, Wnt5a</i>
DLX3	<i>Bmps, Bsp, Coll 1 α1, Ocn, Opn, Runx2, Sost, Tnap</i>
DLX4	<i>Bmps, c-myc, Gata1, Sost</i>
DLX5	<i>Activin A, Bmps, Bsp, Coll 1 α1, Ie56, Ocn, Opn, Runx2, Sost, Tnap, Vdr, Wnt5a</i>
DLX6	<i>Bmps, Sost</i>

**Tableau 24 | Liste non exhaustive des cibles transcriptionnelles connues pour les différents gènes *Dlx***

D'après Navet et *al.*, 2014 [461].

Au cours de notre étude, nous avons également étudié les effets de *Dlx4* sur certaines cibles connues pour être fortement impliquées dans le développement des cancers. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que le gène *Bcl-2* était régulé positivement par *BP2* et fortement diminué par l'inhibition de *Dlx4* par une approche d'ARN interférence. Ces résultats sont pour partie en accord avec les observations de Stevenson et *coll.* qui ont constaté

que *Bcl-2* était une cible directe de la forme longue de *Dlx4* chez l'homme [453]. Toutefois, dans notre étude, l'absence d'effet avec la surexpression de la forme longue (murine) pose de nombreuses questions notamment sur la conservation des rôles associés aux divers transcrits entre les deux espèces. Concernant l'effet des modulations de *Dlx4* sur *p53*, un effet négatif est uniquement observé lors de l'inhibition de *Dlx4*. Aucun effet n'est observé lors de la surexpression de *Dlx4*, suggérant que le niveau transcriptionnel de *p53* puisse être déjà à un niveau maximal. Ainsi, l'inhibition de *Dlx4* aurait un effet pro-tumoral via *p53* en opposition avec l'effet pro-apoptotique de *Bcl-2* dans le même temps. Les effets de ces deux gènes pourraient alors s'annuler expliquant l'absence d'effet sur la prolifération tumorale observée lors de l'inhibition de *Dlx4*. Néanmoins, l'établissement d'une balance entre ces deux cibles pourrait expliquer l'échappement observé au cours des expériences réalisées.

	Surexpression		Inhibition	
	Dlx4 (A3ND1/A3ND4)	BP2	sh207	sh1128
Bcl2		x 2	x -33	x -8,5
p21	x -3 / x-6	x -2,3		x -3
p53			x -2	x -2,6
c-myc	x -3,5 / -3,5	x -10	x -5,8	x -9

**Tableau 25 | Résumé des effets de *Dlx4* observés sur certains facteurs impliqués dans la tumorigénèse**

Les effets négatifs de *Dlx4* sur l'expression des autres gènes sont représentés en rouge, alors que les effets positifs sont représentés en vert. Le gris indique une absence de modification significative.

Par ailleurs, de façon surprenante, les modulations de l'expression de *Dlx4* à la hausse comme à la baisse induisent des effets similaires (diminution) sur les gènes *c-myc* et *p21* contrairement à ce qui aurait pu être attendu (augmentation d'un côté, diminution de l'autre). Ces résultats pourraient s'expliquer par la nécessité de maintenir un point d'équilibre dans la cellule tumorale ou par les différences respectives entre les deux sous-clones (A3N et PG1).

Pour en venir aux explications plausibles, permettant de comprendre les divergences de résultats observées entre les expériences de surexpression et d'inhibition de *Dlx4*, l'existence de nombreux partenaires pour les homéoprotéines DLX, qui ont pour certaines des fonctions

oncogéniques reconnues, pourraient permettre de mieux comprendre les résultats obtenus (Tableau 26).

	Protéines partenaires
DLX1	ALX4, BARX1, CDX1, CDX4, FOXA1, HOXB13, MIXL1, SAAD4, SP7, TBX21
DLX2	ALX4, DIP2A, FOXJ1, HOXC8, MSX1, MSX2, NCOA2, PI3KR1, SP7, SUMO3, UBC, XRCC6
DLX3	RUNX2
DLX4	DLXIN, LSM3, SP7, ZFP263
DLX5	ALX4, CDX2, DLXIN, HNF4G, HOXB13, HOXC8, JDP2, MSX1, MSX2, NCOA2, NFE2, RUNX2, SOX8, SOX10, SPEN, SP7, SRY, UBC
DLX6	HSP900AA1

**Tableau 26 | Partenaires protéiques des *DLX***  
D'après Navet et *al.*, 2014 [461].

Par exemple, il est clairement établi que DLX4 interagit avec la protéine MAGE-D1 (Dlxin) [454]. Or, cette protéine semble être largement impliquée dans les processus de prolifération et de migration inhérents au développement des cancers, où elle joue un rôle de suppresseur de tumeur [457,502–507]. Ainsi, en fonction des quantités de DLX4 présentes dans la cellule tumorale, la réponse de la cellule à la protéine partenaire (facteur de transcription principalement) pourrait être différente.

En perspective de ces travaux, il sera nécessaire d'approfondir l'étude des mécanismes de régulation du gène *Dlx4*. Pour ce faire, des expériences de mutagenèse dirigées à l'aide du système Crispr/Cas9 visant à invalider l'ATG de l'une ou l'autre des isoformes pourraient permettre de mieux appréhender le rôle de chaque isoforme. De même, des cotransfections des différentes isoformes avec les différents gènes *Dlx* ou des shARN inhibant l'une ou l'autre des isoformes pourraient également permettre de mieux comprendre le rôle des isoformes de *Dlx4* et d'identifier leurs partenaires.

Par ailleurs, les relations entre *Dlx4* et le métabolisme énergétique devront être étudiées pour répondre aux observations réalisées lors de la transduction des shARN dans les cellules PG1. En effet, une analyse préliminaire du métabolisme énergétique a permis de mettre en évidence une différence importante dans les capacités glycolytiques des cellules A3N et PG1 qui pourrait, en plus des variations d'expression de *Dlx4*, expliquer les différences de prolifération observées entre ces cellules. De plus aucune différence n'étant décelable entre les cellules

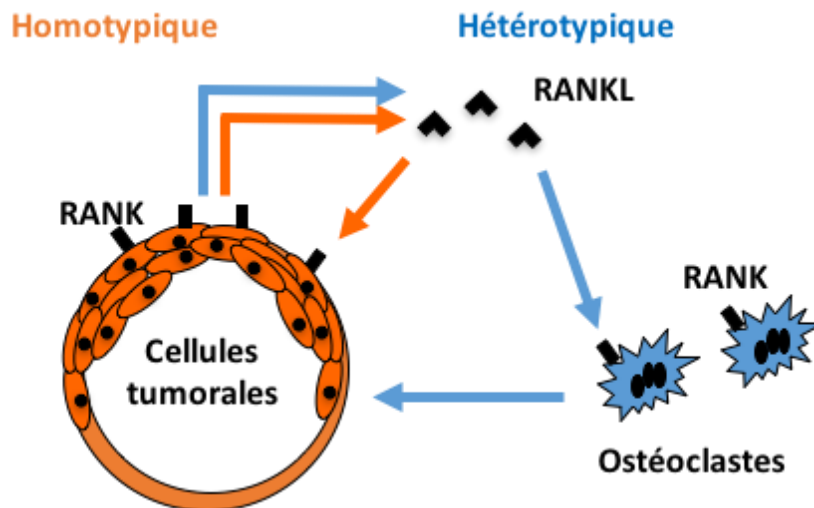
PG1 et PG1-sh207, il est raisonnable de penser qu'il n'existe pas de lien direct entre l'activité glycolytique et le niveau d'expression de *Dlx4*. Par contre, nous avons pu observer de façon inattendue une relation entre la phosphorylation oxydative et l'expression de *Dlx4*. En effet, l'inhibition de *Dlx4* par le sh207 induit une baisse considérable des réserves en cofacteurs enzymatiques (NADH ou FADH). Bien que préliminaires, ces données posent la question d'une régulation par l'homéoprotéine DLX4 de la synthèse et/ou de la fonction d'un facteur clef du contrôle de la gestion des ressources mitochondriales. Cette question est d'autant plus pertinente qu'une étude [508] a déjà mis en évidence la présence de la protéine DLX4, en plus de sa localisation classique dans le noyau, au niveau cytoplasmique. Une telle localisation cellulaire n'a jamais été observée pour les autres membres de la famille DLX. Concernant le facteur cible de DLX4, plusieurs possibilités existent. En effet, il pourrait s'agir d'une enzyme nécessaire à la biosynthèse, d'une protéine impliquée dans le transport mitochondrial (navette malate - aspartate ou glycérol phosphate), ou encore d'une protéine impliquée dans la régénération de ces cofacteurs comme les sous-unités des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Pour la suite de l'étude, plusieurs expériences pourront être envisagées comme le dosage des complexes respiratoires, la mesure de l'activité de certaines réactions du cycle de Krebs (succinate déshydrogénase), l'utilisation d'inhibiteurs des transporteurs mitochondriaux (par exemple l'Etomoxir pour évaluer la part de consommation d'oxygène due à la Béta oxydation des acides gras). Aussi, la recherche d'un nouveau clone cellulaire présentant un même niveau d'expression de *Dlx4* que la lignée A3N mais une capacité glycolytique plus importante sera entreprise pour nos futures recherches. Ces données sont importantes à prendre en compte, car d'autres études ont déjà mis en évidence des rôles des gènes *Dlx*, en particulier *Dlx2*, dans le métabolisme énergétique (switch glycolytique en particulier) [509].

Finalement de nombreuses études sont encore nécessaires afin d'établir le ou les rôle(s) de *Dlx4* dans la physiopathologie de l'ostéosarcome. Nos travaux n'ont volontairement pas abordé les rôles potentiels de DLX4 dans les capacités métastatiques de la cellule tumorale d'une part et dans la résistance potentielle aux agents de chimiothérapie d'autre part. Ces sujets très intéressants et de haute importance clinique s'incrinvent dans la poursuite de ce travail et seront menés avec l'ensemble des outils générés au cours de ce doctorat.

## II- Implication de RANK dans la dissémination métastatique en environnement immunodéficient

La deuxième partie des travaux réalisés pendant cette thèse s'est intéressée aux conséquences de l'expression de RANK dans les cellules ostéosarcomateuses sur les processus cellulaires fondamentaux (prolifération, différenciation, apoptose et migration), donc sur l'agressivité tumorale.

Le fait que RANK soit exprimé au sein de la tumeur dans les cellules ostéosarcomateuses en plus de son expression dans les cellules du lignage monocyte/macrophage, en particulier les ostéoclastes, a longtemps fait débat. Aujourd'hui la majorité des travaux publiés portant sur ce sujet abonde dans le sens d'une expression de RANK dans un nombre significatif de cellules ostéosarcomateuses visualisées au niveau de biopsies de patients [219,220,247,510–512] comme dans les lignées d'ostéosarcomes établies [213,236,248,512–517]. La cellule ostéosarcomateuse étant une source importante de RANKL [214,247,510,511,516,518–525], mais aussi d'OPG [138,247,511,513,516,523,526–528], deux modes de fonctionnement de la signalisation RANKL/RANK dans l'ostéosarcome ont été proposés [235,529], un mode homotypique (autocrine à la cellule tumorale) et un mode hétérotypique faisant intervenir les cellules du micro-environnement tumoral, en particulier les ostéoclastes (**Figure 92**).



**Figure 92 | Représentation schématique des deux modes de fonctionnement de la signalisation RANKL/RANK dans l'ostéosarcome**

Le mode homotypique pour lequel la cible de RANKL est la cellule ostéosarcomateuse exprimant RANK, quelle que soit l'origine de RANKL (cellule ostéosarcomateuse ou de l'environnement), et le mode hétérotypique pour lequel la cible de RANKL est une cellule de l'environnement exprimant RANK, en premier lieu l'ostéoclaste, qui en réponse à RANKL stimule la croissance de la tumeur.

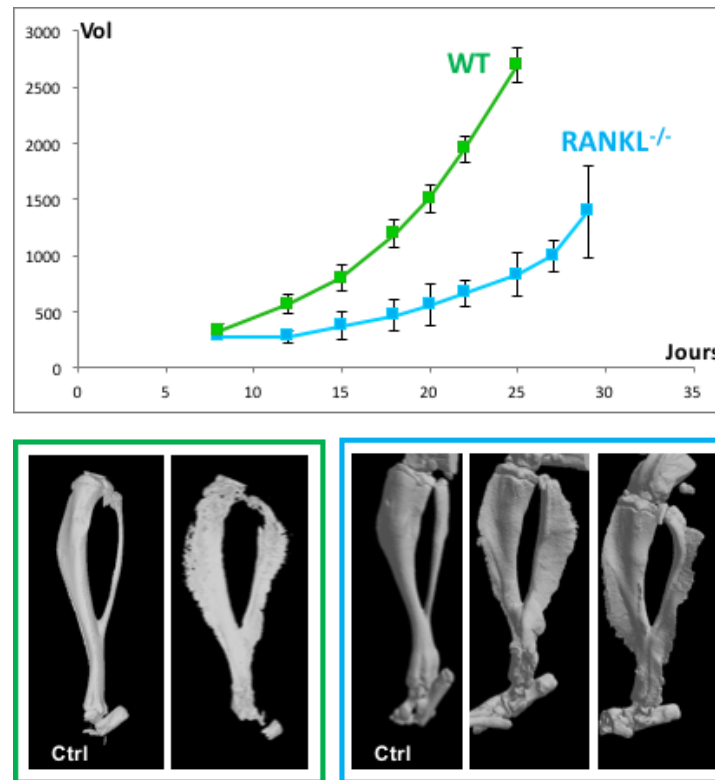
Concernant la voie hétérotypique, de nombreuses études ont établi que la cellule tumorale de par son expression de RANKL, sans oublier de prendre en compte l'expression de son récepteur lurre l'OPG, amorçait le cercle vicieux établi entre cellules tumorales et ostéoclastes présenté dans la partie introduction de ce mémoire. Rompre ce cercle vicieux dans un but thérapeutique a été le sujet de nombreux travaux avec des résultats prometteurs. Les injections d'une protéine RANK recombinante (RANK-FC ; [251,529,530]), d'OPG recombinant (OPG et OPG-FC ; [225,250,511]), d'inhibiteurs synthétiques de RANK [117] ou d'ARN interférent anti-RANKL [531] ont été réalisées sur différents modèles précliniques d'ostéosarcomes. Dans tous les cas, une forte inhibition de l'ostéolyse péri tumorale a été observée avec des conséquences variables sur la croissance tumorale. Le blocage de la résorption osseuse dans le contexte de tumeurs ostéolytiques s'est alors confirmé comme un élément positif, néoadjuvant, dans la prise en charge des patients.

Les bisphosphonates, inhibiteurs puissants de la résorption osseuse connus depuis de nombreuses années comparativement aux inhibiteurs de la signalisation RANKL/RANK, ont en premier été utilisés en clinique comme néoadjuvants dans la prise en charge des ostéosarcomes (protocole OS 2006 par exemple). Au-delà de leur effet sur l'ostéoclaste, ils exercent aussi un effet direct sur la cellule tumorale [532,533] avec par exemple un impact sur l'expression de RANKL [534,535] et d'OPG [533]. Leur étude se poursuit actuellement, bien que les premiers résultats soient malheureusement en deçà des espérances. Concernant les inhibiteurs de la voie RANKL/RANK, les données se limitent à un unique patient traité pour un ostéosarcome avec l'anticorps bloquant RANKL nommé Denosumab® [268]. Une rémission totale a été rapportée chez ce patient [268] cependant il est trop tôt pour conclure en absence d'étude clinique sur un nombre de patients conséquent.

Pour en revenir au(x) rôle(s) associé(s) à l'expression des éléments de la signalisation RANKL/RANK dans la cellule tumorale, les travaux de Chen et *coll.* [529] avec un modèle d'ostéosarcome obtenu génétiquement chez la souris (GEMM : « Genetically Engineered Mouse Model ») par délétions ciblées dans l'ostéoblaste de P53 et de Rb ont montré que l'invalidation totale de RANKL chez ces animaux induisait certes une ostéopétrose mais surtout bloquait le développement tumoral, signant l'importance d'un RANKL actif pour l'initiation tumorale. Nos travaux ont montré que le blocage de RANKL avec un anticorps neutralisant utilisé après l'initiation tumorale n'inhibait pas totalement la croissance tumorale mais protégeait l'os de toute résorption. Des travaux non publiés d'injection de nos cellules PG1 standards (exprimant RANKL) chez la souris RANKL KO (**Figure 93**) montrent que le



développement tumoral est retardé mais n'est pas bloqué. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée MOTO1.1 [529]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de RANKL dans la cellule tumorale est un élément clef de l'initiation tumorale indépendamment de la présence d'ostéoclastes dans l'environnement.



**Figure 93 | Analyse comparative de l'injection des cellules PG1 chez les souris sauvages et RANKL KO (n=4)**

La croissance tumorale démarre plus tardivement mais est effective chez les souris invalidées pour RANKL. Au niveau osseux aucun signe de résorption n'est visible mais la formation d'un tissu ostéoïde tumoral est évidente.

La publication d'un cas d'ostéosarcome chez un patient atteint d'une ostéolyse familiale extensive (FEO ; [536]) et les observations rapportées par les cliniciens de la survenue d'ostéosarcomes dans des sites osseux ayant un historique traumatologique et/ou inflammatoire abondent dans le sens d'une implication de la triade dans l'initiation tumorale par un mécanisme qui reste à découvrir. En effet, ces deux conditions sont associées à une perturbation locale du remodelage osseux donc en lien avec l'expression des éléments de la triade RANK/RANKL/OPG.

Nos résultats avec la souris RANK-Tg, souris qui peut être assimilée à une souris présentant une FEO [537], montrent que la croissance tumorale n'est pas augmentée chez cette souris, indépendamment du statut RANK tumoral, supportant l'idée que l'environnement très ostéolytique ait un impact sur l'initiation tumorale et non sur la croissance tumorale. Néanmoins nos résultats montrent un impact sur le nombre de métastases qui apparaît globalement réduit chez la souris RANK-Tg. Des études plus poussées seront nécessaires pour décrypter les liens éventuels entre hyperactivité ostéolytique et initiation tumorale d'une part, et le potentiel métastatique de la cellule tumorale d'autre part.

Concernant les rôles de RANK dans la cellule tumorale, voie homotypique, nos travaux ont mis en évidence que cette expression avait pour seule conséquence significative d'augmenter le potentiel métastatique de la cellule tumorale en stimulant l'expression par la cellule tumorale de facteurs pro-migratoires comme les métalloprotéases MMP9 et MMP13. Ces résultats sont en accord avec la grande majorité des travaux publiés qui n'observe aucun impact de l'expression de RANK dans la cellule tumorale sur les processus de prolifération, différenciation et apoptose [235,248,251,512,517,529,530]. Nous avons de plus observé qu'une baisse de l'immunité était nécessaire pour que ce potentiel métastatique soit converti en fait. Chez la souris Nude, utilisée dans nos travaux, l'absence de lymphocytes T actifs liée à la perte du gène FoxN1 conduit à une augmentation du nombre de métastases avec les cellules surexprimant RANK. Cette augmentation est, de manière intéressante, réversible par blocage de RANKL dans l'ensemble de l'organisme avec un anticorps inhibiteur. Notre première interprétation de ces résultats était que le fait que la cellule tumorale exprime RANK induisait deux processus en relation avec la survenue de métastases qui s'opposent chez la souris sauvage. Tout d'abord l'expression de RANK favoriserait le départ de la cellule de la tumeur primaire suite à la stimulation par RANKL comme explicité ci-dessus. A l'opposé l'expression de RANK favoriserait la reconnaissance de la cellule tumorale en migration par le système immunitaire, plus particulièrement par les lymphocytes T connus pour exprimer fortement RANKL [520]. Chez la souris Nude, l'absence de lymphocytes T avait donc pour conséquences une augmentation du nombre de métastases, et le blocage de RANKL diminuant le nombre de cellules quittant le site primaire ramenait le nombre de métastases à un niveau proche de la souris sauvage. L'expérience d'inactivation de RANKL uniquement dans les lymphocytes T, donc chez une souris non-immunodéprimée, avait pour objectif de confirmer notre interprétation en observant une augmentation du nombre de métastases. Cependant cette inactivation ciblée n'affecte en rien le nombre de métastases obtenu avec les cellules sur-exprimant RANK démontrant que notre interprétation était en partie erronée. En effet, il est clair que les lym-

phocytes T ne sont pas les cellules bloquant les cellules tumorales en migration via la liaison RANKL/RANK. Nous n'avons pas d'explication quant au rôle de l'absence de lymphocytes T sur l'augmentation du nombre de métastases et pensons que cela pourrait plutôt être secondaire à la perturbation de l'ensemble du système immunitaire chez les souris Nude en particulier des cellules du lignage monocyte/macrophage. Concernant la mise en migration des cellules tumorales par fixation de RANKL sur RANK, nous ignorons quelle peut être la cellule source de RANKL même s'il est clair que cela n'est pas le lymphocyte T. Plusieurs cellules peuvent en être la source comme la cellule tumorale elle-même, l'ostéoblaste quiescent, les lymphocytes B [538–553] même s'ils sont peu présents au sein de la tumeur (données du laboratoire), ou les cellules endothéliales [109,176,554–558] qui sont en grande nombre dans la tumeur. Des travaux plus poussés d'inactivations spécifiques de RANKL dans les divers lignages cellulaires seront nécessaires pour établir sans ambiguïté la source de RANKL.

Une nouvelle hypothèse est venue s'ajouter aux précédentes qui est que l'expression de RANK par la cellule tumorale en migration pourrait faciliter son adressage au site métastatique, le poumon dans le cas présent connu pour son expression de RANKL [108]. Plusieurs autres couples cytokines-récepteurs ont déjà été impliqués dans l'adressage de cellules tumorales osseuses migrantes dont CXCL12/SDF1 $\alpha$  pour le récepteur CXCR4/CXCR7 [559–574], CCL21/6Ckine pour le récepteur CCR7 [575,576], et Fas-L pour le récepteur Fas [577–582]. Le couple RANKL/RANK pourrait donc s'ajouter à cette liste. Par ailleurs l'expression conjointe de RANK et de ces récepteurs, précédemment évoqués, pourrait favoriser la métastase comme suggéré par les travaux de Xie et *coll.* [583] montrant que l'activation de CXCR4 contrôle l'expression de RANKL par la cellule tumorale. Des études complémentaires seront nécessaires pour caractériser la potentielle fonction du couple RANKL/RANK dans le « seeding » de la cellule tumorale en migration.

L'existence d'un troisième récepteur de RANKL nommé LGR4 a récemment été démontrée [61] avec des effets cellulaires induits différents, voir antagonistes, de ceux observés via RANK au moins dans la cellule ostéoclastique. La présence ou l'absence de ce récepteur au niveau de la cellule tumorale dépendamment de l'expression de RANK devra être analysée et les conséquences de la co-expression des deux récepteurs ou de l'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs sur l'ensemble des processus cellulaires devront être établies. Nous avons déjà mis en évidence l'expression de LGR4 dans la cellule ostéosarcomateuse et la modulation de cette expression est l'objet de futurs travaux dans les cellules exprimant ou non RANK. Un

intérêt particulier sera porté au rôle de LGR4 potentiellement antagoniste de RANK en réponse à RANKL dans le processus métastatique.

Pour finir, dans la première partie de nos travaux nous avons montré que les homéoprotéines de la famille DLX pouvaient contrôler l'expression des éléments de la triade RANK/RANKL/OPG (+LGR4) ce qui peut avoir des conséquences sur son fonctionnement donc sur la ou les capacités métastatiques de ces cellules ostéosarcomateuses. Les travaux de Morini *et coll.* [430] ont démontré que la composition en DLX présente dans la cellule tumorale (cancer du sein) avait un impact sur son potentiel métastatique. Par analogie nous pouvons émettre l'hypothèse que la composition en DLX dans la cellule ostéosarcomateuse puisse avoir un impact sur le potentiel métastatique de celle-ci en jouant, entre autre, sur la signalisation RANKL/RANK/OPG/LGR4.

La validation de cette hypothèse est l'objectif de nos futurs travaux dans la continuité de ces travaux de thèse.

## **Conclusion générale et perspectives**

La recherche de nouveaux traitements pour améliorer la survie des patients atteints d'ostéosarcome passe par une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette pathologie. Les travaux présentés dans cette thèse se sont intéressés à élucider le rôle, au sein de la cellule tumorale, des homéogènes *Dlx* et de la signalisation RANK/RANKL/OPG à la fois dans la cellule tumorale mais également dans son environnement où cette signalisation est perturbée.

Les résultats obtenus concernant le gène *Dlx4* n'ont pas permis d'établir clairement un lien entre l'expression de *Dlx4* et la vitesse de prolifération tumorale. Cependant plusieurs axes sont encore à explorer concernant le rôle de *Dlx4* dans l'agressivité tumorale notamment vis-à-vis de la dissémination métastatique et de l'ostéolyse tumorale. Par ailleurs, l'éventuel impact de l'expression de *Dlx4* (et des autres *Dlx*) sur la résistance aux traitements de chimiothérapies devra être exploré.

Concernant la signalisation RANK/RANKL, en particulier le rôle de l'expression de RANK dans la cellule tumorale, le principal résultat obtenu est la mise en évidence d'un potentiel migratoire de la cellule tumorale exprimant RANK dans un contexte immunodéficient. Une analyse plus poussée du rôle de la signalisation RANK/RANKL dans le processus métastatique sera menée en explorant les interactions possibles de cette signalisation et celles déjà connues pour leur participation dans ce processus.

Ces travaux ont validé l'importance de ces deux signalisations dans l'ostéosarcome. Une interaction entre ces deux voies est possible et sera étudiée plus en détails lors de la poursuite des travaux amorcés dans cette thèse.

## Références bibliographiques

- [1] H. Li, I. Marijanovic, M.S. Kronenberg, I. Erceg, M.L. Stover, D. Velonis, M. Mina, J.G. Heinrich, S.E. Harris, W.B. Upholt, I. Kalajzic, A.C. Lichtler, Expression and function of *Dlx* genes in the osteoblast lineage, *Dev. Biol.* 316 (2008) 458–470. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.001.
- [2] V. Toppets, V. Pastoret, V. De Behr, N. Antoine, C. Dessy, A. Gabriel, Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux, *Ann Med Vet.* 148 (2004) 1–13.
- [3] J.A. Helms, R.A. Schneider, Cranial skeletal biology, *Nature.* 423 (2003) 326–331. doi:10.1038/nature01656.
- [4] D. Heymann, S. Lepreux, Le tissu osseux, in: *Histol. Bases Fondam.*, Sophia-Antipolis : Omnis-science , DL, 2008.
- [5] A. Neve, A. Corrado, F.P. Cantatore, Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 1149–1153. doi:10.1002/jcp.24278.
- [6] J. Glowacki, C. Rey, M.J. Glimcher, K.A. Cox, J. Lian, A role for osteocalcin in osteoclast differentiation, *J. Cell. Biochem.* 45 (1991) 292–302. doi:10.1002/jcb.240450312.
- [7] R. Swaminathan, Biochemical markers of bone turnover, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 313 (2001) 95–105.
- [8] M. Boudiffa, N.M. Wade-Gueye, A. Guignandon, A. Vanden-Bossche, O. Sabido, J.E. Aubin, P. Jurdic, L. Vico, M.H. Lafage-Proust, L. Malaval, Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 2669–2679. doi:10.1002/jbmr.245.
- [9] L. Malaval, N.M. Wade-Gu e, M. Boudiffa, J. Fei, R. Zirngibl, F. Chen, N. Laroche, J.-P. Roux, B. Burt-Pichat, F. Duboeuf, G. Boivin, P. Jurdic, M.-H. Lafage-Proust, J. Am ed e, L. Vico, J. Rossant, J.E. Aubin, Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1145–1153. doi:10.1084/jem.20071294.
- [10] E. Ruoslahti, Integrins., *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1–5.
- [11] P.V. Hauschka, A.E. Mavrakos, M.D. Iafrati, S.E. Doleman, M. Klagsbrun, Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 12665–12674.
- [12] N.J. Horwood, N. Udagawa, J. Elliott, D. Grail, H. Okamura, M. Kurimoto, A.R. Dunn, T. Martin, M.T. Gillespie, Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor., *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 595–603.
- [13] P.J. Marie, Transcription factors controlling osteoblastogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 98–105. doi:10.1016/j.abb.2008.02.030.
- [14] P. Marie, Diff erenciati on, fonction et contr ole de l’ost eoblaste, *M edecine/Sciences.* 17 (2001) 1252–1259. doi:10.1051/medsci/200117121252.
- [15] M. Owen, A.J. Friedenstein, Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors, *Ciba Found. Symp.* 136 (1988) 42–60.
- [16] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science.* 284 (1999) 143–147.
- [17] J.F.L. Chau, W.F. Leong, B. Li, Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function, *Histol. Histopathol.* 24 (2009) 1593–1606.
- [18] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, T. Kishimoto, Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, *Cell.* 89 (1997) 755–764.
- [19] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrugge, The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation, *Cell.* 108 (2002) 17–29. doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
- [20] A.B. Celil, J.O. Hollinger, P.G. Campbell, *Osx* transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling, *J. Cell. Biochem.* 95 (2005) 518–528. doi:10.1002/jcb.20429.
- [21] D. Acampora, G.R. Merlo, L. Paleari, B. Zerega, M.P. Postiglione, S. Mantero, E. Bober, O. Barbieri, A. Simeone, G. Levi, Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*, *Dev. Camb. Engl.* 126 (1999) 3795–3809.



- [22] E.P. Newberry, T. Latifi, D.A. Towler, Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins *Msx2* and *Dlx5*, *Biochemistry (Mosc.)*. 37 (1998) 16360–16368. doi:10.1021/bi981878u.
- [23] Y.H. Liu, Z. Tang, R.K. Kundu, L. Wu, W. Luo, D. Zhu, F. Sangiorgi, M.L. Snead, R.E. Maxson, *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for *MSX2*-mediated craniosynostosis in humans, *Dev. Biol.* 205 (1999) 260–274. doi:10.1006/dbio.1998.9114.
- [24] R. Eferl, E.F. Wagner, AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 859–868. doi:10.1038/nrc1209.
- [25] E.F. Wagner, Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development, *Ann. Rheum. Dis.* 61 Suppl 2 (2002) ii40-42.
- [26] A.E. Grigoriadis, K. Schellander, Z.Q. Wang, E.F. Wagner, Osteoblasts are target cells for transformation in *c-fos* transgenic mice, *J. Cell Biol.* 122 (1993) 685–701.
- [27] Z.Q. Wang, C. Ovitt, A.E. Grigoriadis, U. Möhle-Steinlein, U. Rütther, E.F. Wagner, Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*, *Nature*. 360 (1992) 741–745. doi:10.1038/360741a0.
- [28] T.A. Franz-Odenaal, B.K. Hall, P.E. Witten, Buried alive: how osteoblasts become osteocytes, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235 (2006) 176–190. doi:10.1002/dvdy.20603.
- [29] G.A. Candeliere, F. Liu, J.E. Aubin, Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires, *Bone*. 28 (2001) 351–361.
- [30] H. Orimo, The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease, *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi*. 77 (2010) 4–12.
- [31] C. Wennberg, L. Hessle, P. Lundberg, S. Mauro, S. Narisawa, U.H. Lerner, J.L. Millán, Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 1879–1888. doi:10.1359/jbmr.2000.15.10.1879.
- [32] J. Zhang, Q. Tu, J. Chen, Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein, *J. Cell. Physiol.* 220 (2009) 30–34. doi:10.1002/jcp.21768.
- [33] L. Malaval, J.E. Aubin, L. Vico, Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling, *Osteoporos. Int.* 20 (2009) 1077–1080. doi:10.1007/s00198-009-0869-2.
- [34] S. Fukumoto, T.J. Martin, Bone as an endocrine organ, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 20 (2009) 230–236. doi:10.1016/j.tem.2009.02.001.
- [35] S.C. Manolagas, Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 115–137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395.
- [36] G.A. Rodan, Introduction to bone biology, *Bone*. 13 Suppl 1 (1992) S3-6.
- [37] J.W. Chow, A.J. Wilson, T.J. Chambers, S.W. Fox, Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 1760–1767. doi:10.1359/jbmr.1998.13.11.1760.
- [38] T.J. Chambers, K. Fuller, Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact, *J. Cell Sci.* 76 (1985) 155–165.
- [39] M.L. Knothe Tate, J.R. Adamson, A.E. Tami, T.W. Bauer, The osteocyte, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1–8.
- [40] E.M. Aarden, E.H. Burger, P.J. Nijweide, Function of osteocytes in bone, *J. Cell. Biochem.* 55 (1994) 287–299. doi:10.1002/jcb.240550304.
- [41] L.F. Bonewald, M.L. Johnson, Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling, *Bone*. 42 (2008) 606–615. doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.
- [42] D.G. Winkler, M.K. Sutherland, J.C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J.E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B.R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M.E. Brunkow, J.A. Latham, Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist, *EMBO J.* 22 (2003) 6267–6276. doi:10.1093/emboj/cdg599.
- [43] K. Matsuo, Cross-talk among bone cells, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18 (2009) 292–297. doi:10.1097/MNH.0b013e32832b75f1.

- [44] G. Gu, M. Mulari, Z. Peng, T.A. Hentunen, H.K. Väänänen, Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335 (2005) 1095–1101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.211.
- [45] M.P. Yavropoulou, J.G. Yovos, Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 8 (2008) 204–216.
- [46] G. Hattersley, T.J. Chambers, Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro, *J. Cell. Physiol.* 140 (1989) 478–482. doi:10.1002/jcp.1041400311.
- [47] D.L. Lacey, E. Timms, H.-L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.-X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W.J. Boyle, Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation, *Cell.* 93 (1998) 165–176. doi:10.1016/S0092-8674(00)81569-X.
- [48] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie, T.J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 345–357. doi:10.1210/edrv.20.3.0367.
- [49] A.-V. Rousselle, D. Heymann, Osteoclastic acidification pathways during bone resorption, *Bone.* 30 (2002) 533–540.
- [50] Y. Wittrant, S. Theoleyre, S. Couillaud, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, Regulation of osteoclast protease expression by RANKL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 774–778.
- [51] C.H. Turner, F.M. Pavalko, Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation, *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* 3 (1998) 346–355.
- [52] R. Pacifici, Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade, *Endocrinology.* 139 (1998) 2659–2661. doi:10.1210/endo.139.6.6087.
- [53] P.A. Hill, Bone remodelling, *Br. J. Orthod.* 25 (1998) 101–107. doi:10.1093/ortho/25.2.101.
- [54] F. Elefteriou, Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 231–236. doi:10.1016/j.abb.2008.03.016.
- [55] P.J. Marie, The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis, *Bone.* 46 (2010) 571–576. doi:10.1016/j.bone.2009.07.082.
- [56] X. Wu, M.A. McKenna, X. Feng, T.R. Nagy, J.M. McDonald, Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro, *Endocrinology.* 144 (2003) 5545–5555. doi:10.1210/en.2003-0296.
- [57] N.A. Sims, J.H. Gooi, Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption, *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (2008) 444–451. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.016.
- [58] L. Pederson, M. Ruan, J.J. Westendorf, S. Khosla, M.J. Oursler, Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 20764–20769. doi:10.1073/pnas.0805133106.
- [59] D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis, Bone remodeling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092 (2006) 385–396. doi:10.1196/annals.1365.035.
- [60] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Lüthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, W.J. Boyle, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell.* 89 (1997) 309–319.
- [61] J. Luo, Z. Yang, Y. Ma, Z. Yue, H. Lin, G. Qu, J. Huang, W. Dai, C. Li, C. Zheng, L. Xu, H. Chen, J. Wang, D. Li, S. Siwko, J.M. Penninger, G. Ning, J. Xiao, M. Liu, LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption, *Nat. Med.* 22 (2016) 539–546. doi:10.1038/nm.4076.
- [62] C. Fletcher, J. Bridge, P. Hogendoorn, F. Mertens, WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fourth Edition - WHO - OMS - Volume 5, (2013). <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4005> (accessed July 20, 2016).
- [63] E. Desandes, J. Clavel, C. Berger, J.-L. Bernard, P. Blouin, L. de Lumley, F. Demeocq, F. Freycon, P. Gembara, A. Goubin, E. Le Gall, P. Pillon, D. Sommelet, I. Tron, B. Lacour, Cancer incidence

- among children in France, 1990-1999, *Pediatr. Blood Cancer.* 43 (2004) 749–757. doi:10.1002/pbc.20148.
- [64] B. Lacour, A. Guyot-Goubin, S. Guissou, S. Bellec, E. Désandes, J. Clavel, Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004, *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP.* 19 (2010) 173–181.
- [65] E.I. Hauben, P.C.W. Hogendoorn, Epidemiology of primary bone tumors and economical aspects of bone metastases, in: *Bone Cancer*, Elsevier, 2015: pp. 5–10. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124167216000017> (accessed July 20, 2016).
- [66] P. Picci, Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma), *Orphanet J. Rare Dis.* 2 (2007) 6. doi:10.1186/1750-1172-2-6.
- [67] A.B. Mohseny, P.C.W. Hogendoorn, Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 29 (2011) 397–403. doi:10.1002/stem.596.
- [68] E.R. Wagner, G. Luther, G. Zhu, Q. Luo, Q. Shi, S.H. Kim, J.-L. Gao, E. Huang, Y. Gao, K. Yang, L. Wang, C. Teven, X. Luo, X. Liu, M. Li, N. Hu, Y. Su, Y. Bi, B.-C. He, N. Tang, J. Luo, L. Chen, G. Zuo, R. Rames, R.C. Haydon, H.H. Luu, T.-C. He, E.R. Wagner, G. Luther, G. Zhu, Q. Luo, Q. Shi, S.H. Kim, J.-L. Gao, E. Huang, Y. Gao, K. Yang, L. Wang, C. Teven, X. Luo, X. Liu, M. Li, N. Hu, Y. Su, Y. Bi, B.-C. He, N. Tang, J. Luo, L. Chen, G. Zuo, R. Rames, R.C. Haydon, H.H. Luu, T.-C. He, Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma, *Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma, Sarcoma Sarcoma.* 2011, 2011 (2011) e325238. doi:10.1155/2011/325238, 10.1155/2011/325238.
- [69] G. Yarmish, M.J. Klein, J. Landa, R.A. Lefkowitz, S. Hwang, Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes, *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc.* 30 (2010) 1653–1672. doi:10.1148/rg.306105524.
- [70] J.M. Guinebretiere, A. Le Cesne, C. Le Pechoux, G. Missenard, S. Bonvalot, P.E.V.D. TERRIER, D. Vanel, Ostéosarcome de forme commune, *Encycl Méd Chir Appar. Locomoteur.* (2001) 1–13.
- [71] G. Ottaviani, N. Jaffe, The epidemiology of osteosarcoma, *Cancer Treat. Res.* 152 (2009) 3–13. doi:10.1007/978-1-4419-0284-9\_1.
- [72] D. Heymann, Preface, in: *Bone Cancer*, Academic Press, San Diego, 2010: p. ix. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123748959000414> (accessed July 21, 2016).
- [73] L. Chauveinc, V. Mosseri, E. Quintana, L. Desjardins, P. Schlienger, F. Doz, B. Dutrillaux, Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period, *Ophthalmic Genet.* 22 (2001) 77–88.
- [74] K. Hashimoto, M. Hatori, M. Hosaka, M. Watanabe, T. Hasegawa, S. Kokubun, Osteosarcoma arising from giant cell tumor of bone ten years after primary surgery: a case report and review of the literature, *Tohoku J. Exp. Med.* 208 (2006) 157–162.
- [75] E.W. Brien, J.M. Mirra, S. Kessler, M. Suen, J.K. Ho, W.T. Yang, Benign giant cell tumor of bone with osteosarcomatous transformation (“dedifferentiated” primary malignant GCT): report of two cases, *Skeletal Radiol.* 26 (1997) 246–255.
- [76] P. Ruggieri, F.H. Sim, J.R. Bond, K.K. Unni, Malignancies in fibrous dysplasia, *Cancer.* 73 (1994) 1411–1424.
- [77] J.M. Varley, D.G. Evans, J.M. Birch, Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review, *Br. J. Cancer.* 76 (1997) 1–14.
- [78] A. Leonard, A.W. Craft, C. Moss, A.J. Malcolm, Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome, *Med. Pediatr. Oncol.* 26 (1996) 249–253. doi:10.1002/(SICI)1096-911X(199604)26:4<249::AID-MPO5>3.0.CO;2-J.
- [79] M.F. Hansen, M. Seton, A. Merchant, Osteosarcoma in Paget’s disease of bone, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 21 Suppl 2 (2006) P58-63. doi:10.1359/jbmr.06s211.
- [80] N. Riggi, L. Cironi, P. Provero, M.-L. Suvà, K. Kaloulis, C. Garcia-Echeverria, F. Hoffmann, A. Trumpp, I. Stamenkovic, Development of Ewing’s sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 11459–11468. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1696.
- [81] J.A. López-Guerrero, C. López-Ginés, A. Pellín, C. Carda, A. Llombart-Bosch, Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma, *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B.* 13 (2004) 81–91.

- [82] A.A. Sandberg, J.A. Bridge, Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Dermatofibrosarcoma protuberans and giant cell fibroblastoma, *Cancer Genet. Cytogenet.* 140 (2003) 1–12.
- [83] B. Fuchs, D.J. Pritchard, Etiology of osteosarcoma, *Clin. Orthop.* (2002) 40–52.
- [84] X. Wu, Z. Cai, L. Lou, Y. Zhu, Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients, *Cancer Epidemiol.* 36 (2012) 212–216. doi:10.1016/j.canep.2011.08.002.
- [85] V.D. Leaner, J.F. Chick, H. Donninger, I. Linniola, A. Mendoza, C. Khanna, M.J. Birrer, Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 265–275. doi:10.2353/ajpath.2009.071006.
- [86] Z. Chen, J. Guo, K. Zhang, Y. Guo, TP53 Mutations and Survival in Osteosarcoma Patients: A Meta-Analysis of Published Data, *Dis. Markers.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/4639575.
- [87] J. Cui, W. Wang, Z. Li, Z. Zhang, B. Wu, L. Zeng, Epigenetic changes in osteosarcoma, *Bull. Cancer (Paris)*. 98 (2011) E62-68. doi:10.1684/bdc.2011.1400.
- [88] B. Widhe, T. Widhe, Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma, *J. Bone Joint Surg. Am.* 82 (2000) 667–674.
- [89] S.C. Kaste, C.B. Pratt, A.M. Cain, D.J. Jones-Wallace, B.N. Rao, Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features, *Cancer.* 86 (1999) 1602–1608.
- [90] P.A. Meyers, R. Gorlick, Osteosarcoma, *Pediatr. Clin. North Am.* 44 (1997) 973–989.
- [91] K. Ando, M.-F. Heymann, V. Stresing, K. Mori, F. Rédini, D. Heymann, Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma, *Cancers.* 5 (2013) 591–616. doi:10.3390/cancers5020591.
- [92] G. Bacci, A. Briccoli, M. Rocca, S. Ferrari, D. Donati, A. Longhi, F. Bertoni, P. Bacchini, S. Giacomini, C. Forni, M. Manfrini, S. Galletti, Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO.* 14 (2003) 1126–1134.
- [93] Lamoureux, V. Trichet, C. Chipoy, F. Blanchard, F. Guoin, F. Redini, Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7 (2007) 169–181. doi:10.1586/14737140.7.2.169.
- [94] N. Jaffe, A. Puri, H. Gelderblom, N. Jaffe, A. Puri, H. Gelderblom, Osteosarcoma: Evolution of Treatment Paradigms, *Osteosarcoma: Evolution of Treatment Paradigms, Sarcoma Sarcoma.* 2013, 2013 (2013) e203531. doi:10.1155/2013/203531, 10.1155/2013/203531.
- [95] S.S. Bielack, B. Kempf-Bielack, G. Delling, G.U. Exner, S. Flege, K. Helmke, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik, M. Werner, W. Winkelmann, A. Zoubek, H. Jürgens, K. Winkler, 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 (2002) 776–790.
- [96] D. Heymann, F. Rédini, Targeted therapies for bone sarcomas, *BoneKEy Rep.* 2 (2013) 378. doi:10.1038/bonekey.2013.112.
- [97] D. Heymann, F. Rédini, Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches, *IBMS BoneKEy.* 8 (2011) 402–414.
- [98] D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman, L. Galibert, A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature.* 390 (1997) 175–179. doi:10.1038/36593.
- [99] B.R. Wong, R. Josien, S.Y. Lee, B. Sauter, H.L. Li, R.M. Steinman, Y. Choi, TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 2075–2080.
- [100] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 3597–3602.

- [101] L.C. Hofbauer, S. Khosla, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, W.J. Boyle, B.L. Riggs, The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 2–12. doi:10.1080/14041040009362546.
- [102] T. Ikeda, M. Kasai, M. Utsuyama, K. Hirokawa, Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus, *Endocrinology*. 142 (2001) 1419–1426. doi:10.1210/endo.142.4.8070.
- [103] J. Suzuki, T. Ikeda, H. Kuroyama, S. Seki, M. Kasai, M. Utsuyama, M. Tatsumi, H. Uematsu, K. Hirokawa, Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 1021–1027. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.191.
- [104] L. Lum, B.R. Wong, R. Josien, J.D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlöndorff, P. Tempst, Y. Choi, C.P. Blobel, Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13613–13618.
- [105] S. Georges, C. Ruiz Velasco, V. Trichet, Y. Fortun, D. Heymann, M. Padrines, Proteases and bone remodelling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 (2009) 29–41. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.005.
- [106] A. Hikita, I. Yana, H. Wakeyama, M. Nakamura, Y. Kadono, Y. Oshima, K. Nakamura, M. Seiki, S. Tanaka, Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 36846–36855. doi:10.1074/jbc.M606656200.
- [107] T. Nakashima, Y. Kobayashi, S. Yamasaki, A. Kawakami, K. Eguchi, H. Sasaki, H. Sakai, Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 768–775. doi:10.1006/bbrc.2000.3379.
- [108] V. Kartsogiannis, H. Zhou, N.J. Horwood, R.J. Thomas, D.K. Hards, J.M. Quinn, P. Niforas, K.W. Ng, T.J. Martin, M.T. Gillespie, Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues, *Bone*. 25 (1999) 525–534.
- [109] P. Collin-Osdoby, L. Rothe, F. Anderson, M. Nelson, W. Maloney, P. Osdoby, Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20659–20672. doi:10.1074/jbc.M010153200.
- [110] S. Theoleyre, Y. Wittrant, S.K. Tat, Y. Fortun, F. Redini, D. Heymann, The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling, *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004) 457–475. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.06.004.
- [111] S. Srivastava, M. Matsuda, Z. Hou, J.P. Bailey, R. Kitazawa, M.P. Herbst, N.D. Horseman, Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46171–46178. doi:10.1074/jbc.M308545200.
- [112] J.C. Huang, T. Sakata, L.L. Pflieger, M. Bencsik, B.P. Halloran, D.D. Bikle, R.A. Nissenson, PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 235–244. doi:10.1359/JBMR.0301226.
- [113] P. Palmqvist, P. Lundberg, E. Persson, A. Johansson, I. Lundgren, A. Lie, H.H. Conaway, U.H. Lerner, Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2414–2429. doi:10.1074/jbc.M510160200.
- [114] D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman, L. Galibert, A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature*. 390 (1997) 175–179. doi:10.1038/36593.
- [115] L.C. Hofbauer, S. Khosla, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, W.J. Boyle, B.L. Riggs, The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 2–12. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.2.
- [116] K. Kanazawa, A. Kudo, Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 20 (2005) 2053–2060. doi:10.1359/JBMR.050706.
- [117] S. Téletchéa, V. Stresing, S. Hervouet, M. Baud’huin, M.-F. Heymann, G. Bertho, C. Charrier, K. Ando, D. Heymann, Novel RANK antagonists for the treatment of bone-resorptive disease: theo-

- retical predictions and experimental validation, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 1466–1477. doi:10.1002/jbmr.2170.
- [118] A. Hakozaki, M. Yoda, T. Tohmonda, M. Furukawa, T. Hikata, S. Uchikawa, H. Takaishi, M. Matsumoto, K. Chiba, K. Horiuchi, Y. Toyama, Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 184 (2010) 2442–2448. doi:10.4049/jimmunol.0901188.
- [119] S. Mukai, R. Kitazawa, J. Ishii, T. Kondo, A. Hakozaki, K. Horiuchi, R. Haraguch, K. Mori, S. Kitazawa, Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF-κB, *Mol. Cell. Biochem.* 350 (2011) 29–38. doi:10.1007/s11010-010-0679-z.
- [120] H. Min, S. Morony, I. Sarosi, C.R. Dunstan, C. Capparelli, S. Scully, G. Van, S. Kaufman, P.J. Kostenuik, D.L. Lacey, W.J. Boyle, W.S. Simonet, Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 463–474.
- [121] N. Nakagawa, M. Kinosaki, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga, K. Higashio, RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 (1998) 395–400. doi:10.1006/bbrc.1998.9788.
- [122] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3540–3545.
- [123] J.E. Fata, Y.Y. Kong, J. Li, T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R.A. Moorehead, R. Elliott, S. Scully, E.B. Voura, D.L. Lacey, W.J. Boyle, R. Khokha, J.M. Penninger, The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development, *Cell.* 103 (2000) 41–50.
- [124] F. Arai, T. Miyamoto, O. Ohneda, T. Inada, T. Sudo, K. Brasel, T. Miyata, D.M. Anderson, T. Suda, Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 1741–1754.
- [125] T.J. Yun, P.M. Chaudhary, G.L. Shu, J.K. Frazer, M.K. Ewings, S.M. Schwartz, V. Pascual, L.E. Hood, E.A. Clark, OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 161 (1998) 6113–6121.
- [126] J.G. Emery, P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, P.R. Young, Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14363–14367.
- [127] S. Théoleyre, S. Kwan Tat, P. Vusio, F. Blanchard, J. Gallagher, S. Ricard-Blum, Y. Fortun, M. Padrines, F. Rédini, D. Heymann, Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 460–467. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.120.
- [128] I. Holen, C.M. Shipman, Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979. 110 (2006) 279–291. doi:10.1042/CS20050175.
- [129] K. Yamaguchi, M. Kinosaki, M. Goto, F. Kobayashi, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5117–5123.
- [130] M. Schoppet, K.T. Preissner, L.C. Hofbauer, RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 549–553.
- [131] K.M. Woo, Y. Choi, S.-H. Ko, J.S. Ko, K.-O. Oh, K.-K. Kim, Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones, *Exp. Mol. Med.* 34 (2002) 347–352. doi:10.1038/emm.2002.51.
- [132] T. Kondo, R. Kitazawa, S. Maeda, S. Kitazawa, 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 1411–1419. doi:10.1359/JBMR.040604.

- [133] M. Saika, D. Inoue, S. Kido, T. Matsumoto, 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha, *Endocrinology*. 142 (2001) 2205–2212. doi:10.1210/endo.142.6.8220.
- [134] K. Thirunavukkarasu, R.R. Miles, D.L. Halladay, X. Yang, R.J. Galvin, S. Chandrasekhar, T.J. Martin, J.E. Onyia, Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36241–36250. doi:10.1074/jbc.M104319200.
- [135] L.C. Hofbauer, M. Schoppet, Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases, *JAMA*. 292 (2004) 490–495. doi:10.1001/jama.292.4.490.
- [136] E.A. O'Brien, J.H. Williams, M.J. Marshall, Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane, *Bone*. 28 (2001) 208–214.
- [137] H. Brändström, T. Björkman, O. Ljunggren, Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 831–835. doi:10.1006/bbrc.2000.4223.
- [138] N.O. Vidal, H. Brändström, K.B. Jonsson, C. Ohlsson, Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids, *J. Endocrinol.* 159 (1998) 191–195.
- [139] C. Sobacchi, A. Frattini, M.M. Guerrini, M. Abinun, A. Pangrazio, L. Susani, R. Bredius, G. Mancini, A. Cant, N. Bishop, P. Grabowski, A. Del Fattore, C. Messina, G. Errigo, F.P. Coxon, D.I. Scott, A. Teti, M.J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, M.H. Helfrich, Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL, *Nat. Genet.* 39 (2007) 960–962. doi:10.1038/ng2076.
- [140] M.P. Whyte, D. Wenkert, W.H. McAlister, D.V. Novack, A.R. Nenninger, X. Zhang, M. Huskey, S. Mumm, Dysosteosclerosis presents as an “osteoclast-poor” form of osteopetrosis: comprehensive investigation of a 3-year-old girl and literature review, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 2527–2539. doi:10.1002/jbmr.131.
- [141] T. Cundy, M. Hegde, D. Naot, B. Chong, A. King, R. Wallace, J. Mulley, D.R. Love, J. Seidel, M. Fawcner, T. Banovic, K.E. Callon, A.B. Grey, I.R. Reid, C.A. Middleton-Hardie, J. Cornish, A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2119–2127.
- [142] D. Naot, A. Choi, D.S. Musson, P.Ö. Simsek Kiper, G.E. Utine, K. Boduroglu, M. Peacock, L.A. DiMeglio, T. Cundy, Novel homozygous mutations in the osteoprotegerin gene TNFRSF11B in two unrelated patients with juvenile Paget’s disease, *Bone*. 68 (2014) 6–10. doi:10.1016/j.bone.2014.07.034.
- [143] B. Chong, M. Hegde, M. Fawcner, S. Simonet, H. Cassinelli, M. Coker, J. Kanis, J. Seidel, C. Tau, B. Tüysüz, B. Yüksel, D. Love, International Hyperphosphatasia Collaborative Group, Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18 (2003) 2095–2104. doi:10.1359/jbmr.2003.18.12.2095.
- [144] M.M. Guerrini, C. Sobacchi, B. Cassani, M. Abinun, S.S. Kilic, A. Pangrazio, D. Moratto, E. Mazzolari, J. Clayton-Smith, P. Orchard, F.P. Coxon, M.H. Helfrich, J.C. Crockett, D. Mellis, A. Vellodi, I. Tezcan, L.D. Notarangelo, M.J. Rogers, P. Vezzoni, A. Villa, A. Frattini, Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2008) 64–76. doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.015.
- [145] A.E. Hughes, S.H. Ralston, J. Marken, C. Bell, H. MacPherson, R.G. Wallace, W. van Hul, M.P. Whyte, K. Nakatsuka, L. Hovy, D.M. Anderson, Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis, *Nat. Genet.* 24 (2000) 45–48. doi:10.1038/71667.
- [146] L. Palenzuela, C. Vives-Bauza, I. Fernández-Cadenas, A. Meseguer, N. Font, E. Sarret, S. Schwartz, A.L. Andreu, Familial expansile osteolysis in a large Spanish kindred resulting from an insertion mutation in the TNFRSF11A gene, *J. Med. Genet.* 39 (2002) E67.
- [147] E. Elahi, Y. Shafaghati, S. Asadi, F. Absalan, H. Goodarzi, N. Gharaii, M.H. Karimi-Nejad, F. Shahram, A.E. Hughes, Intragenic SNP haplotypes associated with 84dup18 mutation in TNFRSF11A in four FEO pedigrees suggest three independent origins for this mutation, *J. Bone Miner. Metab.* 25 (2007) 159–164. doi:10.1007/s00774-007-0748-x.

- [148] T.L. Johnson-Pais, F.R. Singer, H.G. Bone, C.T. McMurray, M.F. Hansen, R.J. Leach, Identification of a novel tandem duplication in exon 1 of the TNFRSF11A gene in two unrelated patients with familial expansile osteolysis, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 18 (2003) 376–380. doi:10.1359/jbmr.2003.18.2.376.
- [149] M.P. Whyte, A.E. Hughes, Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17 (2002) 26–29. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.26.
- [150] M.P. Whyte, C. Tau, W.H. McAlister, X. Zhang, D.V. Novack, V. Preliasco, E. Santini-Araujo, S. Mumm, Juvenile Paget's disease with heterozygous duplication within TNFRSF11A encoding RANK, *Bone*. 68 (2014) 153–161. doi:10.1016/j.bone.2014.07.019.
- [151] K.A. Knoop, B.R. Butler, N. Kumar, R.D. Newberry, I.R. Williams, Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 1861–1871. doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.004.
- [152] K.A. Knoop, N. Kumar, B.R. Butler, S.K. Sakthivel, R.T. Taylor, T. Nochi, H. Akiba, H. Yagita, H. Kiyono, I.R. Williams, RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 183 (2009) 5738–5747. doi:10.4049/jimmunol.0901563.
- [153] R. Hanada, A. Leibbrandt, T. Hanada, S. Kitaoka, T. Furuyashiki, H. Fujihara, J. Trichereau, M. Paolino, F. Qadri, R. Plehm, S. Klaere, V. Komnenovic, H. Mimata, H. Yoshimatsu, N. Takahashi, A. von Haeseler, M. Bader, S.S. Kilic, Y. Ueta, C. Piffl, S. Narumiya, J.M. Penninger, Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK, *Nature*. 462 (2009) 505–509. doi:10.1038/nature08596.
- [154] C.M. Blatteis, S. Li, Z. Li, C. Feleder, V. Perlik, Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76 (2005) 1–18. doi:10.1016/j.prostaglandins.2005.01.001.
- [155] A.E. Papadopouli, C.N. Klonaris, S.E. Theocharis, Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature, *Histol. Histopathol.* 23 (2008) 497–506.
- [156] M. Shimamura, H. Nakagami, M.K. Osako, H. Kurinami, H. Koriyama, P. Zhengda, H. Tomioka, A. Tenma, K. Wakayama, R. Morishita, OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 8191–8196. doi:10.1073/pnas.1400544111.
- [157] E.K. Malle, N.W. Zammit, S.N. Walters, Y.C. Koay, J. Wu, B.M. Tan, J.E. Villanueva, R. Brink, T. Loudovaris, J. Cantley, S.R. McAlpine, D. Hesselton, S.T. Grey, Nuclear factor  $\kappa$ B-inducing kinase activation as a mechanism of pancreatic  $\beta$  cell failure in obesity, *J. Exp. Med.* 212 (2015) 1239–1254. doi:10.1084/jem.20150218.
- [158] N.G. Kondegowda, R. Fenutria, I.R. Pollack, M. Orthofer, A. Garcia-Ocaña, J.M. Penninger, R.C. Vasavada, Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Pathway, *Cell Metab.* 22 (2015) 77–85. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.021.
- [159] K. Matsuzaki, N. Udagawa, N. Takahashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, N. Shima, T. Morinaga, Y. Toyama, Y. Yabe, K. Higashio, T. Suda, Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 199–204. doi:10.1006/bbrc.1998.8586.
- [160] J.M. Quinn, J. Elliott, M.T. Gillespie, T.J. Martin, A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro, *Endocrinology.* 139 (1998) 4424–4427. doi:10.1210/endo.139.10.6331.
- [161] K. Fuller, B. Wong, S. Fox, Y. Choi, T.J. Chambers, TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 997–1001.
- [162] T.L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, B.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C.R. Dunstan, S. Hu, D.L. Lacey, The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 527–538.
- [163] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony,



- G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3540–3545.
- [164] L. Galibert, M.E. Tometsko, D.M. Anderson, D. Cosman, W.C. Dougall, The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 34120–34127.
- [165] R. Raju, L. Balakrishnan, V. Nanjappa, M. Bhattacharjee, D. Getnet, B. Muthusamy, J. Kurian Thomas, J. Sharma, B.A. Rahiman, H.C. Harsha, S. Shankar, T.S.K. Prasad, S.S. Mohan, G.D. Bader, M.R. Wani, A. Pandey, A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway, *Database J. Biol. Databases Curation*. 2011 (2011) bar021. doi:10.1093/database/bar021.
- [166] H.H. Kim, D.E. Lee, J.N. Shin, Y.S. Lee, Y.M. Jeon, C.H. Chung, J. Ni, B.S. Kwon, Z.H. Lee, Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase, *FEBS Lett.* 443 (1999) 297–302.
- [167] M.A. Lomaga, W.C. Yeh, I. Sarosi, G.S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, A. van der Heiden, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J.M. Penninger, C.J. Paige, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, W.J. Boyle, D.V. Goeddel, T.W. Mak, TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling, *Genes Dev.* 13 (1999) 1015–1024.
- [168] J. Gohda, T. Akiyama, T. Koga, H. Takayanagi, S. Tanaka, J. Inoue, RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis, *EMBO J.* 24 (2005) 790–799. doi:10.1038/sj.emboj.7600564.
- [169] B.G. Darnay, J. Ni, P.A. Moore, B.B. Aggarwal, Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7724–7731.
- [170] M. Baud'huin, L. Duplomb, C.R. Velasco, Y. Fortun, D. Heymann, M. Padrines, Key roles of the OPG–RANK–RANKL system in bone oncology, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7 (2007) 221–232. doi:10.1586/14737140.7.2.221.
- [171] A. Gama, B. Navet, J.W. Vargas, B. Castaneda, F. Lézot, Bone resorption: an actor of dental and periodontal development?, *Front. Physiol.* 6 (2015) 319. doi:10.3389/fphys.2015.00319.
- [172] F. Lézot, J. Chesneau, B. Navet, B. Gobin, J. Amiaud, Y. Choi, H. Yagita, B. Castaneda, A. Berdal, C.G. Mueller, F. Rédini, D. Heymann, Skeletal consequences of RANKL-blocking antibody (IK22-5) injections during growth: mouse strain disparities and synergic effect with zoledronic acid, *Bone*. 73 (2015) 51–59. doi:10.1016/j.bone.2014.12.011.
- [173] L.A. Schneeweis, D. Willard, M.E. Milla, Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41155–41164. doi:10.1074/jbc.M506366200.
- [174] Y.Y. Kong, H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, J.M. Penninger, OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, *Nature*. 397 (1999) 315–323. doi:10.1038/16852.
- [175] Y. Wittrant, S. Couillaud, S. Theoleyre, C. Dunstan, D. Heymann, F. Rédini, Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 38–44. doi:10.1016/S0006-291X(02)00179-1.
- [176] C.G. Mueller, E. Hess, Emerging Functions of RANKL in Lymphoid Tissues, *Front. Immunol.* 3 (2012) 261. doi:10.3389/fimmu.2012.00261.
- [177] T. Akiyama, Y. Shimo, H. Yanai, J. Qin, D. Ohshima, Y. Maruyama, Y. Asaumi, J. Kitazawa, H. Takayanagi, J.M. Penninger, M. Matsumoto, T. Nitta, Y. Takahama, J.-I. Inoue, The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance, *Immunity*. 29 (2008) 423–437. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.015.
- [178] T. Akiyama, M. Shinzawa, J. Qin, N. Akiyama, Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases, *Front. Immunol.* 4 (2013) 249. doi:10.3389/fimmu.2013.00249.

- [179] D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman, L. Galibert, A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature*. 390 (1997) 175–179. doi:10.1038/36593.
- [180] V. Breuil, H. Schmid-Antomarchi, A. Schmid-Alliana, R. Rezzonico, L. Euller-Ziegler, B. Rossi, The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17 (2003) 1751–1753. doi:10.1096/fj.02-1188fje.
- [181] J. Cook, T. Hagemann, Tumour-associated macrophages and cancer, *Curr. Opin. Pharmacol.* 13 (2013) 595–601. doi:10.1016/j.coph.2013.05.017.
- [182] Y. Kambayashi, T. Fujimura, S. Furudate, M. Asano, A. Kakizaki, S. Aiba, The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 2547–2550. doi:10.1038/jid.2015.199.
- [183] T. Fujimura, Y. Kambayashi, S. Furudate, M. Asano, A. Kakizaki, S. Aiba, Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 2884–2887. doi:10.1038/jid.2015.209.
- [184] B. Navet, N. Renema, M.-F. Heymann, F. Lezot, D. Heymann, RANK-RANKL signalling in cancer, *Biosci. Rep.* (2016). doi:10.1042/BSR20160150.
- [185] D. Santini, G. Schiavon, B. Vincenzi, L. Gaeta, F. Pantano, A. Russo, C. Ortega, C. Porta, S. Galluzzo, G. Armento, N. La Verde, C. Caroti, I. Treilleux, A. Ruggiero, G. Perrone, R. Addeo, P. Clezardin, A.O. Muda, G. Tonini, Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Expression in Primary Tumors Associates with Bone Metastasis Occurrence in Breast Cancer Patients, *PLoS ONE*. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0019234.
- [186] D. Santini, G. Perrone, I. Roato, L. Godio, F. Pantano, D. Grasso, A. Russo, B. Vincenzi, M.E. Fratto, R. Sabbatini, C. Della Pepa, C. Porta, A. Del Conte, G. Schiavon, A. Berruti, R.M. Tomasino, M. Papotti, N. Papapietro, A. Onetti Muda, V. Denaro, G. Tonini, Expression pattern of receptor activator of NF $\kappa$ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases, *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 780–784. doi:10.1002/jcp.22402.
- [187] H.S. Park, A. Lee, B.J. Chae, J.-S. Bae, B.J. Song, S.S. Jung, Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer, *J. Surg. Oncol.* 110 (2014) 807–812. doi:10.1002/jso.23737.
- [188] B.M. Pfitzner, D. Branstetter, S. Loibl, C. Denkert, B. Lederer, W.D. Schmitt, F. Dombrowski, M. Werner, T. Rüdiger, W.C. Dougall, G. von Minckwitz, RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 145 (2014) 307–315. doi:10.1007/s10549-014-2955-1.
- [189] L. Zhang, Y. Teng, Y. Zhang, J. Liu, L. Xu, J. Qu, K. Hou, X. Yang, Y. Liu, X. Qu, Receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis, *J. Clin. Pathol.* 65 (2012) 36–40. doi:10.1136/jclinpath-2011-200312.
- [190] P. Bhatia, M.M. Sanders, M.F. Hansen, Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (2005) 162–165.
- [191] D.H. Jones, T. Nakashima, O.H. Sanchez, I. Kozieradzki, S.V. Komarova, I. Sarosi, S. Morony, E. Rubin, R. Sarao, C.V. Hojilla, V. Komnenovic, Y.-Y. Kong, M. Schreiber, S.J. Dixon, S.M. Sims, R. Khokha, T. Wada, J.M. Penninger, Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL, *Nature*. 440 (2006) 692–696. doi:10.1038/nature04524.
- [192] S. Owen, L. Ye, A.J. Sanders, M.D. Mason, W.G. Jiang, Expression profile of receptor activator of nuclear- $\kappa$ B (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer, *Anticancer Res.* 33 (2013) 199–206.
- [193] C. Van Poznak, S.S. Cross, M. Saggese, C. Hudis, K.S. Panageas, L. Norton, R.E. Coleman, I. Holen, Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours, *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 56–63. doi:10.1136/jcp.2005.026534.

- [194] H.A. Azim, F.A. Peccatori, S. Brohée, D. Branstetter, S. Loi, G. Viale, M. Piccart, W.C. Dougall, G. Pruneri, C. Sotiriou, RANKL-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy, *Breast Cancer Res. BCR.* 17 (2015) 24. doi:10.1186/s13058-015-0538-7.
- [195] H. Hu, J. Wang, A. Gupta, A. Shidfar, D. Branstetter, O. Lee, D. Ivancic, M. Sullivan, R.T. Chatterton, W.C. Dougall, S.A. Khan, RANKL expression in normal and malignant breast tissue responds to progesterone and is up-regulated during the luteal phase, *Breast Cancer Res. Treat.* 146 (2014) 515–523. doi:10.1007/s10549-014-3049-9.
- [196] W.-Q. Shang, H. Li, L.-B. Liu, K.-K. Chang, J.-J. Yu, F. Xie, M.-Q. Li, J.-J. Yu, RANKL/RANK interaction promotes the growth of cervical cancer cells by strengthening the dialogue between cervical cancer cells and regulation of IL-8 secretion, *Oncol. Rep.* 34 (2015) 3007–3016. doi:10.3892/or.2015.4303.
- [197] C.-J. Hsu, T.-Y. Lin, C.-C. Kuo, C.-H. Tsai, M.-Z. Lin, H.-C. Hsu, Y.-C. Fong, C.-H. Tang, Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 138–147. doi:10.1002/jcb.22677.
- [198] E. Grimaud, L. Soubigou, S. Couillaud, P. Coipeau, A. Moreau, N. Passuti, F. Gouin, F. Redini, D. Heymann, Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 2021–2031.
- [199] J. Yin, L. Wang, W. Tang, X. Wang, L. Lv, A. Shao, Y. Shi, G. Ding, S. Chen, H. Gu, RANK rs1805034 T>C Polymorphism Is Associated with Susceptibility of Esophageal Cancer in a Chinese Population, *PLoS ONE.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0101705.
- [200] G.J. Atkins, P. Kostakis, C. Vincent, A.N. Farrugia, J.P. Houchins, D.M. Findlay, A. Evdokiou, A.C.W. Zannettino, RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 21 (2006) 1339–1349. doi:10.1359/jbmr.060604.
- [201] D.G. Branstetter, S.D. Nelson, J.C. Manivel, J.-Y. Blay, S. Chawla, D.M. Thomas, S. Jun, I. Jacobs, Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18 (2012) 4415–4424. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0578.
- [202] F.-N. Song, M. Duan, L.-Z. Liu, Z.-C. Wang, J.-Y. Shi, L.-X. Yang, J. Zhou, J. Fan, Q. Gao, X.-Y. Wang, RANKL promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via NF-κB-mediated epithelial-mesenchymal transition, *PloS One.* 9 (2014) e108507. doi:10.1371/journal.pone.0108507.
- [203] A. Sasaki, K. Ishikawa, N. Haraguchi, H. Inoue, T. Ishio, K. Shibata, M. Ohta, S. Kitano, M. Mori, Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis, *Ann. Surg. Oncol.* 14 (2007) 1191–1199. doi:10.1245/s10434-006-9277-4.
- [204] X. Peng, W. Guo, T. Ren, Z. Lou, X. Lu, S. Zhang, Q. Lu, Y. Sun, Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer, *PloS One.* 8 (2013) e58361. doi:10.1371/journal.pone.0058361.
- [205] P. Fiumara, V. Snell, Y. Li, A. Mukhopadhyay, M. Younes, A.M. Gillenwater, F. Cabanillas, B.B. Aggarwal, A. Younes, Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines, *Blood.* 98 (2001) 2784–2790.
- [206] K. Nosaka, T. Miyamoto, T. Sakai, H. Mitsuya, T. Suda, M. Matsuoka, Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on adult T-cell leukemia cells, *Blood.* 99 (2002) 634–640.
- [207] V. Barcala, P. Ruybal, H. Garcia Rivello, C. Waldner, A. Ascione, C. Mongini, RANKL expression in a case of follicular lymphoma, *Eur. J. Haematol.* 70 (2003) 417–419.
- [208] V. Kupas, C. Weishaupt, D. Siepmann, M.-L. Kaserer, M. Eickelmann, D. Metze, T.A. Luger, S. Beissert, K. Loser, RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells, *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 944–955. doi:10.1038/jid.2010.377.
- [209] S. Roux, X. Mariette, The high rate of bone resorption in multiple myeloma is due to RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANK Ligand expression, *Leuk. Lymphoma.* 45 (2004) 1111–1118. doi:10.1080/10428194310001593193.
- [210] A.N. Farrugia, G.J. Atkins, L.B. To, B. Pan, N. Horvath, P. Kostakis, D.M. Findlay, P. Bardy, A.C.W. Zannettino, Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma

- cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo, *Cancer Res.* 63 (2003) 5438–5445.
- [211] D. Granchi, I. Amato, L. Battistelli, S. Avnet, S. Capaccioli, L. Papucci, M. Donnini, A. Pellacani, M.L. Brandi, A. Giunti, N. Baldini, In vitro blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand prevents osteoclastogenesis induced by neuroblastoma cells, *Int. J. Cancer.* 111 (2004) 829–838. doi:10.1002/ijc.20308.
- [212] F.-H. Chuang, S.-S. Hsue, C.-W. Wu, Y.-K. Chen, Immunohistochemical expression of RANKL, RANK, and OPG in human oral squamous cell carcinoma, *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 38 (2009) 753–758. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00793.x.
- [213] K. Mori, B. Le Goff, M. Berreur, A. Riet, A. Moreau, F. Blanchard, C. Chevalier, I. Guisle-Marsollier, J. Léger, J. Guicheux, M. Masson, F. Guin, F. Rédini, D. Heymann, Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B, *J. Pathol.* 211 (2007) 555–562. doi:10.1002/path.2140.
- [214] J.A. Lee, J.S. Jung, D.H. Kim, J.S. Lim, M.S. Kim, C.-B. Kong, W.S. Song, W.H. Cho, D.-G. Jeon, S.-Y. Lee, J.-S. Koh, RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma, *Pediatr. Blood Cancer.* 56 (2011) 738–743. doi:10.1002/pbc.22720.
- [215] A.P. Armstrong, R.E. Miller, J.C. Jones, J. Zhang, E.T. Keller, W.C. Dougall, RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes, *The Prostate.* 68 (2008) 92–104. doi:10.1002/pros.20678.
- [216] V.A. Odero-Marrah, R. Wang, G. Chu, M. Zayzafoon, J. Xu, C. Shi, F.F. Marshall, H.E. Zhou, L.W.K. Chung, Receptor activator of NF-kappaB Ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells, *Cell Res.* 18 (2008) 858–870. doi:10.1038/cr.2008.84.
- [217] S. Mikami, K. Katsube, M. Oya, M. Ishida, T. Kosaka, R. Mizuno, S. Mochizuki, T. Ikeda, M. Mukai, Y. Okada, Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas, *J. Pathol.* 218 (2009) 530–539. doi:10.1002/path.2567.
- [218] M.-F. Heymann, A. Riet, B. Le Goff, S. Battaglia, J. Paineau, D. Heymann, OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions, *Regul. Pept.* 148 (2008) 46–53. doi:10.1016/j.regpep.2008.02.004.
- [219] K. Trieb, R. Windhager, Receptor activator of nuclear factor kappaB expression is a prognostic factor in human osteosarcoma, *Oncol. Lett.* 10 (2015) 1813–1815. doi:10.3892/ol.2015.3489.
- [220] Z. Bago-Horvath, K. Schmid, F. Rössler, K. Nagy-Bojarszky, P. Funovics, I. Sulzbacher, Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma, *Pathology (Phila.)* 46 (2014) 411–415. doi:10.1097/PAT.000000000000116.
- [221] A.D. Papanastasiou, C. Sirinian, H.P. Kalofonos, Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kappaB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration, *Breast Cancer Res. BCR.* 14 (2012) R112. doi:10.1186/bcr3234.
- [222] T.A. Gonda, S. Tu, T.C. Wang, Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis, *Cell Cycle Georget. Tex.* 8 (2009) 2005–2013. doi:10.4161/cc.8.13.8985.
- [223] M. Baud'huin, L. Duplomb, S. Teletchea, F. Lamoureux, C. Ruiz-Velasco, M. Maillason, F. Redini, M.-F. Heymann, D. Heymann, Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions, *Cytokine Growth Factor Rev.* 24 (2013) 401–409. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.06.001.
- [224] T. Standal, C. Seidel, Ø. Hjertner, T. Plesner, R.D. Sanderson, A. Waage, M. Borset, A. Sundan, Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells, *Blood.* 100 (2002) 3002–3007. doi:10.1182/blood-2002-04-1190.
- [225] Lamoureux, G. Picarda, L. Garrigue-Antar, M. Baud'huin, V. Trichet, A. Vidal, E. Miot-Noirault, B. Pitard, D. Heymann, F. Rédini, Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma, *Cancer Res.* 69 (2009) 526–536. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2648.
- [226] I. Holen, P.I. Croucher, F.C. Hamdy, C.L. Eaton, Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 62 (2002) 1619–1623.
- [227] M. Baud'huin, L. Duplomb, S. Téletchéa, C. Charrier, M. Maillason, M. Fouassier, D. Heymann, Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 31704–31713. doi:10.1074/jbc.M109.030312.

- [228] W. Tan, W. Zhang, A. Strasner, S. Grivennikov, J.Q. Cheng, R.M. Hoffman, M. Karin, Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signaling, *Nature*. 470 (2011) 548–553. doi:10.1038/nature09707.
- [229] A.C. Monteiro, A.C. Leal, T. Gonçalves-Silva, A.C.T. Mercadante, F. Kestelman, S.B. Chaves, R.B. Azevedo, J.P. Monteiro, A. Bonomo, T Cells Induce Pre-Metastatic Osteolytic Disease and Help Bone Metastases Establishment in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer, *PLOS ONE*. 8 (2013) e68171. doi:10.1371/journal.pone.0068171.
- [230] K. Mori, B. Le Goff, C. Charrier, S. Battaglia, D. Heymann, F. Rédini, DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process, *Bone*. 40 (2007) 981–990. doi:10.1016/j.bone.2006.11.006.
- [231] X. Li, Y. Liu, B. Wu, Z. Dong, Y. Wang, J. Lu, P. Shi, W. Bai, Z. Wang, Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis, *Oncol. Rep.* 32 (2014) 2605–2611. doi:10.3892/or.2014.3511.
- [232] L.-M. Chen, C.-H. Kuo, T.-Y. Lai, Y.-M. Lin, C.-C. Su, H.-H. Hsu, F.-J. Tsai, C.-H. Tsai, C.-Y. Huang, C.-H. Tang, RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 933–941. doi:10.1002/jcb.23009.
- [233] Y. Liu, J. Wang, T. Ni, L. Wang, Y. Wang, X. Sun, CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cells, *Oncotarget*. (2016). doi:10.18632/oncotarget.8291.
- [234] M. Shin, K. Matsuo, T. Tada, H. Fukushima, H. Furuta, S. Ozeki, T. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Okamoto, E. Jimi, The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells, *Carcinogenesis*. 32 (2011) 1634–1640. doi:10.1093/carcin/bgr198.
- [235] A.G. Beristain, S.R. Narala, M.A. Di Grappa, R. Khokha, Homotypic RANK signaling differentially regulates proliferation, motility and cell survival in osteosarcoma and mammary epithelial cells, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 943–955. doi:10.1242/jcs.094029.
- [236] D. Golden, E.A. Saria, M.F. Hansen, Regulation of Osteoblast Migration Involving Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B (RANK) Signaling, *J. Cell. Physiol.* 230 (2015) 2951–2960. doi:10.1002/jcp.25024.
- [237] E. Gonzalez-Suarez, D. Branstetter, A. Armstrong, H. Dinh, H. Blumberg, W.C. Dougall, RANK Overexpression in Transgenic Mice with Mouse Mammary Tumor Virus Promoter-Controlled RANK Increases Proliferation and Impairs Alveolar Differentiation in the Mammary Epithelia and Disrupts Lumen Formation in Cultured Epithelial Acini, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 1442–1454. doi:10.1128/MCB.01298-06.
- [238] N.-S. Kim, H.-J. Kim, B.-K. Koo, M.-C. Kwon, Y.-W. Kim, Y. Cho, Y. Yokota, J.M. Penninger, Y.-Y. Kong, Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 1002–1013. doi:10.1128/MCB.26.3.1002-1013.2006.
- [239] E. Gonzalez-Suarez, A.P. Jacob, J. Jones, R. Miller, M.P. Roudier-Meyer, R. Erwert, J. Pinkas, D. Branstetter, W.C. Dougall, RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis, *Nature*. 468 (2010) 103–107. doi:10.1038/nature09495.
- [240] M. Palafox, I. Ferrer, P. Pellegrini, S. Vila, S. Hernandez-Ortega, A. Urruticoechea, F. Climent, M.T. Soler, P. Muñoz, F. Viñals, M. Tometsko, D. Branstetter, W.C. Dougall, E. González-Suárez, RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis, *Cancer Res.* 72 (2012) 2879–2888. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0044.
- [241] T. Yamada, M. Tsuda, T. Takahashi, Y. Totsuka, M. Shindoh, Y. Ohba, RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 2845–2856. doi:10.1016/j.ajpath.2011.02.003.
- [242] J.-K. Min, Y.-M. Kim, Y.-M. Kim, E.-C. Kim, Y.S. Gho, I.-J. Kang, S.-Y. Lee, Y.-Y. Kong, Y.-G. Kwon, Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39548–39557. doi:10.1074/jbc.M300539200.
- [243] Y.-M. Kim, Y.-M. Kim, Y.M. Lee, H.-S. Kim, J.D. Kim, Y. Choi, K.-W. Kim, S.-Y. Lee, Y.-G. Kwon, TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src

- and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6799–6805. doi:10.1074/jbc.M109434200.
- [244] H.-H. Kim, H.S. Shin, H.J. Kwak, K.Y. Ahn, J.-H. Kim, H.J. Lee, M.-S. Lee, Z.H. Lee, G.Y. Koh, RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 17 (2003) 2163–2165. doi:10.1096/fj.03-0215fje.
- [245] Z. Benslimane-Ahmim, D. Heymann, B. Dizier, A. Lokajczyk, R. Brion, I. Laurendeau, I. Bièche, D.M. Smadja, I. Galy-Fauroux, S. Collic-Jouault, A.M. Fischer, C. Boisson-Vidal, Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties, *J. Thromb. Haemost. JTH.* 9 (2011) 834–843. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04207.x.
- [246] J.-K. Min, Y.-L. Cho, J.-H. Choi, Y. Kim, J.H. Kim, Y.S. Yu, J. Rho, N. Mochizuki, Y.-M. Kim, G.T. Oh, Y.-G. Kwon, Receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice, *Blood.* 109 (2007) 1495–1502. doi:10.1182/blood-2006-06-029298.
- [247] T. Yamagishi, H. Kawashima, A. Ogose, T. Ariizumi, T. Sasaki, H. Hatano, T. Hotta, N. Endo, Receptor-Activator of Nuclear KappaB Ligand Expression as a New Therapeutic Target in Primary Bone Tumors, *PloS One.* 11 (2016) e0154680. doi:10.1371/journal.pone.0154680.
- [248] K. Mori, K. Ando, D. Heymann, F. Rédini, Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells?, *Histol. Histopathol.* 24 (2009) 235–242.
- [249] S.D. Molyneux, M.A. Di Grappa, A.G. Beristain, T.D. McKee, D.H. Wai, J. Paderova, M. Kashyap, P. Hu, T. Maiuri, S.R. Narala, V. Stambolic, J. Squire, J. Penninger, O. Sanchez, T.J. Triche, G.A. Wood, L.S. Kirschner, R. Khokha, Prkar1a is an osteosarcoma tumor suppressor that defines a molecular subclass in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 3310–3325. doi:10.1172/JCI42391.
- [250] F. Lamoureux, P. Richard, Y. Wittrant, S. Battaglia, P. Pilet, V. Trichet, F. Blanchard, F. Gouin, B. Pitard, D. Heymann, F. Redini, Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption, *Cancer Res.* 67 (2007) 7308–7318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4130.
- [251] T. Akiyama, C.R. Dass, Y. Shinoda, H. Kawano, S. Tanaka, P.F.M. Choong, Systemic RANK-Fc protein therapy is efficacious against primary osteosarcoma growth in a murine model via activity against osteoclasts, *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 470–476. doi:10.1211/jpp.62.04.0009.
- [252] U. Styrkarsdottir, G. Thorleifsson, P. Sulem, D.F. Gudbjartsson, A. Sigurdsson, A. Jonasdottir, A. Jonasdottir, A. Oddsson, A. Helgason, O.T. Magnusson, G.B. Walters, M.L. Frigge, H.T. Helgadóttir, H. Johannsdóttir, K. Bergsteinsdóttir, M.H. Ogmundsdóttir, J.R. Center, T.V. Nguyen, J.A. Eisman, C. Christiansen, E. Steingrímsson, J.G. Jonasson, L. Tryggvadóttir, G.I. Eyjólfsson, A. Theodors, T. Jonsson, T. Ingvarsson, I. Olafsson, T. Rafnar, A. Kong, G. Sigurdsson, G. Masson, U. Thorsteinsdóttir, K. Stefansson, Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits, *Nature.* 497 (2013) 517–520. doi:10.1038/nature12124.
- [253] J. Wu, N. Xie, K. Xie, J. Zeng, L. Cheng, Y. Lei, Y. Liu, L. Song, D. Dong, Y. Chen, R. Zeng, E.C. Nice, C. Huang, Y. Wei, GPR48, a poor prognostic factor, promotes tumor metastasis and activates  $\beta$ -catenin/TCF signaling in colorectal cancer, *Carcinogenesis.* 34 (2013) 2861–2869. doi:10.1093/carcin/bgt229.
- [254] Y.-B. Zhu, L. Xu, M. Chen, H.-N. Ma, F. Lou, GPR48 promotes multiple cancer cell proliferation via activation of Wnt signaling, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP.* 14 (2013) 4775–4778.
- [255] W. Luo, M. Rodriguez, J.M. Valdez, X. Zhu, K. Tan, D. Li, S. Siwko, L. Xin, M. Liu, Lgr4 is a key regulator of prostate development and prostate stem cell differentiation, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 31 (2013) 2492–2505. doi:10.1002/stem.1484.
- [256] F. Liang, J. Yue, J. Wang, L. Zhang, R. Fan, H. Zhang, Q. Zhang, GPCR48/LGR4 promotes tumorigenesis of prostate cancer via PI3K/Akt signaling pathway, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 32 (2015) 49. doi:10.1007/s12032-015-0486-1.
- [257] J. Liu, W. Wei, C.-A. Guo, N. Han, J. Pan, T. Fei, Z. Yan, J. Liu, W. Wei, C.-A. Guo, N. Han, J. Pan, T. Fei, Z. Yan, Stat3 Upregulates Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 4 Expression in Osteosarcoma Cells, Stat3 Upregulates Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptor 4 Expression in Osteosarcoma Cells, *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2013, 2013 (2013) e310691. doi:10.1155/2013/310691, 10.1155/2013/310691.

- [258] M. Esposito, Y. Kang, Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis, *Pharmacol. Ther.* 141 (2014) 222–233. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.006.
- [259] P.J. Bekker, D. Holloway, A. Nakanishi, M. Arrighi, P.T. Leese, C.R. Dunstan, The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 16 (2001) 348–360. doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.348.
- [260] P.J. Bekker, D.L. Holloway, A.S. Rasmussen, R. Murphy, S.W. Martin, P.T. Leese, G.B. Holmes, C.R. Dunstan, A.M. DePaoli, A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 1059–1066. doi:10.1359/JBMR.040305.
- [261] G. Picarda, E. Matous, J. Amiaud, C. Charrier, F. Lamoureux, M.-F. Heymann, F. Tirode, B. Pitard, V. Trichet, D. Heymann, F. Redini, Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing’s sarcoma by inhibiting RANKL, *J. Bone Oncol.* 2 (2013) 95–104. doi:10.1016/j.jbo.2013.04.004.
- [262] F. Lamoureux, G. Picarda, J. Rousseau, C. Gourden, S. Battaglia, C. Charrier, B. Pitard, D. Heymann, F. Ré dini, Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3389–3398. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0497.
- [263] Y. Zheng, H. Zhou, C. Fong-Yee, J.R.K. Modzelewski, M.J. Seibel, C.R. Dunstan, Bone resorption increases tumour growth in a mouse model of osteosclerotic breast cancer metastasis, *Clin. Exp. Metastasis.* 25 (2008) 559–567. doi:10.1007/s10585-008-9172-4.
- [264] R.E. Miller, M. Roudier, J. Jones, A. Armstrong, J. Canon, W.C. Dougall, RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2160–2169. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0046.
- [265] R.E. Miller, J.C. Jones, M. Tometsko, M.L. Blake, W.C. Dougall, RANKL inhibition blocks osteolytic lesions and reduces skeletal tumor burden in models of non-small-cell lung cancer bone metastases, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer.* 9 (2014) 345–354. doi:10.1097/JTO.000000000000070.
- [266] K. Vanderkerken, E. De Leenheer, C. Shipman, K. Asosingh, A. Willems, B. Van Camp, P. Croucher, Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma, *Cancer Res.* 63 (2003) 287–289.
- [267] A. Lipton, K. Fizazi, A.T. Stopeck, D.H. Henry, M.R. Smith, N. Shore, M. Martin, S. Vadhan-Raj, J.E. Brown, G.E. Richardson, F. Saad, D.A. Yardley, K. Zhou, A. Balakumaran, A. Braun, Effect of denosumab versus zoledronic acid in preventing skeletal-related events in patients with bone metastases by baseline characteristics, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 53 (2016) 75–83. doi:10.1016/j.ejca.2015.09.011.
- [268] R. Cathomas, C. Rothermundt, B. Bode, B. Fuchs, R. von Moos, M. Schwitter, RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward?, *Oncology.* 88 (2015) 257–260. doi:10.1159/000369975.
- [269] E.B. Lewis, A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature.* 276 (1978) 565–570. doi:10.1038/276565a0.
- [270] W. McGinnis, M.S. Levine, E. Hafen, A. Kuroiwa, W.J. Gehring, A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes, *Nature.* 308 (1984) 428–433. doi:10.1038/308428a0.
- [271] W.J. Gehring, Homeo boxes in the study of development, *Science.* 236 (1987) 1245–1252.
- [272] W.J. Gehring, M. Müller, M. Affolter, A. Percival-Smith, M. Billeter, Y.Q. Qian, G. Otting, K. Wüthrich, The structure of the homeodomain and its functional implications, *Trends Genet. TIG.* 6 (1990) 323–329.
- [273] W.J. Gehring, Homeodomain proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 487–526. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.002415.
- [274] E.M. De Robertis, E.A. Morita, K.W. Cho, Gradient fields and homeobox genes, *Dev. Camb. Engl.* 112 (1991) 669–678.
- [275] L. Bally-Cuif, M. Wassef, Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 (1995) 450–458.

- [276] A.M. Holland, S. Garcia, G. Naselli, R.J. Macdonald, L.C. Harrison, The Parahox gene Pdx1 is required to maintain positional identity in the adult foregut, *Int. J. Dev. Biol.* 57 (2013) 391–398. doi:10.1387/ijdb.120048ah.
- [277] I. Vieille-Grosjean, P. Hunt, M. Gulisano, E. Boncinelli, P. Thorogood, Branchial HOX gene expression and human craniofacial development, *Dev. Biol.* 183 (1997) 49–60. doi:10.1006/dbio.1996.8450.
- [278] T. Shirasawa, K. Sakamoto, H. Tkahashi, Molecular cloning and evolutionary analysis of a mammalian homologue of the Distal-less 3 (Dlx-3) homeobox gene, *FEBS Lett.* 351 (1994) 380–384.
- [279] J.K. Liu, I. Ghattas, S. Liu, S. Chen, J.L. Rubenstein, Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 210 (1997) 498–512. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199712)210:4<498::AID-AJA12>3.0.CO;2-3.
- [280] T.R. Bürglin, M. Affolter, Homeodomain proteins: an update, *Chromosoma.* 125 (2016) 497–521. doi:10.1007/s00412-015-0543-8.
- [281] J.-C. Kaplan, *Biologie moléculaire et médecine, Collection De la biologie à la clinique, Flammarion médecine-sciences, Paris, 1993.*
- [282] M.I. Morasso, N.G. Markova, T.D. Sargent, Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene, *J. Cell Biol.* 135 (1996) 1879–1887.
- [283] H. Zhang, G. Hu, H. Wang, P. Scivolino, N. Iler, M.M. Shen, C. Abate-Shen, Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 2920–2932.
- [284] G. Vachon, B. Cohen, C. Pfeifle, M.E. McGuffin, J. Botas, S.M. Cohen, Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene Distal-less, *Cell.* 71 (1992) 437–450.
- [285] W.J. Bailey, J. Kim, G.P. Wagner, F.H. Ruddle, Phylogenetic reconstruction of vertebrate Hox cluster duplications, *Mol. Biol. Evol.* 14 (1997) 843–853.
- [286] R. Krumlauf, H. Marshall, M. Studer, S. Nonchev, M.H. Sham, A. Lumsden, Hox homeobox genes and regionalisation of the nervous system, *J. Neurobiol.* 24 (1993) 1328–1340. doi:10.1002/neu.480241006.
- [287] F. Apiou, D. Flagiello, C. Cillo, B. Malfoy, M.F. Poupon, B. Dutrillaux, Fine mapping of human HOX gene clusters, *Cytogenet. Cell Genet.* 73 (1996) 114–115.
- [288] D. Duboule, The function of Hox genes in the morphogenesis of the vertebrate limb, *Ann. Génétique.* 36 (1993) 24–29.
- [289] D. Duboule, G. Morata, Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes, *Trends Genet. TIG.* 10 (1994) 358–364.
- [290] S.B. Carroll, Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates, *Nature.* 376 (1995) 479–485. doi:10.1038/376479a0.
- [291] A.J. Durston, H.J. Jansen, P. In der Rieden, M.H.W. Hooiveld, Hox collinearity - a new perspective, *Int. J. Dev. Biol.* 55 (2011) 899–908. doi:10.1387/ijdb.113358ad.
- [292] D. Noordermeer, D. Duboule, Chromatin architectures and Hox gene collinearity, *Curr. Top. Dev. Biol.* 104 (2013) 113–148. doi:10.1016/B978-0-12-416027-9.00004-8.
- [293] A. Casaca, A.C. Santos, M. Mallo, Controlling Hox gene expression and activity to build the vertebrate axial skeleton, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 243 (2014) 24–36. doi:10.1002/dvdy.24007.
- [294] P.W.H. Holland, Evolution of homeobox genes, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2 (2013) 31–45. doi:10.1002/wdev.78.
- [295] P.W.H. Holland, H.A.F. Booth, E.A. Bruford, Classification and nomenclature of all human homeobox genes, *BMC Biol.* 5 (2007) 47. doi:10.1186/1741-7007-5-47.
- [296] D.W. Stock, D.L. Ellies, Z. Zhao, M. Ekker, F.H. Ruddle, K.M. Weiss, The evolution of the vertebrate Dlx gene family., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 10858–10863.
- [297] D.L. Ellies, D.W. Stock, G. Hatch, G. Giroux, K.M. Weiss, M. Ekker, Relationship between the genomic organization and the overlapping embryonic expression patterns of the zebrafish dlx genes, *Genomics.* 45 (1997) 580–590. doi:10.1006/geno.1997.4978.



- [298] M.J. Depew, C.A. Simpson, M. Morasso, J.L.R. Rubenstein, Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development, *J. Anat.* 207 (2005) 501–561. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00487.x.
- [299] K.M. Weiss, J. Bollekens, F.H. Ruddle, K. Takashita, Distal-less and other homeobox genes in the development of the dentition, *J. Exp. Zool.* 270 (1994) 273–284. doi:10.1002/jez.1402700306.
- [300] T. Zerucha, J.P. Muller, N. Chartrand, M. Ekker, Cross-interactions between two members of the Dlx family of homeobox-containing genes during zebrafish development, *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 75 (1997) 613–622.
- [301] T. Zerucha, T. Stühmer, G. Hatch, B.K. Park, Q. Long, G. Yu, A. Gambarotta, J.R. Schultz, J.L. Rubenstein, M. Ekker, A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20 (2000) 709–721.
- [302] A. Simeone, D. Acampora, M. Pannese, M. D’Esposito, A. Stornaiuolo, M. Gulisano, A. Mallamaci, K. Kastury, T. Druck, K. Huebner, Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 2250–2254.
- [303] T. McGuinness, M.H. Porteus, S. Smiga, A. Bulfone, C. Kingsley, M. Qiu, J.K. Liu, J.E. Long, D. Xu, J.L. Rubenstein, Sequence, organization, and transcription of the Dlx-1 and Dlx-2 locus, *Genomics.* 35 (1996) 473–485. doi:10.1006/geno.1996.0387.
- [304] S. Nakamura, D.W. Stock, K.L. Wydner, J.A. Bollekens, K. Takeshita, B.M. Nagai, S. Chiba, T. Kitamura, T.M. Freeland, Z. Zhao, J. Minowada, J.B. Lawrence, K.M. Weiss, F.H. Ruddle, Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: Dlx7, *Genomics.* 38 (1996) 314–324. doi:10.1006/geno.1996.0634.
- [305] L.M. Quinn, B.V. Johnson, J. Nicholl, G.R. Sutherland, B. Kalionis, Isolation and identification of homeobox genes from the human placenta including a novel member of the Distal-less family, DLX4, *Gene.* 187 (1997) 55–61.
- [306] J.A. Price, D.W. Bowden, J.T. Wright, M.J. Pettenati, T.C. Hart, Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 563–569.
- [307] K. Sumiyama, S.Q. Irvine, F.H. Ruddle, The role of gene duplication in the evolution and function of the vertebrate Dlx/distal-less bigene clusters, *J. Struct. Funct. Genomics.* 3 (2003) 151–159.
- [308] P. Kraus, V. Sivakamasundari, S.L. Lim, X. Xing, L. Lipovich, T. Lufkin, Making sense of Dlx1 anti-sense RNA, *Dev. Biol.* 376 (2013) 224–235. doi:10.1016/j.ydbio.2013.01.035.
- [309] E.G. Berghoff, M.F. Clark, S. Chen, I. Cajigas, D.E. Leib, J.D. Kohtz, Efv2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes, *Dev. Camb. Engl.* 140 (2013) 4407–4416. doi:10.1242/dev.099390.
- [310] M.H. Porteus, A. Bulfone, R.D. Ciaranello, J.L. Rubenstein, Isolation and characterization of a novel cDNA clone encoding a homeodomain that is developmentally regulated in the ventral forebrain, *Neuron.* 7 (1991) 221–229.
- [311] G.W. Robinson, K.A. Mahon, Differential and overlapping expression domains of Dlx-2 and Dlx-3 suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development, *Mech. Dev.* 48 (1994) 199–215. doi:10.1016/0925-4773(94)90060-4.
- [312] J.K. Liu, I. Ghattas, S. Liu, S. Chen, J.L. Rubenstein, Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 210 (1997) 498–512. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199712)210:4<498::AID-AJA12>3.0.CO;2-3.
- [313] H.M. Ryoo, H.M. Hoffmann, T. Beumer, B. Frenkel, D.A. Towler, G.S. Stein, J.L. Stein, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 11 (1997) 1681–1694. doi:10.1210/mend.11.11.0011.
- [314] P. Dollé, M. Price, D. Duboule, Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development, *Differ. Res. Biol. Divers.* 49 (1992) 93–99.
- [315] A. Bulfone, H.-J. Kim, L. Puelles, M.H. Porteus, J.F. Grippo, J.L.R. Rubenstein, The mouse Dlx-2 (Tes-1) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos, *Mech. Dev.* 40 (1993) 129–140. doi:10.1016/0925-4773(93)90071-5.

- [316] P.T. Sharpe, Homeobox genes and orofacial development, *Connect. Tissue Res.* 32 (1995) 17–25.
- [317] M. Qiu, A. Bulfone, S. Martinez, J.J. Meneses, K. Shimamura, R.A. Pedersen, J.L. Rubenstein, Null mutation of *Dlx-2* results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain, *Genes Dev.* 9 (1995) 2523–2538.
- [318] M. Qiu, A. Bulfone, I. Ghattas, J.J. Meneses, L. Christensen, P.T. Sharpe, R. Presley, R.A. Pedersen, J.L. Rubenstein, Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches, *Dev. Biol.* 185 (1997) 165–184. doi:10.1006/dbio.1997.8556.
- [319] D. Ferrari, L. Sumoy, J. Gannon, H. Sun, A.M. Brown, W.B. Upholt, R.A. Kosher, The expression pattern of the Distal-less homeobox-containing gene *Dlx-5* in the developing chick limb bud suggests its involvement in apical ectodermal ridge activity, pattern formation, and cartilage differentiation, *Mech. Dev.* 52 (1995) 257–264.
- [320] D. Ferrari, A. Harrington, C.N. Dealy, R.A. Kosher, *Dlx-5* in limb initiation in the chick embryo, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 216 (1999) 10–15. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<10::AID-DVDY3>3.0.CO;2-A.
- [321] B.L. Thomas, A.S. Tucker, M. Qui, C.A. Ferguson, Z. Hardcastle, J.L. Rubenstein, P.T. Sharpe, Role of *Dlx-1* and *Dlx-2* genes in patterning of the murine dentition, *Dev. Camb. Engl.* 124 (1997) 4811–4818.
- [322] J.L. Davideau, P. Demri, D. Hotton, T.T. Gu, M. MacDougall, P. Sharpe, N. Forest, A. Berdal, Comparative study of *MSX-2*, *DLX-5*, and *DLX-7* gene expression during early human tooth development, *Pediatr. Res.* 46 (1999) 650–656.
- [323] J.L. Davideau, P. Demri, T.T. Gu, D. Simmons, C. Nessman, N. Forest, M. MacDougall, A. Berdal, Expression of *DLX5* during human embryonic craniofacial development, *Mech. Dev.* 81 (1999) 183–186.
- [324] F. Lézot, J.L. Davideau, B. Thomas, P. Sharpe, N. Forest, A. Berdal, Epithelial *Dlx-2* homeogene expression and cementogenesis, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 48 (2000) 277–284.
- [325] G.R. Merlo, B. Zerega, L. Paleari, S. Trombino, S. Mantero, G. Levi, Multiple functions of *Dlx* genes, *Int. J. Dev. Biol.* 44 (2000) 619–626.
- [326] G. Panganiban, J.L.R. Rubenstein, Developmental functions of the Distal-less/*Dlx* homeobox genes, *Dev. Camb. Engl.* 129 (2002) 4371–4386.
- [327] A.J. Bendall, C. Abate-Shen, Roles for *Msx* and *Dlx* homeoproteins in vertebrate development, *Gene.* 247 (2000) 17–31.
- [328] D.E. Clouthier, S.C. Williams, H. Yanagisawa, M. Wieduwilt, J.A. Richardson, M. Yanagisawa, Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice, *Dev. Biol.* 217 (2000) 10–24. doi:10.1006/dbio.1999.9527.
- [329] M.T. Cobourne, P.T. Sharpe, Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch, *Arch. Oral Biol.* 48 (2003) 1–14.
- [330] L.-B. Ruest, X. Xiang, K.-C. Lim, G. Levi, D.E. Clouthier, Endothelin-A receptor-dependent and -independent signaling pathways in establishing mandibular identity, *Dev. Camb. Engl.* 131 (2004) 4413. doi:10.1242/dev.01291.
- [331] A. Tucker, P. Sharpe, The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth, *Nat. Rev. Genet.* 5 (2004) 499–508. doi:10.1038/nrg1380.
- [332] M. Minoux, F.M. Rijli, Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development, *Dev. Camb. Engl.* 137 (2010) 2605–2621. doi:10.1242/dev.040048.
- [333] K.M. Pineault, D.M. Wellik, Hox genes and limb musculoskeletal development, *Curr. Osteoporos. Rep.* 12 (2014) 420–427. doi:10.1007/s11914-014-0241-0.
- [334] G. Levi, S. Mantero, O. Barbieri, D. Cantatore, L. Paleari, A. Beverdam, F. Genova, B. Robert, G.R. Merlo, *Msx1* and *Dlx5* act independently in development of craniofacial skeleton, but converge on the regulation of *Bmp* signaling in palate formation, *Mech. Dev.* 123 (2006) 3–16. doi:10.1016/j.mod.2005.10.007.
- [335] I.-H. Chung, J. Han, J. Iwata, Y. Chai, *Msx1* and *Dlx5* function synergistically to regulate frontal bone development, *Genes. N. Y. N* 2000. 48 (2010) 645–655. doi:10.1002/dvg.20671.

- [336] M. Vieux-Rochas, K. Bouhali, S. Mantero, G. Garaffo, P. Provero, S. Astigiano, O. Barbieri, M.F. Caratozzolo, A. Tullo, L. Guerrini, Y. Lallemand, B. Robert, G. Levi, G.R. Merlo, BMP-Mediated Functional Cooperation between Dlx5/Dlx6 and Msx1/Msx2 during Mammalian Limb Development, *PLOS ONE*. 8 (2013) e51700. doi:10.1371/journal.pone.0051700.
- [337] Lézot, B. Thomas, S.R. Greene, D. Hotton, Z.-A. Yuan, B. Castaneda, A. Bolaños, M. Depew, P. Sharpe, C.W. Gibson, A. Berdal, Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation, *J. Cell. Physiol.* 216 (2008) 688–697. doi:10.1002/jcp.21448.
- [338] J. Jeong, J. Cesario, Y. Zhao, L. Burns, H. Westphal, J.L.R. Rubenstein, Cleft palate defect of Dlx1/2-/- mutant mice is caused by lack of vertical outgrowth in the posterior palate, *Dev. Dyn.* 241 (2012) 1757–1769. doi:10.1002/dvdy.23867.
- [339] A. Beverdam, G.R. Merlo, L. Paleari, S. Mantero, F. Genova, O. Barbieri, P. Janvier, G. Levi, Jaw transformation with gain of symmetry after Dlx5/Dlx6 inactivation: mirror of the past?, *Genes. N. Y. N* 2000. 34 (2002) 221–227. doi:10.1002/gene.10156.
- [340] R.F. Robledo, L. Rajan, X. Li, T. Lufkin, The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development, *Genes Dev.* 16 (2002) 1089–1101. doi:10.1101/gad.988402.
- [341] P. Kraus, T. Lufkin, Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development, *Am. J. Med. Genet. A*. 140A (2006) 1366–1374. doi:10.1002/ajmg.a.31252.
- [342] A.J. Bendall, Direct evidence of allele equivalency at the Dlx5/6 locus, *Genesis*. 54 (2016) 272–276. doi:10.1002/dvg.22934.
- [343] J.W. Vincentz, J.J. Casasnovas, R.M. Barnes, J. Que, D.E. Clouthier, J. Wang, A.B. Firulli, Exclusion of Dlx5/6 expression from the distal-most mandibular arches enables BMP-mediated specification of the distal cap, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 7563–7568. doi:10.1073/pnas.1603930113.
- [344] F. Lézot, B.L. Thomas, C. Blin-Wakkach, B. Castaneda, A. Bolanos, D. Hotton, P.T. Sharpe, D. Heymann, G.F. Carles, A.E. Grigoriadis, A. Berdal, Dlx homeobox gene family expression in osteoclasts, *J. Cell. Physiol.* 223 (2010) 779–787. doi:10.1002/jcp.22095.
- [345] K. Sumiyama, F.H. Ruddle, Regulation of Dlx3 gene expression in visceral arches by evolutionarily conserved enhancer elements, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 4030–4034. doi:10.1073/pnas.0530119100.
- [346] G.R. Merlo, L. Paleari, S. Mantero, B. Zerega, M. Adamska, S. Rinkwitz, E. Bober, G. Levi, The Dlx5 homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway, *Dev. Biol.* 248 (2002) 157–169.
- [347] N. Samee, V. Geoffroy, C. Marty, C. Schiltz, M. Vieux-Rochas, G. Levi, M.-C. de Vernejoul, Dlx5, a Positive Regulator of Osteoblastogenesis, is Essential for Osteoblast-Osteoclast Coupling, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 773–780. doi:10.2353/ajpath.2008.080243.
- [348] J.A. Price, J.T. Wright, K. Kula, D.W. Bowden, T.C. Hart, A common DLX3 gene mutation is responsible for tricho-dento-osseous syndrome in Virginia and North Carolina families, *J. Med. Genet.* 35 (1998) 825–828.
- [349] H.E. Shamseldin, M.A. Faden, W. Alashram, F.S. Alkuraya, Identification of a novel DLX5 mutation in a family with autosomal recessive split hand and foot malformation, *J. Med. Genet.* 49 (2012) 16–20. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100556.
- [350] A. Sowińska-Seidler, M. Socha, A. Jamsheer, Split-hand/foot malformation - molecular cause and implications in genetic counseling, *J. Appl. Genet.* 55 (2014) 105–115. doi:10.1007/s13353-013-0178-5.
- [351] X. Wang, Q. Xin, L. Li, J. Li, C. Zhang, R. Qiu, C. Qian, H. Zhao, Y. Liu, S. Shan, J. Dang, X. Bian, C. Shao, Y. Gong, Q. Liu, Exome sequencing reveals a heterozygous DLX5 mutation in a Chinese family with autosomal-dominant split-hand/foot malformation, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 22 (2014) 1105–1110. doi:10.1038/ejhg.2014.7.
- [352] J. Dai, J. Si, X. Zhu, L. Zhang, D. Wu, J. Lu, N. Ouyang, X. Wang, G. Shen, Overexpression of Dlx2 leads to postnatal condyle degradation, *Mol. Med. Rep.* 14 (2016) 1624–1630. doi:10.3892/mmr.2016.5406.
- [353] S.J. Choi, G.D. Roodman, J.Q. Feng, I.S. Song, K. Amin, P.S. Hart, J.T. Wright, N. Haruyama, T.C. Hart, In vivo impact of a 4 bp deletion mutation in the DLX3 gene on bone development, *Dev. Biol.* 325 (2009) 129–137. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.014.

- [354] S.J. Choi, I.S. Song, J.Q. Feng, T. Gao, N. Haruyama, P. Gautam, P.G. Robey, T.C. Hart, Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation, *Dev. Biol.* 344 (2010) 682–692. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.499.
- [355] O. Duverger, A. Zah, J. Isaac, H.-W. Sun, A.K. Bartels, J.B. Lian, A. Berdal, J. Hwang, M.I. Morasso, Neural crest deletion of *Dlx3* leads to major dentin defects through down-regulation of *Dspg*, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 12230–12240. doi:10.1074/jbc.M111.326900.
- [356] O. Duverger, J. Isaac, A. Zah, J. Hwang, A. Berdal, J.B. Lian, M.I. Morasso, In vivo impact of *Dlx3* conditional inactivation in neural crest-derived craniofacial bones, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 654–664. doi:10.1002/jcp.24175.
- [357] J. Isaac, J. Erthal, J. Gordon, O. Duverger, H.-W. Sun, A.C. Lichtler, G.S. Stein, J.B. Lian, M.I. Morasso, *DLX3* regulates bone mass by targeting genes supporting osteoblast differentiation and mineral homeostasis in vivo, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 1365–1376. doi:10.1038/cdd.2014.82.
- [358] C. Blin-Wakkach, F. Lezot, S. Ghouli-Mazgar, D. Hotton, S. Monteiro, C. Teillaud, L. Pibouin, S. Orestes-Cardoso, P. Papagerakis, M. Macdougall, B. Robert, A. Berdal, Endogenous *Msx1* anti-sense transcript: In vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 7336–7341. doi:10.1073/pnas.131497098.
- [359] N. Holleville, S. Matéos, M. Bontoux, K. Bollerot, A. Monsoro-Burq, *Dlx5* drives *Runx2* expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme, *Dev. Biol.* 304 (2007) 860–874. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.003.
- [360] H. Hojo, S. Ohba, X. He, L.P. Lai, A.P. McMahon, *Sp7/Osterix* Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a *Dlx* Co-factor in Osteoblast Specification, *Dev. Cell.* 37 (2016) 238–253. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.002.
- [361] J. Park, K. Park, S. Kim, J.-H. Lee, *Msx1* Gene Overexpression Induces G1 Phase Cell Arrest in Human Ovarian Cancer Cell Line OVCAR3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 (2001) 1234–1240. doi:10.1006/bbrc.2001.4474.
- [362] J. Hwang, T. Mehrani, S.E. Millar, M.I. Morasso, *Dlx3* is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling, *Dev. Camb. Engl.* 135 (2008) 3149–3159. doi:10.1242/dev.022202.
- [363] Z.-H. Yan, Z.-S. Bao, W. Yan, Y.-W. Liu, C.-B. Zhang, H.-J. Wang, Y. Feng, Y.-Z. Wang, W. Zhang, G. You, Q.-G. Zhang, T. Jiang, Upregulation of *DLX2* confers a poor prognosis in glioblastoma patients by inducing a proliferative phenotype, *Curr. Mol. Med.* 13 (2013) 438–445.
- [364] Y. Masuda, A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda, K. Watanabe, *Dlxin-1*, a novel protein that binds *Dlx5* and regulates its transcriptional function, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5331–5338. doi:10.1074/jbc.M008590200.
- [365] A. Sasaki, Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda, K. Watanabe, A RING finger protein *Praja1* regulates *Dlx5*-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the *Dlx/Msx*-interacting *MAGE/Necdin* family protein, *Dlxin-1*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22541–22546. doi:10.1074/jbc.M109728200.
- [366] T. Kuwajima, I. Nishimura, K. Yoshikawa, *Necdin* promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with *Dlx* homeodomain proteins, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26 (2006) 5383–5392. doi:10.1523/JNEUROSCI.1262-06.2006.
- [367] M.Q. Hassan, R.S. Tare, S.H. Lee, M. Mandeville, M.I. Morasso, A. Javed, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, *BMP2* commitment to the osteogenic lineage involves activation of *Runx2* by *DLX3* and a homeodomain transcriptional network, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 40515–40526. doi:10.1074/jbc.M604508200.
- [368] F. Lézot, V. Descroix, M. Mesbah, D. Hotton, C. Blin, P. Papagerakis, N. Mauro, S. Kato, M. MacDougall, P. Sharpe, A. Berdal, Cross-talk between *Msx/Dlx* homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization, *Connect. Tissue Res.* 43 (2002) 509–514.
- [369] S.C. Xu, M.A. Harris, J.L. Rubenstein, G.R. Mundy, S.E. Harris, Bone morphogenetic protein-2 (*BMP-2*) signaling to the *Col2alpha1* gene in chondroblasts requires the homeobox gene *Dlx-2*, *DNA Cell Biol.* 20 (2001) 359–365. doi:10.1089/10445490152122479.
- [370] F. Lézot, B. Thomas, D. Hotton, N. Forest, S. Orestes-Cardoso, B. Robert, P. Sharpe, A. Berdal, Biomineralization, life-time of odontogenic cells and differential expression of the two homeobox genes *MSX-1* and *DLX-2* in transgenic mice, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 430–441. doi:10.1359/jbmr.2000.15.3.430.

- [371] S.E. Harris, D. Guo, M.A. Harris, A. Krishnaswamy, A. Lichtler, Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8 (2003) s1249-1265.
- [372] S. Ghoul-Mazgar, D. Hotton, F. Lézet, C. Blin-Wakkach, A. Asselin, J.-M. Sautier, A. Berdal, Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues, *Bone*. 37 (2005) 799–809. doi:10.1016/j.bone.2005.03.020.
- [373] N. Samee, M.-C. de Vernejoul, G. Levi, Role of DLX regulatory proteins in osteogenesis and chondrogenesis, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 17 (2007) 173–186.
- [374] N. Samee, V. Geoffroy, C. Marty, C. Schiltz, M. Vieux-Rochas, P. Clément-Lacroix, C. Belleville, G. Levi, M.-C. de Vernejoul, Increased bone resorption and osteopenia in Dlx5 heterozygous mice, *J. Cell. Biochem.* 107 (2009) 865–872. doi:10.1002/jcb.22188.
- [375] A. Berdal, M. Molla, D. Hotton, M. Aïoub, F. Lézet, J.-R. Néfussi, G. Goubin, Differential impact of MSX1 and MSX2 homeogenes on mouse maxillofacial skeleton, *Cells Tissues Organs*. 189 (2009) 126–132. doi:10.1159/000154271.
- [376] S.C.F. Rawlinson, I.J. McKay, M. Ghuman, C. Wellmann, P. Ryan, S. Prajaneh, G. Zaman, F.J. Hughes, V.J. Kingsmill, Adult rat bones maintain distinct regionalized expression of markers associated with their development, *PLoS One*. 4 (2009) e8358. doi:10.1371/journal.pone.0008358.
- [377] H. Zhu, A.J. Bendall, Dlx5 is a cell autonomous regulator of chondrocyte hypertrophy in mice and functionally substitutes for Dlx6 during endochondral ossification, *PLoS One*. 4 (2009) e8097. doi:10.1371/journal.pone.0008097.
- [378] G. Levi, Y. Gitton, Dlx genes and the maintenance of bone homeostasis and skeletal integrity, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 1345–1346. doi:10.1038/cdd.2014.94.
- [379] M.Q. Hassan, A. Javed, M.I. Morasso, J. Karlin, M. Montecino, A.J. van Wijnen, G.S. Stein, J.L. Stein, J.B. Lian, Dlx3 Transcriptional Regulation of Osteoblast Differentiation: Temporal Recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 Homeodomain Proteins to Chromatin of the Osteocalcin Gene, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 9248–9261. doi:10.1128/MCB.24.20.9248-9261.2004.
- [380] G. Levi, Y. Gitton, Dlx genes and the maintenance of bone homeostasis and skeletal integrity, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 1345–1346. doi:10.1038/cdd.2014.94.
- [381] M.Q. Hassan, S. Saini, J.A.R. Gordon, A.J. van Wijnen, M. Montecino, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, Molecular Switches Involving Homeodomain Proteins, HOXA10 and RUNX2 Regulate Osteoblastogenesis, *Cells Tissues Organs*. 189 (2008) 122–125. doi:10.1159/000151453.
- [382] M. Dodig, M.S. Kronenberg, A. Bedalov, B.E. Kream, G. Gronowicz, S.H. Clark, K. Mack, Y.H. Liu, R. Maxon, Z.Z. Pan, W.B. Upholt, D.W. Rowe, A.C. Lichtler, Identification of a TAAT-containing motif required for high level expression of the COL1A1 promoter in differentiated osteoblasts of transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 16422–16429.
- [383] M.D. Benson, J.L. Bargeon, G. Xiao, P.E. Thomas, A. Kim, Y. Cui, R.T. Franceschi, Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13907–13917.
- [384] T. Tadić, I. Erceg, M.L. Stover, D.W. Rowe, A.C. Lichtler, Dlx5 induces expression of COL1A1 promoter contained in a retrovirus vector, *Croat. Med. J.* 42 (2001) 436–439.
- [385] M.-H. Lee, T.-G. Kwon, H.-S. Park, J.M. Wozney, H.-M. Ryoo, BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 689–694.
- [386] T. Tadic, M. Dodig, I. Erceg, I. Marijanovic, M. Mina, Z. Kalajzic, D. Velonis, M.S. Kronenberg, R.A. Kosher, D. Ferrari, A.C. Lichtler, Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17 (2002) 1008–1014. doi:10.1359/jbmr.2002.17.6.1008.
- [387] M.J. Depew, J.K. Liu, J.E. Long, R. Presley, J.J. Meneses, R.A. Pedersen, J.L. Rubenstein, Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules, *Dev. Camb. Engl.* 126 (1999) 3831–3846.
- [388] J.A. Feledy, M.I. Morasso, S.I. Jang, T.D. Sargent, Transcriptional activation by the homeodomain protein distal-less 3, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 764–770.
- [389] K. Miyama, G. Yamada, T.S. Yamamoto, C. Takagi, K. Miyado, M. Sakai, N. Ueno, H. Shibuya, A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction, *Dev. Biol.* 208 (1999) 123–133. doi:10.1006/dbio.1998.9197.

- [390] G.-Q. Zhao, S. Zhao, X. Zhou, H. Eberspaecher, M. Solursh, B. de Crombrughe, rDlx, a Novel Distal-less-like Homeoprotein Is Expressed in Developing Cartilages and Discrete Neuronal Tissues, *Dev. Biol.* 164 (1994) 37–51. doi:10.1006/dbio.1994.1178.
- [391] X. Chen, X. Li, W. Wang, T. Lufkin, Dlx5 and Dlx6: an evolutionary conserved pair of murine homeobox genes expressed in the embryonic skeleton, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 785 (1996) 38–47.
- [392] T. Kobayashi, K.M. Lyons, A.P. McMahon, H.M. Kronenberg, BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 18023–18027. doi:10.1073/pnas.0503617102.
- [393] M.B. Goldring, K. Tsuchimochi, K. Ijiri, The control of chondrogenesis, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 33–44. doi:10.1002/jcb.20652.
- [394] B. Lanske, A.C. Karaplis, K. Lee, A. Luz, A. Vortkamp, A. Pirro, M. Karperien, L.H. Defize, C. Ho, R.C. Mulligan, A.B. Abou-Samra, H. Jüppner, G.V. Segre, H.M. Kronenberg, PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth, *Science*. 273 (1996) 663–666.
- [395] A. Vortkamp, K. Lee, B. Lanske, G.V. Segre, H.M. Kronenberg, C.J. Tabin, Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein, *Science*. 273 (1996) 613–622.
- [396] H. Zou, R. Wieser, J. Massagué, L. Niswander, Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage, *Genes Dev.* 11 (1997) 2191–2203.
- [397] A.M. Ashique, K. Fu, J.M. Richman, Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo, *Int. J. Dev. Biol.* 46 (2002) 243–253. doi:10.1387/ijdb.011535.
- [398] G. Hu, H. Lee, S.M. Price, M.M. Shen, C. Abate-Shen, Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1, *Dev. Camb. Engl.* 128 (2001) 2373–2384.
- [399] S.J. Odelberg, A. Kollhoff, M.T. Keating, Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1, *Cell*. 103 (2000) 1099–1109.
- [400] A.J. Bendall, G. Hu, G. Levi, C. Abate-Shen, Dlx5 regulates chondrocyte differentiation at multiple stages, *Int. J. Dev. Biol.* 47 (2003) 335–344.
- [401] F. Otto, A.P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K.C. Gilmour, I.R. Rosewell, G.W. Stamp, R.S. Bedington, S. Mundlos, B.R. Olsen, P.B. Selby, M.J. Owen, Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development, *Cell*. 89 (1997) 765–771.
- [402] K. Nakashima, B. de Crombrughe, Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation, *Trends Genet. TIG.* 19 (2003) 458–466. doi:10.1016/S0168-9525(03)00176-8.
- [403] H.-J. Chin, M.C. Fisher, Y. Li, D. Ferrari, C.-K.L. Wang, A.C. Lichtler, C.N. Dealy, R.A. Koser, Studies on the role of Dlx5 in regulation of chondrocyte differentiation during endochondral ossification in the developing mouse limb, *Dev. Growth Differ.* 49 (2007) 515–521. doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00940.x.
- [404] M.A. Crackower, S.W. Scherer, J.M. Rommens, C.C. Hui, P. Poorkaj, S. Soder, J.M. Cobben, L. Hudgins, J.P. Evans, L.C. Tsui, Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 571–579.
- [405] K. Takahashi, G. h. Nuckolls, I. Takahashi, K. Nonaka, M. Nagata, T. Ikura, H. c. Slavkin, L. Shum, Msx2 is a repressor of chondrogenic differentiation in migratory cranial neural crest cells<sup>†</sup>, *Dev. Dyn.* 222 (2001) 252–262. doi:10.1002/dvdy.1185.
- [406] D.A. Towler, S.J. Rutledge, G.A. Rodan, Msx-2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 8 (1994) 1484–1493. doi:10.1210/mend.8.11.7877617.
- [407] H.M. Hoffmann, K.M. Catron, A.J. van Wijnen, L.R. McCabe, J.B. Lian, G.S. Stein, J.L. Stein, Transcriptional control of the tissue-specific, developmentally regulated osteocalcin gene requires a binding motif for the Msx family of homeodomain proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 12887–12891.
- [408] I. Satokata, L. Ma, H. Ohshima, M. Bei, I. Woo, K. Nishizawa, T. Maeda, Y. Takano, M. Uchiyama, S. Heaney, H. Peters, Z. Tang, R. Maxson, R. Maas, Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation, *Nat. Genet.* 24 (2000) 391–395. doi:10.1038/74231.

- [409] K. Amano, F. Ichida, A. Sugita, K. Hata, M. Wada, Y. Takigawa, M. Nakanishi, M. Kogo, R. Nishimura, T. Yoneda, MSX2 stimulates chondrocyte maturation by controlling *Ihh* expression, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29513–29521. doi:10.1074/jbc.M803681200.
- [410] S. Orestes-Cardoso, J.R. Nefussi, F. Lezot, M. Oboeuf, M. Pereira, M. Mesbah, B. Robert, A. Berdal, *Msx1* is a regulator of bone formation during development and postnatal growth: in vivo investigations in a transgenic mouse model, *Connect. Tissue Res.* 43 (2002) 153–160.
- [411] M. Aïoub, F. Lézot, M. Molla, B. Castaneda, B. Robert, G. Goubin, J.R. Néfussi, A. Berdal, *Msx2* *-/-* transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis, *Bone.* 41 (2007) 851–859. doi:10.1016/j.bone.2007.07.023.
- [412] X. Liu, N. Novosedlik, A. Wang, M.L. Hudson, I.L. Cohen, A.E. Chudley, C.J. Forster-Gibson, S.M.E. Lewis, J.J.A. Holden, The *DLX1* and *DLX2* genes and susceptibility to autism spectrum disorders, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 17 (2009) 228–235. doi:10.1038/ejhg.2008.148.
- [413] J. Dong, D. Amor, M.J. Aldred, T. Gu, M. Escamilla, M. MacDougall, *DLX3* mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism, *Am. J. Med. Genet. A.* 133A (2005) 138–141. doi:10.1002/ajmg.a.30521.
- [414] J.T. Wright, S.P. Hong, D. Simmons, B. Daly, D. Uebelhart, H.U. Luder, *DLX3* c.561\_562delCT mutation causes attenuated phenotype of tricho-dento-osseous syndrome, *Am. J. Med. Genet. A.* 146A (2008) 343–349. doi:10.1002/ajmg.a.32132.
- [415] D. Wu, S. Mandal, A. Choi, A. Anderson, M. Prochazkova, H. Perry, V.L. Gil-Da-Silva-Lopes, R. Lao, E. Wan, P.L.-F. Tang, P. Kwok, O. Klein, B. Zhuan, A.M. Slavotinek, *DLX4* is associated with orofacial clefting and abnormal jaw development, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 4340–4352. doi:10.1093/hmg/ddv167.
- [416] T. Shimamoto, S. Nakamura, J. Bollekens, F.H. Ruddle, K. Takeshita, Inhibition of *DLX-7* homeobox gene causes decreased expression of *GATA-1* and *c-myc* genes and apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 3245–3249.
- [417] S.B. Haga, S. Fu, J.E. Karp, D.D. Ross, D.M. Williams, W.D. Hankins, F. Behm, F.W. Ruscetti, M. Chang, B.D. Smith, D. Becton, S.C. Raimondi, P.E. Berg, *BP1*, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias, *Leukemia.* 14 (2000) 1867–1875.
- [418] N. Ferrari, G.L. Palmisano, L. Paleari, G. Basso, M. Mangioni, V. Fidanza, A. Albini, C.M. Croce, G. Levi, C. Brigati, *DLX* genes as targets of ALL-1: *DLX 2,3,4* down-regulation in t(4;11) acute lymphoblastic leukemias, *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 302–305.
- [419] M. Yu, Y. Yang, R.-F. Niu, Y.-R. Shi, X.-Y. Wei, L. Zhang, D.-F. Wang, [Clinicopathological significance of homeobox gene *BP1* mRNA expression in human breast cancer], *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer.* 23 (2004) 855–859.
- [420] M. Campo Dell’Orto, B. Banelli, E. Giarin, B. Accordi, L. Trentin, M. Romani, G. te Kronnie, G. Basso, Down-regulation of *DLX3* expression in *MLL-AF4* childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation, *Oncol. Rep.* 18 (2007) 417–423.
- [421] R.T. Awwad, K. Do, H. Stevenson, S.W. Fu, F. Lo-Coco, M. Costello, C.L. Campbell, P.E. Berg, Overexpression of *BP1*, a homeobox gene, is associated with resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells, *Ann. Hematol.* 87 (2008) 195–203. doi:10.1007/s00277-007-0402-7.
- [422] Y. Tan, R.A. Timakhov, M. Rao, D.A. Altomare, J. Xu, Z. Liu, Q. Gao, S.C. Jhanwar, A. Di Cristofano, D.L. Wiest, J.E. Knepper, J.R. Testa, A novel recurrent chromosomal inversion implicates the homeobox gene *Dlx5* in T-cell lymphomas from *Lck-Akt2* transgenic mice, *Cancer Res.* 68 (2008) 1296–1302. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3218.
- [423] J. Xu, J.R. Testa, *DLX5* (distal-less homeobox 5) promotes tumor cell proliferation by transcriptionally regulating *MYC*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 20593–20601. doi:10.1074/jbc.M109.021477.
- [424] J. Starkova, S. Gadgil, Y.H. Qiu, N. Zhang, I. Hermanova, S.M. Kornblau, H.A. Drabkin, Up-regulation of homeodomain genes, *DLX1* and *DLX2*, by *FLT3* signaling, *Haematologica.* 96 (2011) 820–828. doi:10.3324/haematol.2010.031179.
- [425] S.W. Fu, A. Schwartz, H. Stevenson, J.J. Pinzone, G.J. Davenport, J.M. Orenstein, P. Gutierrez, S.J. Simmens, J. Abraham, I. Poola, D.A. Stephan, P.E. Berg, Correlation of expression of *BP1*, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer, *Breast Cancer Res. BCR.* 5 (2003) R82-87. doi:10.1186/bcr602.

- [426] P.J. Neufing, B. Kalionis, D.J. Horsfall, C. Ricciardelli, J. Stahl, S. Vivekanandan, W. Raymond, W.D. Tilley, Expression and localization of homeodomain proteins DLX4/HB9 in normal and malignant human breast tissues, *Anticancer Res.* 23 (2003) 1479–1488.
- [427] L.R. Cavalli, Y.-G. Man, A.M. Schwartz, J.D. Rone, Y. Zhang, C.A. Urban, R.S. Lima, B.R. Haddad, P.E. Berg, Amplification of the BP1 homeobox gene in breast cancer, *Cancer Genet. Cytogenet.* 187 (2008) 19–24. doi:10.1016/j.cancergencyto.2008.07.004.
- [428] Y.-G. Man, A. Schwartz, P.H. Levine, C. Teal, P.E. Berg, BP1, a putative signature marker for inflammatory breast cancer and tumor aggressiveness, *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers.* 5 (2009) 9–17. doi:10.3233/CBM-2009-0563.
- [429] Y. Song, C. Dang, Y. Fu, Y. Lian, J. Hottel, X. Li, T. McCaffrey, S.W. Fu, Genome-wide analysis of BP1 transcriptional targets in breast cancer cell line Hs578T, *Int. J. Biol. Sci.* 5 (2009) 1–12.
- [430] M. Morini, S. Astigiano, Y. Gitton, L. Emionite, V. Mirisola, G. Levi, O. Barbieri, Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231, *BMC Cancer.* 10 (2010) 649. doi:10.1186/1471-2407-10-649.
- [431] L. Zhang, M. Yang, L. Gan, T. He, X. Xiao, M.D. Stewart, X. Liu, L. Yang, T. Zhang, Y. Zhao, J. Fu, DLX4 upregulates TWIST and enhances tumor migration, invasion and metastasis, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 1178–1187. doi:10.7150/ijbs.4458.
- [432] Y. Xian, C. Dang, C. Yan, H. Li, S.W. Fu, Z. Wang, [Clinicopathological significance of homeobox BP1 mRNA expression in lung cancer tissue], *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 26 (2006) 1173–1175.
- [433] S. Tomida, K. Yanagisawa, K. Koshikawa, Y. Yatabe, T. Mitsudomi, H. Osada, T. Takahashi, Identification of a metastasis signature and the DLX4 homeobox protein as a regulator of metastasis by combined transcriptome approach, *Oncogene.* 26 (2007) 4600–4608. doi:10.1038/sj.onc.1210242.
- [434] T. Kato, N. Sato, A. Takano, M. Miyamoto, H. Nishimura, E. Tsuchiya, S. Kondo, Y. Nakamura, Y. Daigo, Activation of placenta-specific transcription factor distal-less homeobox 5 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14 (2008) 2363–2370. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1523.
- [435] M. Cantile, A. Kisslinger, L. Cindolo, G. Schiavo, V. D’Antò, R. Franco, V. Altieri, A. Gallo, A. Villacci, D. Tramontano, C. Cillo, cAMP induced modifications of HOX D gene expression in prostate cells allow the identification of a chromosomal area involved in vivo with neuroendocrine differentiation of human advanced prostate cancers, *J. Cell. Physiol.* 205 (2005) 202–210. doi:10.1002/jcp.20384.
- [436] A.M. Schwartz, Y.-G. Man, M.K. Rezaei, S.J. Simmens, P.E. Berg, BP1, a homeoprotein, is significantly expressed in prostate adenocarcinoma and is concordant with prostatic intraepithelial neoplasia, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 22 (2009) 1–6. doi:10.1038/modpathol.2008.168.
- [437] P. Hollington, P. Neufing, B. Kalionis, P. Waring, J. Bentel, D. Wattchow, W.D. Tilley, Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues, *Anticancer Res.* 24 (2004) 955–962.
- [438] A.P. Dodds, S.A. Cox, C.A. Suggs, C. Boyd, R. Ruiz, T.C. Hart, J.T. Wright, Characterization and mRNA expression in an unusual odontogenic lesion in a patient with tricho-dento-osseous syndrome, *Histol. Histopathol.* 18 (2003) 849–854.
- [439] B. Ruhin-Poncet, S. Ghouli-Mazgar, D. Hotton, F. Capron, M.H. Jaafoura, G. Goubin, A. Berdal, Msx and dlx homeogene expression in epithelial odontogenic tumors, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 57 (2009) 69–78. doi:10.1369/jhc.2008.951707.
- [440] Z.-H. Yan, Z.-S. Bao, W. Yan, Y.-W. Liu, C.-B. Zhang, H.-J. Wang, Y. Feng, Y.-Z. Wang, W. Zhang, G. You, Q.-G. Zhang, T. Jiang, Upregulation of DLX2 confers a poor prognosis in glioblastoma patients by inducing a proliferative phenotype, *Curr. Mol. Med.* 13 (2013) 438–445.
- [441] G.E. Lind, R.I. Skotheim, M.F. Fraga, V.M. Abeler, M. Esteller, R.A. Lothe, Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1), *J. Pathol.* 210 (2006) 441–449. doi:10.1002/path.2064.
- [442] M.S. Roberson, S. Meermann, M.I. Morasso, J.M. Mulvaney-Musa, T. Zhang, A role for the homeobox protein Distal-less 3 in the activation of the glycoprotein hormone alpha subunit gene in choriocarcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10016–10024. doi:10.1074/jbc.M007481200.



- [443] L. Peng, Y. Huang, F. Jin, S.-W. Jiang, A.H. Payne, Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the Type I human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 18 (2004) 2049–2060. doi:10.1210/me.2004-0028.
- [444] Y. Sun, X. Lu, L. Yin, F. Zhao, Y. Feng, Inhibition of DLX4 promotes apoptosis in choriocarcinoma cell lines, *Placenta*. 27 (2006) 375–383. doi:10.1016/j.placenta.2005.03.007.
- [445] F. Hara, S. Samuel, J. Liu, D. Rosen, R.R. Langley, H. Naora, A homeobox gene related to *Drosophila* distal-less promotes ovarian tumorigenicity by inducing expression of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2, *Am. J. Pathol.* 170 (2007) 1594–1606. doi:10.2353/ajpath.2007.061025.
- [446] Y. Tan, M. Cheung, J. Pei, C.W. Menges, A.K. Godwin, J.R. Testa, Upregulation of DLX5 promotes ovarian cancer cell proliferation by enhancing IRS-2-AKT signaling, *Cancer Res.* 70 (2010) 9197–9206. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1568.
- [447] K. Miyamoto, T. Fukutomi, S. Akashi-Tanaka, T. Hasegawa, T. Asahara, T. Sugimura, T. Ushijima, Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 116 (2005) 407–414. doi:10.1002/ijc.21054.
- [448] T. Rauch, H. Li, X. Wu, G.P. Pfeifer, MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 7939–7947. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1888.
- [449] R.A. Timakhov, Y. Tan, M. Rao, Z. Liu, D.A. Altomare, J. Pei, D.L. Wiest, O.O. Favorova, J.E. Knepfer, J.R. Testa, Recurrent chromosomal rearrangements implicate oncogenes contributing to T-cell lymphomagenesis in Lck-MyrAkt2 transgenic mice, *Genes. Chromosomes Cancer.* 48 (2009) 786–794. doi:10.1002/gcc.20683.
- [450] K. Park, K. Kim, S.B. Rho, K. Choi, D. Kim, S.-H. Oh, J. Park, S.-H. Lee, J.-H. Lee, Homeobox Msx1 interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis, *Cancer Res.* 65 (2005) 749–757.
- [451] M.I. Morasso, N. Radoja, Dlx genes, p63, and ectodermal dysplasias, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 75 (2005) 163–171. doi:10.1002/bdrc.20047.
- [452] C. Takahashi, N. Akiyama, H. Kitayama, S. Takai, M. Noda, Possible involvement of MSX-2 homeoprotein in v-ras-induced transformation, *Leukemia*. 11 Suppl 3 (1997) 340–343.
- [453] H.S. Stevenson, S.W. Fu, J.J. Pinzone, J. Rhee, S.J. Simmens, P.E. Berg, BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNFalpha-induced cell death in MCF7 breast cancer cells, *Breast Cancer Res. BCR.* 9 (2007) R60. doi:10.1186/bcr1766.
- [454] Y. Masuda, A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda, K. Watanabe, Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5331–5338. doi:10.1074/jbc.M008590200.
- [455] P.A. Barker, A. Salehi, The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease, *J. Neurosci. Res.* 67 (2002) 705–712.
- [456] A. Sasaki, L. Hinck, K. Watanabe, RumMAGE-D the members: structure and function of a new adaptor family of MAGE-D proteins, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 25 (2005) 181–198. doi:10.1080/10799890500210511.
- [457] W.-G. Shen, Q.-Y. Xue, Y.-D. Wu, B.-S. Hu, J. Zhu, Y. Zhang, Q. Su, Melanoma-associated antigen family protein-D1 regulation of tumor cell migration, adhesion to endothelium, and actin structures reorganization in response to hypoxic stress, *Cell Commun. Adhes.* 14 (2007) 21–31. doi:10.1080/15419060701224948.
- [458] K. Shimada, K. Ikeda, K. Ito, Traf2 interacts with Smad4 and regulates BMP signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 775–779. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.048.
- [459] H. Ohta, K. Aoyagi, M. Fukaya, I. Danjoh, A. Ohta, N. Isohata, N. Saeki, H. Taniguchi, H. Sakamoto, T. Shimoda, T. Tani, T. Yoshida, H. Sasaki, Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers, *Br. J. Cancer.* 100 (2009) 389–398. doi:10.1038/sj.bjc.6604846.
- [460] J. Willert, M. Epping, J.R. Pollack, P.O. Brown, R. Nusse, A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells, *BMC Dev. Biol.* 2 (2002) 8.

- [461] I. Revet, G. Huizenga, J. Koster, R. Volckmann, P. van Sluis, R. Versteeg, D. Geerts, MSX1 induces the Wnt pathway antagonist genes DKK1, DKK2, DKK3, and SFRP1 in neuroblastoma cells, but does not block Wnt3 and Wnt5A signalling to DVL3, *Cancer Lett.* 289 (2010) 195–207. doi:10.1016/j.canlet.2009.08.019.
- [462] H.-L. Lee, T. Yi, K.M. Woo, H.-M. Ryoo, G.-S. Kim, J.-H. Baek, Msx2 mediates the inhibitory action of TNF-alpha on osteoblast differentiation, *Exp. Mol. Med.* 42 (2010) 437–445. doi:10.3858/emmm.2010.42.6.045.
- [463] Y.-C. Song, S.-D. Fu, X.-P. Wen, Z.-H. Ma, C.-X. Dang, [Expression and Significance of BP1 Gene and Cyclin D1 Gene in Breast Cancer], *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer.* 26 (2007) 709–714.
- [464] M.G. di Bari, E. Ginsburg, J. Plant, L. Strizzi, D.S. Salomon, B.K. Vonderhaar, Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1, *J. Cell. Physiol.* 219 (2009) 659–666. doi:10.1002/jcp.21712.
- [465] S. Hamada, K. Satoh, M. Hirota, K. Kimura, A. Kanno, A. Masamune, T. Shimosegawa, Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 768–774. doi:10.1002/jcp.21148.
- [466] G. van der Pluijm, Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation, *Bone.* 48 (2011) 37–43. doi:10.1016/j.bone.2010.07.023.
- [467] B. Baum, J. Settleman, M.P. Quinlan, Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease, *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (2008) 294–308. doi:10.1016/j.semcdb.2008.02.001.
- [468] S.Y. Lee, H.M. Jeon, C.H. Kim, M.K. Ju, H.S. Bae, H.G. Park, S.-C. Lim, S.I. Han, H.S. Kang, Homeobox gene *Dlx-2* is implicated in metabolic stress-induced necrosis, *Mol. Cancer.* 10 (2011) 113. doi:10.1186/1476-4598-10-113.
- [469] H. Li, I. Marijanovic, M.S. Kronenberg, I. Erceg, M.L. Stover, D. Velonis, M. Mina, J.G. Heinrich, S.E. Harris, W.B. Upholt, I. Kalajic, A.C. Lichtler, Expression and function of *Dlx* genes in the osteoblast lineage, *Dev. Biol.* 316 (2008) 458–470. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.001.
- [470] M.J. Joliat, S. Umeda, B.L. Lyons, M.A. Lynes, L.D. Shultz, Establishment and characterization of a new osteogenic cell line (MOS-J) from a spontaneous C57BL/6J mouse osteosarcoma, *Vivo Athens Greece.* 16 (2002) 223–228.
- [471] C. Khanna, J. Prehn, C. Yeung, J. Caylor, M. Tsokos, L. Helman, An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential, *Clin. Exp. Metastasis.* 18 (2000) 261–271.
- [472] Y.H. Yang, J.S. Rhim, S. Rasheed, V. Klement, P. Roy-Burman, Reversion of Kirsten sarcoma virus transformed human cells: elimination of the sarcoma virus nucleotide sequences, *J. Gen. Virol.* 43 (1979) 447–451. doi:10.1099/0022-1317-43-2-447.
- [473] T. Dull, R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, L. Naldini, A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system, *J. Virol.* 72 (1998) 8463–8471.
- [474] X.-F. Qin, D.S. An, I.S.Y. Chen, D. Baltimore, Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 183–188. doi:10.1073/pnas.232688199.
- [475] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, A. Khvorova, Rational siRNA design for RNA interference, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 326–330. doi:10.1038/nbt936.
- [476] M.B. Chase, S. Fu, S.B. Haga, G. Davenport, H. Stevenson, K. Do, D. Morgan, A.L. Mah, P.E. Berg, BP1, a homeodomain-containing isoform of *DLX4*, represses the beta-globin gene, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2505–2514.
- [477] T. Soga, Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming, *Cancer Sci.* 104 (2013) 275–281. doi:10.1111/cas.12085.
- [478] E. Hess, V. Duheron, M. Decossas, F. Lézot, A. Berdal, S. Chea, R. Golub, M.R. Bosisio, S.L. Bridal, Y. Choi, H. Yagita, C.G. Mueller, RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 188 (2012) 1245–1254. doi:10.4049/jimmunol.1101513.
- [479] A. Berdal, B. Castaneda, M. Aioub, J.R. Néfussi, C. Mueller, V. Descroix, F. Lézot, Osteoclasts in the dental microenvironment: a delicate balance controls dental histogenesis, *Cells Tissues Organs.* 194 (2011) 238–243. doi:10.1159/000324787.

- [480] S. Fu, H. Stevenson, J.W. Strovel, S.B. Haga, J. Stamberg, K. Do, P.E. Berg, Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the beta-globin gene, *Gene*. 278 (2001) 131–139.
- [481] M. Yu, Y. Yang, Y. Shi, D. Wang, X. Wei, N. Zhang, R. Niu, Expression level of beta protein 1 mRNA in Chinese breast cancer patients: a potential molecular marker for poor prognosis, *Cancer Sci*. 99 (2008) 173–178. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00661.x.
- [482] Y. Man, S.W. Fu, A. Schwartz, J.J. Pinzone, S.J. Simmens, P.E. Berg, Expression of BP1, a novel homeobox gene, correlates with breast cancer progression and invasion, *Breast Cancer Res. Treat.* 90 (2005) 241–247. doi:10.1007/s10549-004-4492-9.
- [483] Y. Fu, Y. Lian, K.S. Kim, L. Zhang, A.K. Hindle, F. Brody, R.S. Siegel, T.A. McCaffrey, S.W. Fu, BP1 Homeoprotein Enhances Metastatic Potential in ER-negative Breast Cancer, *J. Cancer*. 1 (2010) 54–62.
- [484] B.J. Kluk, Y. Fu, T.A. Formolo, L. Zhang, A.K. Hindle, Y. Man, R.S. Siegel, P.E. Berg, C. Deng, T.A. McCaffrey, S.W. Fu, BP1, an isoform of DLX4 homeoprotein, negatively regulates BRCA1 in sporadic breast cancer, *Int. J. Biol. Sci.* 6 (2010) 513–524.
- [485] J. Zhou, J. Yang, H. Guo, Z. Deng, X. Wen, L. Yang, J. Yin, G. Xiao, J. Lin, J. Qian, BP1 overexpression is associated with adverse prognosis in de novo acute myeloid leukemia, *Leuk. Lymphoma*. 57 (2016) 828–834. doi:10.3109/10428194.2015.1088648.
- [486] M. Yu, Y. Wan, Q. Zou, Prognostic significance of BP1 mRNA expression level in patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 824–830. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.03.011.
- [487] Y. Gao, Z. Li, X. Guo, Y. Liu, K. Zhang, DLX4 as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma, *Neoplasma*. 61 (2014) 318–323.
- [488] D. Haria, B.Q. Trinh, S.Y. Ko, N. Barengo, J. Liu, H. Naora, The homeoprotein DLX4 stimulates NF- $\kappa$ B activation and CD44-mediated tumor-mesothelial cell interactions in ovarian cancer, *Am. J. Pathol.* 185 (2015) 2298–2308. doi:10.1016/j.ajpath.2015.04.004.
- [489] B. Trinh, S.Y. Ko, D. Haria, N. Barengo, H. Naora, The homeoprotein DLX4 controls inducible nitric oxide synthase-mediated angiogenesis in ovarian cancer, *Mol. Cancer*. 14 (2015) 97. doi:10.1186/s12943-015-0368-3.
- [490] B.Q. Trinh, S.Y. Ko, N. Barengo, S.-Y. Lin, H. Naora, Dual functions of the homeoprotein DLX4 in modulating responsiveness of tumor cells to topoisomerase II-targeting drugs, *Cancer Res*. 73 (2013) 1000–1010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3538.
- [491] T. Shimamoto, K. Ohyashiki, K. Takeshita, Overexpression of the homeobox gene DLX-7 inhibits apoptosis by induced expression of intercellular adhesion molecule-1, *Exp. Hematol.* 28 (2000) 433–441.
- [492] X.-H. Xie, X.-P. Xu, C.-Y. Sun, Z.-J. Yu, Regulation of the oncogenic function of distal-less 4 by microRNA-122 in hepatocellular carcinoma, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 1375–1380. doi:10.3892/mmr.2015.3554.
- [493] B.Q. Trinh, N. Barengo, H. Naora, Homeodomain protein DLX4 counteracts key transcriptional control mechanisms of the TGF- $\beta$  cytosstatic program and blocks the antiproliferative effect of TGF- $\beta$ , *Oncogene*. 30 (2011) 2718–2729. doi:10.1038/onc.2011.4.
- [494] J.-D. Zhou, T.-J. Zhang, Y.-X. Wang, D.-Q. Yang, L. Yang, J.-C. Ma, X.-M. Wen, J. Yang, J. Lin, J. Qian, DLX4 hypermethylation is a prognostically adverse indicator in de novo acute myeloid leukemia, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37 (2016) 8951–8960. doi:10.1007/s13277-015-4364-4.
- [495] J.-D. Zhou, Y.-X. Wang, T.-J. Zhang, D. Yang, D.-M. Yao, H. Guo, L. Yang, J.-C. Ma, X.-M. Wen, J. Yang, J. Lin, J. Qian, Epigenetic inactivation of DLX4 is associated with disease progression in chronic myeloid leukemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 1250–1256. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.095.
- [496] H. Harada, K. Miyamoto, Y. Yamashita, K. Taniyama, H. Ohdan, M. Okada, Methylated DLX4 Predicts Response to Pathologic Stage I Non-Small Cell Lung Cancer Resection, *Ann. Thorac. Surg.* 99 (2015) 1746–1754. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.12.058.
- [497] J. Sakane, K. Taniyama, K. Miyamoto, A. Saito, K. Kuraoka, T. Nishimura, K. Sentani, N. Oue, W. Yasui, Aberrant DNA methylation of DLX4 and SIM1 is a predictive marker for disease progres-

- sion of uterine cervical low-grade squamous intraepithelial lesion, *Diagn. Cytopathol.* 43 (2015) 462–470. doi:10.1002/dc.23256.
- [498] M.E. Dinger, P.P. Amaral, T.R. Mercer, K.C. Pang, S.J. Bruce, B.B. Gardiner, M.E. Askarian-Amiri, K. Ru, G. Soldà, C. Simons, S.M. Sunkin, M.L. Crowe, S.M. Grimmond, A.C. Perkins, J.S. Mattick, Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation, *Genome Res.* 18 (2008) 1433–1445. doi:10.1101/gr.078378.108.
- [499] M.S. Kowalczyk, J.R. Hughes, D. Garrick, M.D. Lynch, J.A. Sharpe, J.A. Sloane-Stanley, S.J. McGowan, M. De Gobbi, M. Hosseini, D. Vernimmen, J.M. Brown, N.E. Gray, L. Collavin, R.J. Gibbons, J. Flint, S. Taylor, V.J. Buckle, T.A. Milne, W.G. Wood, D.R. Higgs, Intragenic enhancers act as alternative promoters, *Mol. Cell.* 45 (2012) 447–458. doi:10.1016/j.molcel.2011.12.021.
- [500] I. Sur, J. Taipale, The role of enhancers in cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 483–493. doi:10.1038/nrc.2016.62.
- [501] B. Navet, F. Lézot, Chapter 14 - Homeobox genes from the Dlx family and bone cancers, in: D. Heymann (Ed.), *Bone Cancer Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2015: pp. 149–162. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124167216000145> (accessed December 14, 2015).
- [502] X. Tian, D. Rai, J. Li, C. Zou, Y. Bai, D. Wazer, V. Band, Q. Gao, BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1, *Cancer Res.* 65 (2005) 4747–4753. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0018.
- [503] B. Xue, C. Wen, Y. Shi, D. Zhao, C. Li, Human NRAGE disrupts E-cadherin/beta-catenin regulated homotypic cell-cell adhesion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 247–251. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.069.
- [504] Q. Du, Y. Zhang, X.-X. Tian, Y. Li, W.-G. Fang, MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 22 (2009) 659–665.
- [505] Q. Yang, C. Ou, M. Liu, W. Xiao, C. Wen, F. Sun, NRAGE promotes cell proliferation by stabilizing PCNA in a ubiquitin-proteasome pathway in esophageal carcinomas, *Carcinogenesis.* 35 (2014) 1643–1651. doi:10.1093/carcin/bgu084.
- [506] C. Chu, B. Xue, C. Tu, Z. Feng, Y. Shi, Y. Miao, C.-J. Wen, NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo, *Cancer Lett.* 250 (2007) 268–275. doi:10.1016/j.canlet.2006.10.020.
- [507] Z. Zeng, W. Wu, J. Yang, Z. Tang, D. Chen, M. Qiu, H. Luo, Z. Wang, Y. Jin, D. Wang, R. Xu, Prognostic relevance of melanoma antigen D1 expression in colorectal carcinoma, *J. Transl. Med.* 10 (2012) 181. doi:10.1186/1479-5876-10-181.
- [508] M.L. Coubrough, A.J. Bendall, Impaired nuclear import of mammalian Dlx4 proteins as a consequence of rapid sequence divergence, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 3880–3891. doi:10.1016/j.yexcr.2006.08.023.
- [509] S.Y. Lee, H.M. Jeon, M.K. Ju, E.K. Jeong, C.H. Kim, M.-A. Yoo, H.G. Park, S.I. Han, H.S. Kang, Dlx-2 is implicated in TGF- $\beta$ - and Wnt-induced epithelial-mesenchymal, glycolytic switch, and mitochondrial repression by Snail activation, *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 1768–1780. doi:10.3892/ijo.2015.2874.
- [510] G.M. Cote, Rank ligand as a target in musculoskeletal neoplasms, *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* 8 (2015) 339–343. doi:10.1007/s12178-015-9310-y.
- [511] K. Marley, S. Bracha, B. Seguin, Osteoprotegerin activates osteosarcoma cells that co-express RANK and RANKL, *Exp. Cell Res.* 338 (2015) 32–38. doi:10.1016/j.yexcr.2015.08.001.
- [512] K. Mori, M. Berreur, F. Blanchard, C. Chevalier, I. Guisle-Marsollier, M. Masson, F. Rédini, D. Heymann, Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells, *Oncol. Rep.* 18 (2007) 1365–1371.
- [513] M. Mogi, A. Kondo, The presence of RANKL-OPG complex in human osteosarcoma U2OS, *J. Immunoassay Immunochem.* 34 (2013) 356–364. doi:10.1080/15321819.2012.741640.
- [514] K. Mori, F. Rédini, F. Gouin, B. Cherrier, D. Heymann, Osteosarcoma: current status of immunotherapy and future trends (Review), *Oncol. Rep.* 15 (2006) 693–700.
- [515] Y. Wittrant, F. Lamoureux, K. Mori, A. Riet, A. Kamijo, D. Heymann, F. Redini, RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells, *Int. J. Oncol.* 28 (2006) 261–269.

- [516] N. Miyamoto, Y. Higuchi, K. Mori, M. Ito, M. Tsurudome, M. Nishio, H. Yamada, A. Sudo, K. Kato, A. Uchida, Y. Ito, Human osteosarcoma-derived cell lines produce soluble factor(s) that induces differentiation of blood monocytes to osteoclast-like cells, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 25–38.
- [517] C. Adamopoulos, A.N. Gargalionis, E.K. Basdra, A.G. Papavassiliou, Deciphering signaling networks in osteosarcoma pathobiology, *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ. 241 (2016) 1296–1305. doi:10.1177/1535370216648806.
- [518] D. Branstetter, K. Rohrbach, L.-Y. Huang, R. Soriano, M. Tometsko, M. Blake, A.P. Jacob, W.C. Dougall, RANK and RANK ligand expression in primary human osteosarcoma, *J. Bone Oncol.* 4 (2015) 59–68. doi:10.1016/j.jbo.2015.06.002.
- [519] C. Salinas-Souza, R. De Oliveira, M.T.D.S. Alves, R.J. Garcia Filho, A.S. Petrilli, S.R.C. Toledo, The metastatic behavior of osteosarcoma by gene expression and cytogenetic analyses, *Hum. Pathol.* 44 (2013) 2188–2198. doi:10.1016/j.humpath.2013.04.013.
- [520] N.C. Walsh, K.A. Alexander, C.A. Manning, S. Karmakar, S.K. Karmakar, J.F. Wang, C.M. Weyand, A.R. Pettit, E.M. Gravalles, Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL, *Genes Immun.* 14 (2013) 336–345. doi:10.1038/gene.2013.29.
- [521] J. Costa-Rodrigues, C.A. Teixeira, M.H. Fernandes, Paracrine-mediated osteoclastogenesis by the osteosarcoma MG63 cell line: is RANKL/RANK signalling really important?, *Clin. Exp. Metastasis.* 28 (2011) 505–514. doi:10.1007/s10585-011-9387-7.
- [522] D.A. Dossing, P.H. Stern, Receptor activator of NF-kappaB ligand protein expression in UMR-106 cells is differentially regulated by parathyroid hormone and calcitriol, *J. Cell. Biochem.* 95 (2005) 1029–1041. doi:10.1002/jcb.20470.
- [523] A. Jacobson, S. Johansson, M. Branting, H. Melhus, Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 162–167. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.092.
- [524] K. Kinpara, M. Mogi, M. Kuzushima, A. Togari, Osteoclast differentiation factor in human osteosarcoma cell line, *J. Immunoassay.* 21 (2000) 327–340. doi:10.1080/01971520009349540.
- [525] S. Avnet, A. Longhi, M. Salerno, J.M. Halleen, F. Perut, D. Granchi, S. Ferrari, F. Bertoni, A. Giunti, N. Baldini, Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma, *Int. J. Oncol.* 33 (2008) 1231–1238.
- [526] M.B. Benedikt, E.W. Mahlum, K.L. Shogren, M. Subramaniam, T.C. Spelsberg, M.J. Yaszemski, A. Maran, 2-methoxyestradiol-mediated anti-tumor effect increases osteoprotegerin expression in osteosarcoma cells, *J. Cell. Biochem.* 109 (2010) 950–956. doi:10.1002/jcb.22473.
- [527] A. Patiño-García, M. Zalacain, C. Folio, C. Zanduetta, L. Sierrasesúmaga, M. San Julián, G. Toledo, J. De Las Rivas, F. Lecanda, Profiling of chemonaive 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15 (2009) 5082–5091. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0300.
- [528] H. Brändström, K.B. Jonsson, O. Vidal, S. Ljunghall, C. Ohlsson, O. Ljunggren, Tumor necrosis factor-alpha and -beta upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 454–457. doi:10.1006/bbrc.1998.8993.
- [529] Y. Chen, M.A. Di Grappa, S.D. Molyneux, T.D. McKee, P. Waterhouse, J.M. Penninger, R. Khokha, RANKL blockade prevents and treats aggressive osteosarcomas, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015) 317ra197. doi:10.1126/scitranslmed.aad0295.
- [530] T. Akiyama, P.F.M. Choong, C.R. Dass, RANK-Fc inhibits malignancy via inhibiting ERK activation and evoking caspase-3-mediated anoikis in human osteosarcoma cells, *Clin. Exp. Metastasis.* 27 (2010) 207–215. doi:10.1007/s10585-010-9319-y.
- [531] J. Rousseau, V. Escriou, F. Lamoureux, R. Brion, J. Chesneau, S. Battaglia, J. Amiaud, D. Scherman, D. Heymann, F. Rédini, V. Trichet, Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26 (2011) 2452–2462. doi:10.1002/jbmr.455.
- [532] G. Moriceau, B. Ory, B. Gobin, F. Verrecchia, F. Gouin, F. Blanchard, F. Redini, D. Heymann, Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 2981–2987.

- [533] J. Chang, W. Wang, H. Zhang, Y. Hu, Z. Yin, Bisphosphonates regulate cell proliferation, apoptosis and pro-osteoclastic expression in MG-63 human osteosarcoma cells, *Oncol. Lett.* 4 (2012) 299–304. doi:10.3892/ol.2012.723.
- [534] T. Ohba, H.A. Cole, J.M.M. Cates, D.A. Slosky, H. Haro, T. Ando, H.S. Schwartz, J.G. Schoenecker, Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 29 (2014) 1431–1445. doi:10.1002/jbmr.2182.
- [535] A. Kobayashi, F. Hirano, I. Makino, The inhibitory effect of bisphosphonates on glucocorticoid-induced RANKL expression in human cells, *Scand. J. Rheumatol.* 34 (2005) 480–484. doi:10.1080/03009740510026788.
- [536] D. Bacri, M.W.B. Arush, E. Vlodyavsky, Y. Kollander, D. Militianu, S. Postovsky, Osteogenic sarcoma in a child with familial expansile osteolysis syndrome: an accidental association?, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32 (2010) e50–53. doi:10.1097/MPH.0b013e3181c5ab68.
- [537] B. Castaneda, Y. Simon, J. Jacques, E. Hess, Y.-W. Choi, C. Blin-Wakkach, C. Mueller, A. Berdal, F. Lézot, Bone resorption control of tooth eruption and root morphogenesis: Involvement of the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK), *J. Cell. Physiol.* 226 (2011) 74–85. doi:10.1002/jcp.22305.
- [538] S. Xu, Y. Zhang, B. Liu, K. Li, B. Huang, B. Yan, Z. Zhang, K. Liang, C. Jia, J. Lin, C. Zeng, D. Cai, D. Jin, Y. Jiang, X. Bai, Activation of mTORC1 in B Lymphocytes Promotes Osteoclast Formation via Regulation of  $\beta$ -Catenin and RANKL/OPG, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 31 (2016) 1320–1333. doi:10.1002/jbmr.2800.
- [539] N. Meednu, H. Zhang, T. Owen, W. Sun, V. Wang, C. Cistrone, J. Rangel-Moreno, L. Xing, J.H. Anolik, Production of RANKL by Memory B Cells, *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ. 68 (2016) 805–816. doi:10.1002/art.39489.
- [540] V. Marrella, N. Lo Iacono, E. Fontana, C. Sobacchi, H. Sic, F. Schena, L. Sereni, M.C. Castiello, P.L. Poliani, P. Vezzoni, B. Cassani, E. Traggiai, A. Villa, IL-10 critically modulates B cell responsiveness in Rankl-/- mice, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 194 (2015) 4144–4153. doi:10.4049/jimmunol.1401977.
- [541] K. Titanji, A. Vunnavu, A.N. Sheth, C. Delille, J.L. Lennox, S.E. Sanford, A. Foster, A. Knezevic, K.A. Easley, M.N. Weitzmann, I. Ofotokun, Dysregulated B Cell Expression of RANKL and OPG Correlates with Loss of Bone Mineral Density in HIV Infection, *PLoS Pathog.* 10 (2014). doi:10.1371/journal.ppat.1004497.
- [542] X. Yu, J. Lin, Q. Yu, T. Kawai, M.A. Taubman, X. Han, Activation of Toll-like receptor 9 inhibits lipopolysaccharide-induced receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand expression in rat B lymphocytes, *Microbiol. Immunol.* 58 (2014) 51–60. doi:10.1111/1348-0421.12129.
- [543] M.M. Guerrini, H. Takayanagi, The immune system, bone and RANKL, *Arch. Biochem. Biophys.* 561 (2014) 118–123. doi:10.1016/j.abb.2014.06.003.
- [544] L. Yeo, H. Lom, M. Juarez, M. Snow, C.D. Buckley, A. Filer, K. Raza, D. Scheel-Toellner, Expression of FcRL4 defines a pro-inflammatory, RANKL-producing B cell subset in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 74 (2015) 928–935. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204116.
- [545] L. Yeo, K.-M. Toellner, M. Salmon, A. Filer, C.D. Buckley, K. Raza, D. Scheel-Toellner, Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 2022–2028. doi:10.1136/ard.2011.153312.
- [546] M. Onal, J. Xiong, X. Chen, J.D. Thostenson, M. Almeida, S.C. Manolagas, C.A. O'Brien, Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 29851–29860. doi:10.1074/jbc.M112.377945.
- [547] T. Perlot, J.M. Penninger, Development and function of murine B cells lacking RANK, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 188 (2012) 1201–1205. doi:10.4049/jimmunol.1102063.
- [548] M.C. Horowitz, J.A. Fretz, J.A. Lorenzo, How B Cells Influence Bone Biology in Health and Disease, *Bone.* 47 (2010) 472–479. doi:10.1016/j.bone.2010.06.011.
- [549] X. Han, X. Lin, A.R. Seliger, J. Eastcott, T. Kawai, M.A. Taubman, Expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand by B cells in response to oral bacteria, *Oral Microbiol. Immunol.* 24 (2009) 190–196. doi:10.1111/j.1399-302X.2008.00494.x.

- [550] Y. Li, G. Toraldo, A. Li, X. Yang, H. Zhang, W.-P. Qian, M.N. Weitzmann, B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo, *Blood*. 109 (2007) 3839–3848. doi:10.1182/blood-2006-07-037994.
- [551] T. Kawai, T. Matsuyama, Y. Hosokawa, S. Makihira, M. Seki, N.Y. Karimbux, R.B. Goncalves, P. Valverde, S. Dibart, Y.-P. Li, L.A. Miranda, C.W.O. Ernst, Y. Izumi, M.A. Taubman, B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 987–998. doi:10.2353/ajpath.2006.060180.
- [552] N. Manabe, H. Kawaguchi, H. Chikuda, C. Miyaura, M. Inada, R. Nagai, Y. Nabeshima, K. Nakamura, A.M. Sinclair, R.H. Scheuermann, M. Kuro-o, Connection Between B Lymphocyte and Osteoclast Differentiation Pathways, *J. Immunol.* 167 (2001) 2625–2631. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2625.
- [553] M. Kanematsu, T. Sato, H. Takai, K. Watanabe, K. Ikeda, Y. Yamada, Prostaglandin E2 Induces Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand/Osteoprotegerin Ligand on Pre-B Cells: Implications for Accelerated Osteoclastogenesis in Estrogen Deficiency, *J. Bone Miner. Res.* 15 (2000) 1321–1329. doi:10.1359/jbmr.2000.15.7.1321.
- [554] J.-M. Davaine, T. Quillard, M. Chatelais, F. Guilbaud, R. Brion, B. Guyomarch, M.Á. Brennan, D. Heymann, M.-F. Heymann, Y. Gouëffic, Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 51 (2016) 259–267. doi:10.1016/j.ejvs.2015.10.004.
- [555] Y. Yoshinaga, T. Ukai, Y. Abe, Y. Hara, Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats, *J. Periodontal Res.* 42 (2007) 402–409. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.00960.x.
- [556] G. Zauli, F. Corallini, F. Bossi, F. Fischetti, P. Durigutto, C. Celeghini, F. Tedesco, P. Secchiero, Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo, *Blood*. 110 (2007) 536–543. doi:10.1182/blood-2007-01-068395.
- [557] P. Collin-Osdoby, Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin, *Circ. Res.* 95 (2004) 1046–1057. doi:10.1161/01.RES.0000149165.99974.12.
- [558] A. Ishida, N. Fujita, R. Kitazawa, T. Tsuruo, Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26217–26224. doi:10.1074/jbc.M111093200.
- [559] Y.-X. Liao, C.-H. Zhou, H. Zeng, D.-Q. Zuo, Z.-Y. Wang, F. Yin, Y.-Q. Hua, Z.-D. Cai, The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review), *Int. J. Mol. Med.* 32 (2013) 1239–1246. doi:10.3892/ijmm.2013.1521.
- [560] Y.-X. LIAO, Z.-Z. FU, C.-H. ZHOU, L.-C. SHAN, Z.-Y. WANG, F. YIN, L.-P. ZHENG, Y.-Q. HUA, Z.-D. CAI, AMD3100 reduces CXCR4-mediated survival and metastasis of osteosarcoma by inhibiting JNK and Akt, but not p38 or Erk1/2, pathways in in vitro and mouse experiments, *Oncol. Rep.* 34 (2015) 33–42. doi:10.3892/or.2015.3992.
- [561] L.G.L. Sand, K. Scotlandi, D. Berghuis, B.E. Snaar-Jagalska, P. Picci, T. Schmidt, K. Szuhai, P.C.W. Hogendoorn, CXCL14, CXCR7 expression and CXCR4 splice variant ratio associate with survival and metastases in Ewing sarcoma patients, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 51 (2015) 2624–2633. doi:10.1016/j.ejca.2015.08.020.
- [562] Y. Lu, B. Hu, G.-F. Guan, J. Chen, C. Wang, Q. Ma, Y.-H. Wen, X.-C. Qiu, X. Zhang, Y. Zhou, SDF-1/CXCR4 promotes F5M2 osteosarcoma cell migration by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 32 (2015) 194. doi:10.1007/s12032-015-0576-0.
- [563] F. Yang, W. Sun, Y. Yang, Y. Wang, C.-L. Li, H. Fu, X.-L. Wang, F. Yang, T. He, J. Chen, SDF1-CXCR4 signaling contributes to persistent pain and hypersensitivity via regulating excitability of primary nociceptive neurons: involvement of ERK-dependent Nav1.8 up-regulation, *J. Neuroinflammation.* 12 (2015) 219. doi:10.1186/s12974-015-0441-2.
- [564] M.A. Krook, L.A. Nicholls, C.A. Scannell, R. Chugh, D.G. Thomas, E.R. Lawlor, Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma, *Mol. Cancer Res. MCR.* 12 (2014) 953–964. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0668.
- [565] P. Brennecke, M.J.E. Arlt, C. Campanile, K. Husmann, A. Gvozdenovic, T. Apuzzo, M. Thelen, W. Born, B. Fuchs, CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice, *Clin. Exp. Metastasis.* 31 (2014) 339–349. doi:10.1007/s10585-013-9632-3.

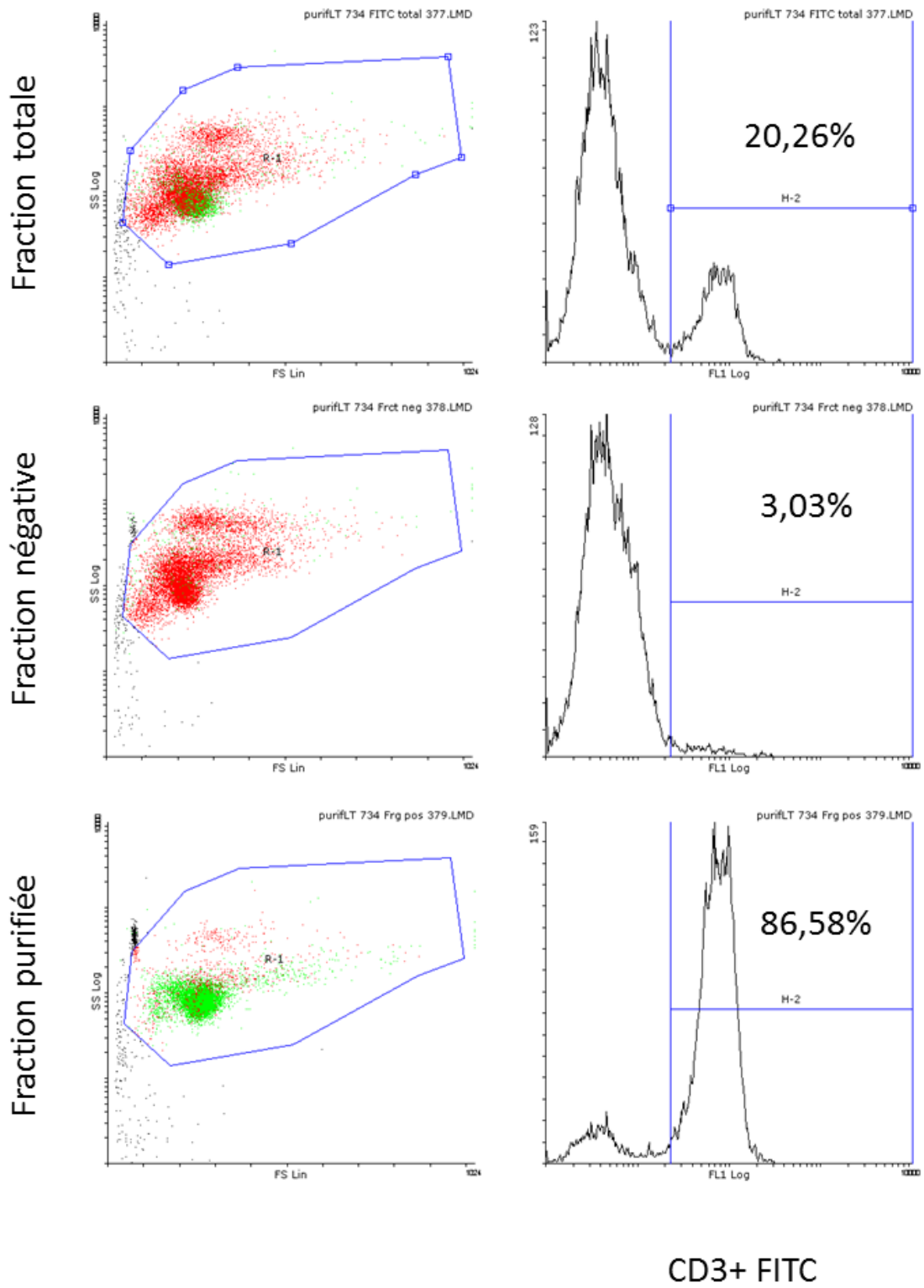
- [566] P. Brennecke, M.J.E. Arlt, R. Muff, C. Campanile, A. Gvozdenovic, K. Husmann, N. Holzwarth, E. Cameroni, F. Ehrensperger, M. Thelen, W. Born, B. Fuchs, Expression of the Chemokine Receptor CXCR7 in CXCR4-Expressing Human 143B Osteosarcoma Cells Enhances Lung Metastasis of Intratibial Xenografts in SCID Mice, *PLOS ONE*. 8 (2013) e74045. doi:10.1371/journal.pone.0074045.
- [567] R. Hamdan, Z. Zhou, E.S. Kleinerman, Blocking SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 downregulates PDGF-B and inhibits bone marrow derived pericyte differentiation and tumor vascular expansion in Ewing's tumors, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 483–491. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0447.
- [568] L. Portella, R. Vitale, S.D. Luca, C. D'Alterio, C. Ieranò, M. Napolitano, A. Riccio, M.N. Polimeno, L. Monfregola, A. Barbieri, A. Luciano, A. Ciarmiello, C. Arra, G. Castello, P. Amodeo, S. Scala, Pre-clinical Development of a Novel Class of CXCR4 Antagonist Impairing Solid Tumors Growth and Metastases, *PLOS ONE*. 8 (2013) e74548. doi:10.1371/journal.pone.0074548.
- [569] E. Goguet-Surmenian, P. Richard-Fiardo, E. Guillemot, M. Benchetrit, A. Gomez-Brouchet, P. Buzzo, B. Karimjee-Soilihi, P. Alemanno, J.-F. Michiels, A. Schmid-Alliana, H. Schmid-Antomarchi, CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs, *Br. J. Cancer*. 109 (2013) 1579–1585. doi:10.1038/bjc.2013.482.
- [570] X. Sun, C. Charbonneau, L. Wei, W. Yang, Q. Chen, R.M. Terek, CXCR4-Targeted Therapy Inhibits VEGF Expression and Chondrosarcoma Angiogenesis and Metastasis, *Mol. Cancer Ther.* 12 (2013) 1163–1170. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1092.
- [571] C.-Y. Huang, C.-Y. Lee, M.-Y. Chen, W.-H. Yang, Y.-H. Chen, C.-H. Chang, H.-C. Hsu, Y.-C. Fong, C.-H. Tang, Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways, *J. Cell. Physiol.* 221 (2009) 204–212. doi:10.1002/jcp.21846.
- [572] S.Y. Kim, C.H. Lee, B.V. Midura, C. Yeung, A. Mendoza, S.H. Hong, L. Ren, D. Wong, W. Korz, A. Merzouk, H. Salari, H. Zhang, S.T. Hwang, C. Khanna, L.J. Helman, Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases, *Clin. Exp. Metastasis*. 25 (2008) 201–211. doi:10.1007/s10585-007-9133-3.
- [573] Y. Oda, H. Yamamoto, S. Tamiya, S. Matsuda, K. Tanaka, R. Yokoyama, Y. Iwamoto, M. Tsuneyoshi, CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 19 (2006) 738–745. doi:10.1038/modpathol.3800587.
- [574] K. Miura, S. Uniyal, M. Leabu, T. Oravec, S. Chakrabarti, V.L. Morris, B.M.C. Chan, Chemokine receptor CXCR4-beta1 integrin axis mediates tumorigenesis of osteosarcoma HOS cells, *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 83 (2005) 36–48. doi:10.1139/o04-106.
- [575] L.G.L. Sand, D. Berghuis, K. Szuhai, P.C.W. Hogendoorn, Expression of CCL21 in Ewing sarcoma shows an inverse correlation with metastases and is a candidate target for immunotherapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 65 (2016) 995–1002. doi:10.1007/s00262-016-1862-1.
- [576] G. Li, Y. Yang, S. Xu, L. Ma, M. He, Z. Zhang, Slug signaling is up-regulated by CCL21/CCR7 [corrected] to induce EMT in human chondrosarcoma, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 32 (2015) 478. doi:10.1007/s12032-014-0478-6.
- [577] N. Gordon, E.S. Kleinerman, The role of Fas/FasL in the metastatic potential of osteosarcoma and targeting this pathway for the treatment of osteosarcoma lung metastases, *Cancer Treat. Res.* 152 (2009) 497–508. doi:10.1007/978-1-4419-0284-9\_29.
- [578] G. Huang, N.V. Koshkina, E.S. Kleinerman, Fas Expression in Metastatic Osteosarcoma Cells Is Not Regulated by CpG Island Methylation, *Oncol. Res.* 18 (2009) 31–39.
- [579] G. Huang, K. Nishimoto, Y. Yang, E.S. Kleinerman, Participation of the Fas/FasL signaling pathway and the lung microenvironment in the development of osteosarcoma lung metastases, *Adv. Exp. Med. Biol.* 804 (2014) 203–217. doi:10.1007/978-3-319-04843-7\_11.
- [580] N.V. Koshkina, C. Khanna, A. Mendoza, H. Guan, L. DeLauter, E.S. Kleinerman, Fas-negative osteosarcoma tumor cells are selected during metastasis to the lungs: the role of the Fas pathway in the metastatic process of osteosarcoma, *Mol. Cancer Res. MCR.* 5 (2007) 991–999. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0007.
- [581] N. Gordon, N.V. Koshkina, S.-F. Jia, C. Khanna, A. Mendoza, L.L. Worth, E.S. Kleinerman, Corruption of the Fas pathway delays the pulmonary clearance of murine osteosarcoma cells, enhances



- their metastatic potential, and reduces the effect of aerosol gemcitabine, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (2007) 4503–4510. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0313.
- [582] N. Gordon, C.A.S. Arndt, D.S. Hawkins, D.K. Doherty, C.Y. Inwards, M.F. Munsell, J. Stewart, N.V. Koshkina, E.S. Kleinerman, Fas expression in lung metastasis from osteosarcoma patients, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 27 (2005) 611–615.
- [583] T. Xie, H.-Y. Ren, H.-Q. Lin, J.-P. Mao, T. Zhu, S.-D. Wang, Z.-M. Ye, Sinomenine prevents metastasis of human osteosarcoma cells via S phase arrest and suppression of tumor-related neovascularization and osteolysis through the CXCR4-STAT3 pathway, *Int. J. Oncol.* 48 (2016) 2098–2112. doi:10.3892/ijo.2016.3416.

# **Annexes**

# Annexe 1 | Evaluation de la pureté des lymphocytes T extrait de la rate à l'aide du kit Dynabeads® FlowComp



**Annexe 2 | Liste des amorces de qPCR utilisées pour les analyses chez la souris**

mACTB	Sens	5' CTAAGGCCAACCGTGAAAAG 3'
	Antisens	5' ACCAGAGGCATACAGGGACA 3'
mGAPDH	Sens	5' TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG 3'
	Antisens	5' GGTGCAGGAGGCATTGCT 3'
mDlx1	Sens	5' CTACGTCAACTCGGTCAGCA 3'
	Antisens	5' CTGCAACTGCAAACCTGGAAT 3'
mDlx2	Sens	5' TCCGAATAGTGAACGGGAAG 3'
	Antisens	5' CCGCTTTTCCACATCTTCTT 3'
mDlx3	Sens	5' TACTCGCCCAAGTCGGAATA 3'
	Antisens	5' TTCTGGAACCAGATTTTCACC 3'
mDlx4 total	Sens	5' AGCTCCAACACCTGAACCAG 3'
	Antisens	5' CTTGGGTAGACCCAGATGA 3'
mDlx4 full lenght	Sens	5' ATCTCAGCCCTTTCACAGGC 3'
	Antisens	5' TGGAGCTGCAGGCTAGAGTA 3'
mBP1	Sens	5' CATGGTGTGGGATGCGATGA 3'
	Antisens	5' AGAGAAGTCCTCTCCGGCT 3'
mBP2	Sens	5' CACCGAGACTCAGAATCAGAGAA 3'
	Antisens	5' AGAGAAGTCCTCTCCGGCT 3'
mDlx5	Sens	5' CAGAGAAGGTTTCAGAAGACTCAG 3'
	Antisens	5' CTCCCCGTTTTTCATGATCT 3'
mDlx6	Sens	5' CACAGCCCTTACCTCCAGTC 3'
	Antisens	5' AACCTGATTTCCCGTTTTTC 3'
mBcl2	Sens	5' GGACTTGAAGTGCCATTGGT 3'
	Antisens	5' AGCCCCTCTGTGACAGCTTA 3'
m-cMyc	Sens	5' CTTCTCTCCTTCTCGGACTC 3'
	Antisens	5' CCTCATCTTCTTGCTCTTCTCA 3'
mP21	Sens	5' AGGCAGACCAGCCTGACA 3'
	Antisens	5' GAGGGCTAAGGCCGAAGA 3'
mP53	Sens	5' GTTATGTGCACGTA CTCTCTC 3'
	Antisens	5' CGTCATGTGCTGTGACTTCT 3'
mRANKL	Sens	5' GCAGAAGGAACTGCAACACA 3'
	Antisens	5' GATGGTGAGGTGTGCAAATG 3'
mRANK	Sens	5' TGCAGCTCTTCCATGACACTG 3'
	Antisens	5' CAGCCACTACTACCACAGAGATG 3'
mOPG	Sens	5' ATGAACAAGTGGCTGTGCTG 3'
	Antisens	5' CAGTTTCTGGGTCATAATGCAA 3'
mLGR4	Sens	5' CCATTCGTGGACTGAGTGCT 3'
	Antisens	5' GTTGGTGAATGCGAAGTCGG 3'

### Annexe 3 | Liste des amorces de qPCR utilisées pour les analyses chez l'Homme

GAPDH	Sens	5' TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG 3'
	Antisens	5' GGTGCAGGAGGCATTGCT 3'
B2M	Sens	5' TTCTGGCCTGGAGGCTATC 3'
	Antisens	5' TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC 3'
RANK	Sens	5' TTCTGCTTCTCTTCGCGTCT 3'
	Antisens	5' CCAGTGCCACAAATTAGCTGT 3'
RANKL	Sens	5' TCGTTGGATCACAGCACATCA 3'
	Antisens	5' TATGGGAACCAGATGGGATGTC 3'
OPG	Sens	5' CAGCTACAAGAACAGACTTTCC 3'
	Antisens	5' TCGAAGGTGAGGTTAGCATGTC 3'
Bax	Sens	5' ATGCGTCCACCAAGAAGC 3'
	Antisens	5' ACGGCGGAATCATCCTC 3'
Bcl2	Sens	5' CTGCACCTGACGCCCTTACC 3'
	Antisens	5' CACATGACCCACCGAACTCAAAGA 3'
p21	Sens	5' CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG 3'
	Antisens	5' CATGGGTTCTGACGGACAT 3'
p53	Sens	5' ACATGACGGAGGTTGTGAGG 3'
	Antisens	5' CGCAAATTCCTTCCACTCGG 3'
BMP2	Sens	5' AGGACCTGGGGAGCAGCAA 3'
	Antisens	5' GCTCTTCAATGGACGTGTCCC 3'
DKK1	Sens	5' ATAGCACCTGGATGGGTATTCC 3'
	Antisens	5' CACAGTCTGATGACCGGAGA 3'
Runx2	Sens	5' GCCTAGGCGCATTTCAGA 3'
	Antisens	5' GCTCTTCTACTGAGAGTGGAAAGG 3'
Sox9	Sens	5' GTACCCGCACTGCACAAC 3'
	Antisens	5' TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC 3'
Coll1A	Sens	5' GATCCAGACTCTGACCTTTTGC 3'
	Antisens	5' GCTCCAGCCTCTCCATCTTT 3'
OC	Sens	5' GGCCTACCTGTATCAATGG 3'
	Antisens	5' GTGGTCAGCCAACCTCGTCA 3'
OP	Sens	5' GCCGAGGTGATAGTGTGGTT 3'
	Antisens	5' TGAGGTGATGCCTCGTCTG 3'
BSP	Sens	5' CAATCTGTGCCACTCACTGC 3'
	Antisens	5' CAGTCTTCATTTGGTGATTGC 3'
MMP2	Sens	5' ATAACCTGGATGCCGTCGT 3'
	Antisens	5' TCACGCTCTTCAGACTTTGG 3'
MMP9	Sens	5' GAACCAATCTCACCGACAGG 3'
	Antisens	5' GCCCCAGAGATTCGACTC 3'
MMP13	Sens	5' CCTGGACAAGTAGTCCAAAGG 3'
	Antisens	5' GCCGGTGTAGGTGTAGATAGGA 3'

Timp1	Sens	5' GGGCTTCACCAAGACCTACA 3'
	Antisens	5' TGCAGGGGATGGATAAACAG 3'
Timp2	Sens	5' AGAAGAGCCTGAACCACAGG 3'
	Antisens	5' TGACCCAGTCCATCCAGAG 3'
c-flip	Sens	5' CAGGAACCCTCACCTTGTTT 3'
	Antisens	5' CAGATTTATCCAAATCCTCACCA 3'
c-met	Sens	5' TCTGCCTGCAATCTACAAGG 3'
	Antisens	5' ATTATTCCTCCGAAATCCAAAGT 3'
c-myc	Sens	5' CACCAGCAGCGACTCTGA 3'
	Antisens	5' GATCCAGACTCTGACCTTTTGC 3'
Nfatc1	Sens	5' ATGAAGTCAGCGGAGGAAGA 3'
	Antisens	5' GTGTGGAGGTCTGAAGGTTGT 3'
Nfkb	Sens	5' ATAATGCCTCCGGCTGAGT 3'
	Antisens	5' CCTCCACCAGCTCTCTGACT 3'
TGFB1	Sens	5' GAGCCCAAGGGCTACCAT 3'
	Antisens	5' GGGTTATGCTGGTTGTACAGG 3'

## **Annexe 4 | Articles et revues publiés au cours de la thèse**



## OPEN ACCESS

# RANK–RANKL signalling in cancer

Nathalie Renema\*<sup>1</sup>, Benjamin Navet\*<sup>1</sup>, Marie-Françoise Heymann\*†‡, Frédéric Lezot\*<sup>2</sup> and Dominique Heymann\*†‡<sup>2</sup>

\*INSERM, UMR 957, Equipe Labellisée Ligue 2012, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France

†Nantes University Hospital, Nantes 44035, France

‡Department of Oncology and Human Metabolism, The University of Sheffield, Sheffield S10 2RX, U.K.

## Synopsis

Oncogenic events combined with a favourable environment are the two main factors in the oncological process. The tumour microenvironment is composed of a complex, interconnected network of protagonists, including soluble factors such as cytokines, extracellular matrix components, interacting with fibroblasts, endothelial cells, immune cells and various specific cell types depending on the location of the cancer cells (e.g. pulmonary epithelium, osteoblasts). This diversity defines specific “niches” (e.g. vascular, immune, bone niches) involved in tumour growth and the metastatic process. These actors communicate together by direct intercellular communications and/or in an autocrine/paracrine/endocrine manner involving cytokines and growth factors. Among these glycoproteins, RANKL (receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand) and its receptor RANK (receptor activator nuclear factor), members of the TNF and TNFR superfamilies, have stimulated the interest of the scientific community. RANK is frequently expressed by cancer cells in contrast with RANKL which is frequently detected in the tumour microenvironment and together they participate in every step in cancer development. Their activities are markedly regulated by osteoprotegerin (OPG, a soluble decoy receptor) and its ligands, and by LGR4, a membrane receptor able to bind RANKL. The aim of the present review is to provide an overview of the functional implication of the RANK/RANKL system in cancer development, and to underline the most recent clinical studies.

**Key words:** microenvironment, oncogenesis, RANK, RANKL

Cite this article as: Bioscience Reports (2016) 36, e00366, doi:10.1042/BSR20160150

## INTRODUCTION

In a physiological context, a healthy tissue microenvironment provides an adapted 3D microarchitecture with essential inter-cellular signalling, thus ensuring appropriate function. This tissue homeostasis acts as a barrier to tumour development by inhibiting excessive cell growth and/or migration. Indeed, this fragile equilibrium can be destabilized by any alterations to cell communications, or interaction between cells and extracellular matrix components and consequently can become a fertile environment for cancer cells, promoting their malignant transformation and their proliferation [1]. The conjunction between one or more oncogenic events and this fertile environment can lead to the development of a tumour mass, which is frequently linked to the tumour cells escaping from the immune system [2]. In

fact, this description reflects the “seed and soil” theory proposed by Stephan Paget in 1889 to explain preferential metastatic sites depending on tumour subtype [3].

This “soil” or tumour microenvironment is a very complex and dynamic organization, defined by three main “niches” depending on their functional implication: (i) an immune niche involved in local immune tolerance, (ii) a vascular niche associated with tumour cell extravasation/migration and (iii) a metastatic niche (e.g. bone, lung, liver) hosting the metastatic tumour cells [4,5]. The notion of tumour niche was initially described for haematopoietic stem cells, for which the bone microenvironment is composed of complex signalling pathways that carefully regulate stem cell renewal, differentiation and quiescence [6]. The concept of tumour niche was then extended to bone metastases, such as breast or prostate cancers [7–9]. Lu et al. [10] described a model of bone metastasis dormancy in breast cancer where

**Abbreviations:** EMT, epithelial mesenchymal transition; LRG4, leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4; OPG, osteoprotegerin; OPL, osteoprotegerin ligand; RANK, receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B; RANKL, receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand; TAM, tumour-associated macrophage; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ; TRAF, TNF-receptor associated factor; TRAIL, TNF related apoptosis inducing ligand; TRANCE, tumour necrosis factor-related activation-induced cytokine.

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

<sup>2</sup> Correspondence may be addressed to either of these authors (email dominique.heyman@sheffield.ac.uk or frederic.lezot@univnantes.fr).





VCAM-1, aberrantly expressed, promoted the transition from indolent micrometastasis to proliferating tumour by recruiting and activating *in situ* osteoclastic cells. More recently, Wang et al. [11] analysed the distribution of human prostate cancer cell lines colonizing mouse bones after intracardiac injection of tumour cells and demonstrated that homing of prostate cancer cells was associated with the presence of activated osteoblast lineage cells. These two recent manuscripts are perfect examples of the involvement of the tumour environment in the biology of bone metastases.

The tumour microenvironment thus provides all the factors necessary for cancer cell survival, dormancy, proliferation or/and migration [10] and very often, tumour cells divert this environment in their favour [7–9]. Indeed, this specific microenvironment has recently been involved in the maintenance of cancer cell dormancy [12–14] and may also play a part in drug resistance mechanisms by controlling the balance between cell proliferation and cell death, or by secreting soluble factors that dysregulate the cell cycle checkpoints, the cell death associated signalling pathways, or drug efflux [15,16].

Cell communications in physiological and pathological conditions are promoted by physical contacts involving adhesion molecules and channels, but also by a very high number of soluble mediators called cytokines and growth factors which appear to be the key protagonists in the dialogue established between cancer cells and their microenvironment [16]. These polypeptidic mediators perform their activities in an autocrine, paracrine or juxtacrine manner leading to inflammatory foci and the establishment of a vicious cycle between cancer cells and their local niches [17–19]. These proteins also have endocrine activities and contribute in this way to both the formation of a chemoattractant gradient and the metastatic process.

Considerable diversity in the cytokines and growth factors playing a role in cancer development has been identified in the last four decades. Some of them can be considered to be biological markers for aggressiveness, or to be prognostic factors, whereas others are also regarded as therapeutic targets. Among cytokine families, in the last 15 years, the biology of receptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and its receptor RANK has been widely studied in cancer [20–23] and has been identified as a key therapeutic target in numerous cancer entities, as described below. The present review gives a synthesis of RANK/RANKL pathway involvement in the carcinogenesis process. Their direct or indirect activities in oncogenic events will be described, as will their recent therapeutic applications.

## RANKL/RANK SYSTEM: DISCOVERY, MOLECULAR AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

The superfamily of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) is composed of more than 40 members and is associated with a similar number of membrane or soluble receptors. RANKL is one member of the TNF- $\alpha$  superfamily (TNFSF11) and binds to a membrane receptor named receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK),

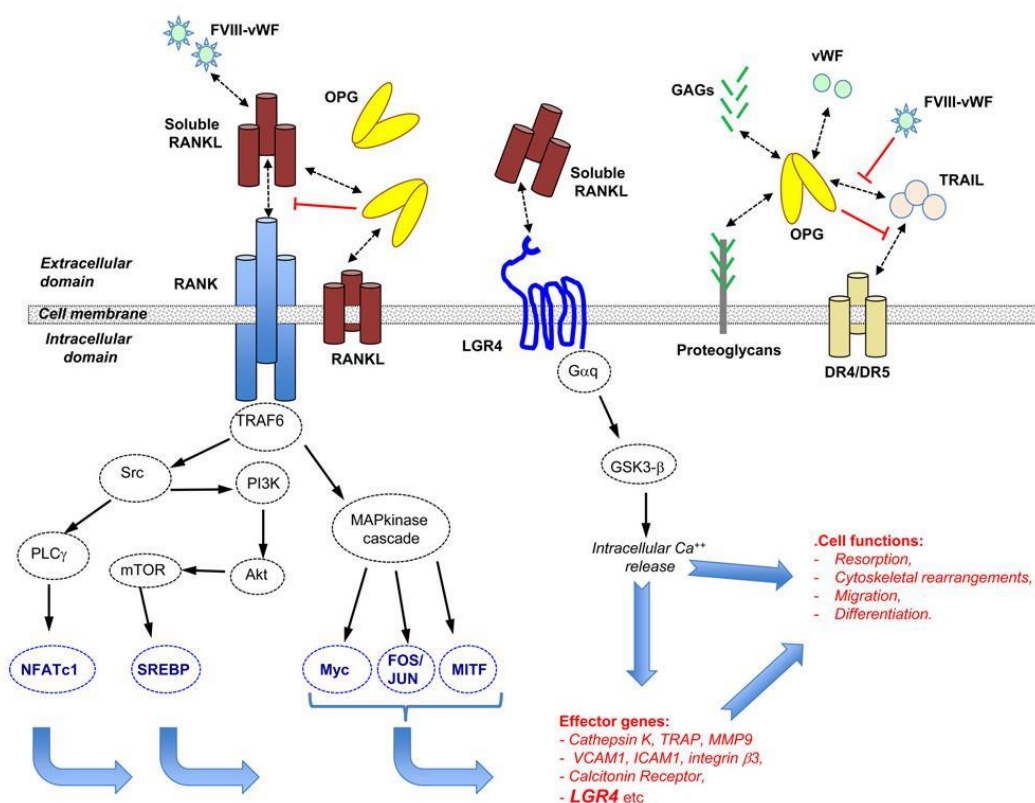
a member of the TNF receptor superfamily (TNFRSF11A) [20–30]. The interactions between RANKL and RANK lead to specific intracellular signal transduction and are controlled by a decoy receptor called osteoprotegerin (OPG) (TNFRSF11B) [27] (Figure 1).

### RANKL

RANKL has alternatively been called tumour necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE) [26], osteoprotegerin ligand (OPGL) [27,28] and osteoclastic differentiation factor (ODF) [29,30]. Although RANKL is the name commonly used, the official nomenclature of this cytokine is TNFSF11. RANKL is a homotrimeric type II membrane protein with no signal peptide and existing in three isoforms due to alternative splicing of the same gene [31]. Among these isoforms, the full-length RANKL is called RANKL1, RANKL2 is a shorter form of RANKL1 in which a part of the intra-cytoplasmic domain is missing and RANKL 3 is a soluble form of RANKL, with the N-terminal part of the amino acids deleted [31]. A soluble RANKL can also result from the shedding of membrane-RANKL induced by various enzymes such as the metalloproteinase disintegrin TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) [32] or ADAM-10, MMP-7, MMP-14 [33,34]. RANKL is expressed by a wide variety of tissues such as the brain, skin, intestine, skeletal muscle, kidney, liver, lung and mammary tissue, but is more highly expressed in bone tissue [35], lymphoid organs and the vascular system [36]. The control of bone remodelling is the predominant function of RANKL. Indeed, RANKL effectively regulates the bone resorption process by stimulating osteoclast differentiation and osteoclast survival [37,38]. Whether RANKL is expressed by osteoblasts, osteocytes, chondrocytes or stromal cells, osteocytes are its main source in adult bone [39,40]. The role of RANKL is not restricted to the bone tissue and RANKL also plays an important role in the immune system, increasing the ability of dendritic cells to stimulate both naive T-cell proliferation and the survival of RANK<sup>+</sup> T-cells [25,26,41]. In this context, Wong et al. [27] demonstrated that RANKL is a specific survival factor for dendritic cells. Overall, RANKL is one of the key factors at the crossroad between bones and immunity, a topic called “osteimmunology” [42].

### RANK

RANK, also known as TRANCE receptor [43] and TNFRSF11A, is the signalling receptor for RANKL [25]. RANK belongs to the TNF superfamily receptors and is a type I transmembrane protein. This receptor has a large cytoplasmic domain at its C-terminal domain, a N-terminal extracellular domain with four cysteine-rich repeat motifs and two N-glycosylation sites [21]. Its last domain is involved in the interaction with RANKL and the induction of the receptor's trimerization [44,45]. RANK mRNAs have been detected in many tissues such as the thymus, mammary glands, liver and prostate, but more significantly in bone [21,25]. By transducing the cell signalling initiated by RANKL, RANK plays a part in controlling bone remodelling and immunity [46,47].



**Figure 1** RANK/RANKL signalling in cancer cells: a very complex molecular network

RANKL is a trimeric complex produced in a membrane or soluble form. Secreted RANKL can be produced from a specific transcript or by proteolysis of its membrane form. Trimeric RANKL interacts with a trimeric receptor named RANK and triggers a signalling cascade controlling the transcription of numerous effector genes. Additional protagonists intervene to regulate the binding of RANKL to RANK. In this way, OPG acts as a decoy receptor interacting with RANKL, and complex VIII (FVIII-vWF) showed a similar capacity. However, OPG is itself controlled by many ligands, including TRAIL, vWF and glycoaminoglycans (GAGs), and the final inhibitory effect of OPG on RANKL is dependent on its binding to these ligands. Very recently, it has been demonstrated that LGR4 is a new receptor for RANKL which can counterbalance the RANKL activities transmitted by RANK signalling.

Its functional activities have been clearly established by studying the phenotype of RANK knockout mice which exhibit severe osteopetrosis, with a lack of mature osteoclasts, and an absence of lymph node development with impairment in B- and T-cell maturation [48,49]. RANK is then the second key protagonist of “osteimmunology” [50].

## RANK/RANKL AND CANCER

### RANK expression identifies cancer cells as RANKL targets

The expression of RANK/RANKL is not restricted to healthy tissues and numerous studies have demonstrated their expression

in neoplastic tissues. This wide distribution strengthens the hypothesis of their key role in the oncogenic process (Table 1). Thus, a high percentage of carcinoma cells express RANK mRNA/protein at various levels [51,52]. Indeed, 89% of all the carcinomas assessed exhibit RANK positive immunostaining, and approximately 60% of cases showed more than 50% of positive cancer cells. Interestingly, RANK expression in carcinoma cells is a poor prognostic marker as demonstrated in breast cancer [86,87]. Similarly to prostate cancers, Pfitzner et al. [87] demonstrated that higher RANK expression in the primary breast tumour was associated with higher sensitivity to chemotherapy, but also a higher risk of relapse and death despite this higher sensitivity. RANK expression was also described as being predictive of poor prognosis in bone metastatic patients but not in



**Table 1 RANK and RANKL expression in cancers**

Cancer subtypes or related organ	RANK expressing tumours (references)	RANKL expressing tumours (references)
Bladder carcinoma	[51]	–
Breast carcinoma	[51–56]	[57–60]
Cervical cancer	[51,61]	[61]
Chondrosarcoma	[62]	[62,63]
Colon and rectal cancers	[51]	–
Endometrial tumours	[51]	–
Oesophageal tumours	[51,64]	–
Giant cell tumours of bone	[65]	[63–66]
Hepatocarcinoma	[51,67]	[67,68]
Lung cancer	[51,69]	[69]
Lymphoma	[51,70]	[71,72]
Melanoma	[73,74]	–
Myeloma	[75]	[75,76]
Neuroblastoma	[51]	[77]
Oral squamous carcinoma	[78]	[78]
Osteosarcoma	[63,79]	[63,79,80]
Prostate carcinoma	[51,73,81,82]	[81,83]
Renal carcinoma	[84]	[84]
Thymic tumours	[51]	–
Thyroid adenocarcinoma	[51,85]	[85]

patients with visceral metastases [88]. Similarly, sarcoma cells also express RANK (18–69% depending on the series) [79,89,90] and expression is correlated with clinical parameters. Trieb and Windhager [89] described a reverse correlation between RANK expression and the overall survival of patients with osteosarcoma, but not with the response to chemotherapy. These authors observed lower disease-free and overall survival rates in patients presenting RANK positive tumours. Bago-Horvath et al. revealed that RANKL expression was significantly more common in osteosarcoma of the lower extremity than in any other location and did not find any significant correlation between RANKL and disease-free or osteosarcoma-specific survival. However, they did report that RANK expression is a negative prognostic factor regarding disease-free survival, confirming the data obtained by Trieb and Windehager [89]. Interestingly, in 2012, Papanastasiou et al. [91] identified a new isoform of RANK (named RANK-c) generated by alternative splicing and expressed in breast cancer samples. Its expression was reversely correlated with histological grade and RANK-c was able to inhibit cell motility and the migration of breast cancer cells by interfering with RANK signalling.

In several studies [87,90], RANKL expression was not correlated with any clinical outcomes in either carcinoma or sarcoma. However, in one series of 40 patients, Lee et al. [92] showed that RANKL expression was related to poor response to preoperative chemotherapy and a high RANKL level was associated with inferior survival. Recently, Cathomas et al. [93] described an

interesting clinical case of an osteosarcoma patient treated with sorafenib and denosumab. RANK and RANKL were expressed by the tumour cells and the authors observed complete metabolic remission for over 18 months strengthening the potential therapeutic value of blocking RANK/RANKL signalling in osteosarcoma [93]. Whereas RANK is expressed by various cancer cell types, its ligand can be produced either by tumour cells or by their environment (Table 1). Consequently, RANKL can then act in a paracrine or autocrine manner on cancer cells. The best example of such paracrine activity is given by the role of RANK/RANKL in the pathogenesis of giant cell tumours in bone. RANK is expressed by giant osteoclasts and the macrophagic component of the tumours, whereas RANKL is produced by stromal cells. Furthermore, exacerbated production of RANKL by stromal cells is directly associated with an increase in osteoclastogenesis and bone destruction [94]. This observation identifies the giant cell tumours in bone as very good candidates for the clinical use of Denosumab [95].

#### Direct RANK/RANKL signalling in cancer cells: the regulatory activities of OPG and LGR4

RANK, like the other receptors in the TNF receptor superfamily, is characterized by the absence of tyrosine kinase activity and consequently requires adapter proteins named TNF-receptor associated factor (TRAF) in order to transmit cell signalling. The intracellular domain of RANK has two TRAF binding sites able to interact with TRAF-2, -3, -5 and -6 [96,97], but only TRAF6 mutations led to an osteopetrotic phenotype similar to the phenotype of RANK knockout mice, thus underlining the predominant role of TRAF6 in RANK associated signalling among the TRAF family members [96–101]. Consecutively, TRAF6 leads to the activation of Src/PLC $\gamma$ , PI3K/Akt/mTOR and MAPK (p38, JNK, ERK1/2) cascades which result in the translocation of transcriptional activators including NF- $\kappa$ B, Fos/Jun or MITF and subsequently to the transcription of numerous effector genes involved in bone resorption such as cathepsin K or TRAP, in cell adhesion and motility such as VCAM1 or ICAM1. This explains the various functional impacts that RANKL has on normal and cancer cells (Figure 1).

The first identified regulator of RANKL activities was a soluble protein named OPG [102,103]. OPG is considered to be a ubiquitous protein with predominant expression in bone (osteoblasts, mesenchymal stem cells), immune cells (dendritic cells, T- and B-cells) and vessels (endothelial and vascular smooth muscle cells) [21,104]. OPG acts as a decoy receptor for RANKL, and blocks the RANK–RANKL interaction and RANKL-induced signalling pathways with its N-terminal [11,89]. OPG and RANKL expression are both regulated by inflammatory cytokines released into the microenvironment of cancer cells, and RANKL activities will result from the level of expression and the kinetics of both factors in this microenvironment [21,105]. OPG binds to soluble and membrane RANKL and strongly controls RANKL bioavailability at the cell membrane by facilitating its internalization and reducing its half-life [106]. However, OPG possesses numerous other ligands which

markedly regulate its expression and have an impact on RANKL availability (Figure 1) [104]. In this way, OPG binds to glycosaminoglycans and proteoglycans such as syndecan-1 through its heparin-binding domain with a strong influence on cancer cell development [104,107]. The best illustration of the functional consequence of this interaction in cancer is given by myeloma cells which overexpress syndecan-1 [108]. OPG produced in the bone microenvironment is trapped, internalized and degraded by myeloma cells and the OPG/RANKL balance is then dysregulated in favour of RANKL. The OPG/RANKL imbalance leads to bone resorption, a phenomenon exacerbated by the RANKL production of the myeloma cells. By sequestering OPG, myeloma cells elaborate a microenvironment that facilitates their expansion. Similarly, OPG can be trapped by the proteoglycans and glycosaminoglycans located in the extracellular matrix as shown in osteosarcoma [109]. In addition, OPG binds TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), a key natural pro-apoptotic and “anti-cancer” factor [110]. By this way, OPG can thus act as an anti-apoptotic and a pro-proliferative factor for cancer cells by blocking TRAIL activity, as shown with prostate carcinoma for instance [111]. Complex VIII (factor VIII-von Willebrand factor) is also able to bind to OPG and increases the complexity of this system by regulating TRAIL-induced cancer cell death [112]. Finally, RANKL expressed by the tumour cells or/and their environment by exerting its action through RANK in an autocrine, endocrine or paracrine manner contributes to establishing the fertile soil needed for tumour cells to be maintained and proliferate. In this picture, OPG and its ligands are notably involved in the bioavailability and biological activities of RANKL.

Very recently, a new RANKL receptor named leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LRG4) characterized by seven transmembrane regions, has been identified [113]. In this work, Luo et al. [113] revealed that RANKL binds to the extracellular domain of LGR4 and by this way negatively regulates osteoclastogenesis through activation of  $G\alpha q/GS3K-\beta$  signalling and repression of the NFATc1 pathway (Figure 1). Moreover, *Lgr4* is a transcriptional target of the canonical RANKL–NFATc1, which shows that LGR4 signalling acts as the feedback loop controlling RANKL activities. Interestingly, a mutation in LGR4 encoding gene has been related to an osteoporosis phenotype which can be explained by the new function of LGR4 as a RANKL receptor [114]. Although the involvement of the LRG4–RANKL axis in cancer has not yet been clearly determined, LGR4 nevertheless promotes the proliferation of various tumour cells, including breast, prostate, gastric and hepatic cancer [115]. This proliferation effect was linked to activation of the Wnt/ $\beta$  catenin signalling pathways. LRG4 appears to be a new regulator for prostate development and promotes tumorigenesis [116,117] and the LRG4-Stat3 molecular pathway may control osteosarcoma development [118].

RANKL activities are modulated by the balance between RANKL and their various molecular regulators produced in the microenvironment of cancer cells. RANKL is involved in each stage of tumour development, from the initial oncogenesis pro-

cess to the establishment of the distant metastases as described below (Figure 2).

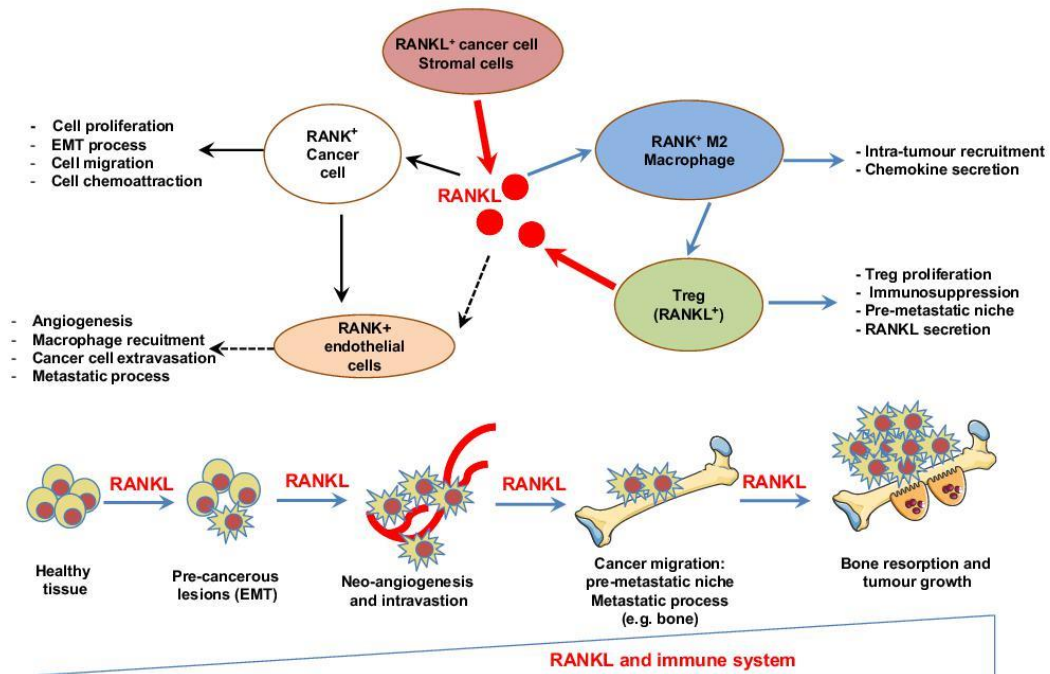
### The RANK/RANKL axis is involved in the initial phases of tumour development

Initially considered to be a pro-metastatic factor, our vision of RANKL changed when the factor was linked to mammary gland development [119]. RANKL deficiency leads to a defect in the formation of the lobo-alveolar structures required for lactation [120,121]. In addition, RANKL is able to promote the survival and proliferation of epithelial cells simultaneously with the up-regulated expression of RANK during mammary gland development [119–121]. Disturbance in this coordinated mechanism can lead to the formation of pre-neoplasias and subsequently to that of tumour foci, as revealed by Gonzalez-Suarez et al. [122]. These authors established a mouse mammary tumour virus – RANK transgenic mice overexpressing the protein in mammary glands – and reported a high incidence of pre-neoplasia foci (multifocal ductal hyperplasias, multifocal and focally extensive mammary intraepithelial neoplasias), as well as the development of adenocarcinoma lesions in these transgenic mice compared with the wild-type mice. Confirming the involvement of RANKL in the initial oncogenic process, administration of RANK-Fc decreased both mammary tumorigenesis and the development of lung metastases in MMTV-*neu* transgenic mice, a spontaneous mammary tumour model [122]. In a complementary work, this team demonstrated that the RANKL/RANK axis was pro-active in epithelial mesenchymal transition (EMT), promoted cell migration simultaneously with neo-vascularization, and that their expression was significantly associated with metastatic tumours [123]. Overall, their data revealed that RANK/RANKL signalling promotes the initial stage in breast cancer development by inducing stemness and EMT in mammary epithelial cells. A similar process has been confirmed in head and neck squamous carcinoma [124], and in endometrial cancer [125], and RANKL expression has been associated with the EMT and appears to be a new marker for EMT in prostate cancer cells [83].

### RANK/RANKL system controls cell motility and consequently contributes to the metastatic process concomitantly with a pro-angiogenic function

Jones et al. [95] provided the first evidence of a chemoattractant activity for RANKL. These authors demonstrated that RANKL produced by osteoblasts and bone marrow stromal cells attracts RANK-expressing cancer cells and induces their migration. This mechanism seems to be relatively universal and was observed in prostate cancer [95,126,127], breast cancer [95], colon cancer [58], melanoma [95], oral squamous carcinomas [128], lung cancer [129], hepatocarcinoma [130], endometrial cancer [131], osteosarcoma [132,133] and renal cancer [134]. RANKL-induced migration is associated with specific signalling cascades, especially the activation of MAP Kinase pathways. The RANKL/RANK axis then regulates cancer cell migration





**Figure 2 RANK/RANKL is involved in each stage of cancer development: from pre-cancerous lesions to the establishment of metastases**

Cancer cells are direct targets for RANKL. RANKL initiates the formation of pre-cancerous lesions by facilitating the EMT process and stemness, as well as facilitating tumour growth and the metastatic process by modulating immune and vascular niches. Throughout these processes, RANKL acts as a chemoattractive factor for cancer cells and M2 macrophages. Activated macrophages facilitate both the proliferation of Treg lymphocytes, the main source of RANKL during primary tumour growth, and the initiation of the pre-metastatic niche in bone. RANKL up-regulates the angiogenic process by stimulating the proliferation and survival of endothelial cells and, in parallel, of the metastatic process by promoting the extravasation/intravasation of RANK-expressing cancer cells and their migration to distant organs. The RANKL concentration gradient drives the tumour cells to the metastatic sites.

and RANKL acts as a chemoattractive agent on cells that express one of their receptors.

In addition to its direct effects on cancer cells, RANKL is notably able to modulate the tumour microenvironment, in particular the formation of new blood vessels. Blood vessels are used by cancer cells to deliver large quantities of nutrients and are their main means of migrating so as to invade distant organs. RANK expression was detected in endothelial cells, and by interacting with this receptor, RANKL impacts the angiogenic process by both stimulating angiogenesis through an Src and phospholipase C-dependent mechanism [135,136], and increasing cell survival in a PI3k/Akt-dependent manner [137]. RANKL also induced the proliferation of endothelial cell precursors and the neoformation of vascular tubes [138]. This phenomenon is exacerbated by VEGF, which is frequently secreted by cancer cells and which up-regulates the RANKL response of endothelial cells by an up-regulation of RANK expression and an increase in

vascular permeability [139]. These works strengthen the role of RANK/RANKL axis plays in the metastatic process by regulating cancer cell migration and the neoangiogenesis.

### Immune cell regulation by RANK/RANKL: setting up fertile soil for cancer cells

RANKL influences the microenvironment of cancer cells by acting on local immunity. The major role of RANKL in the immune system was initially identified in RANKL-knockout mice in which the development of secondary lymphoid organs was impaired, especially the lymph nodes [140,141], but also at the “central” level, where the maturation of the thymic epithelial cells necessary for T-cell development was affected [142,143]. RANKL is also involved in modulating the immune response by inducing T-cell proliferation [25] and dendritic cell survival [26]. T-cells activated as a result of RANKL expression stimulate

**Table 2 Main clinical trials based on RANKL targeting in cancers**

Source: clinical trial.gov March 2016.

Clinical trial reference	Phase, cancer type	Title	Primary outcome	Patients enrolled	Treatment (references)
NCT01624766	I, Advanced malignancies	A Phase I Trial of anakinra (IL-1 receptor antagonist) or denosumab (anti-RANKL monoclonal antibody) in combination with everolimus (mTOR inhibitor) in patients with advanced malignancies	Maximum tolerated dose	147	Escalating dose of denosumab Starting doses: everolimus 10 mg by mouth daily for a 28 day cycle. Denosumab 120 mg (s.c.) on Day 1 of a 28 day cycle
NCT01419717	III, Advanced cancer	Open-label access protocol of denosumab for subjects with advanced cancer	Subject incidence of treatment-emergent adverse events	129	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks
NCT01920568	III, Bone metastases from solid tumours	A study comparing denosumab with zoledronic acid in subjects of Asian ancestry with bone metastases from solid tumours	Percent change from baseline in the bone turnover marker (uNTx/uCr)	477	120 mg denosumab (s.c.) injection for a maximum of 13 doses, infusion over $\geq 15$ min once every 4 weeks
NCT02470091	II, Osteosarcoma	Phase II study of denosumab, a RANK ligand antibody, for recurrent or refractory osteosarcoma	Disease control rate at months 4 and 12	90	Denosumab (s.c.) on day 1 (days 1, 8 and 15 of course 1 only). Treatment repeats every 4 weeks (28 days) for up to 24 months or 26 courses
NCT00396279	II, Giant cell tumours of bone	An open-label, multicenter, phase 2 safety and efficacy Study of denosumab (AMG 162) in subjects with recurrent or unresectable giant cell tumour of bone	Percentage of patients with tumour response	37	120 mg denosumab (s.c.) once every 4 weeks, with an additional 120 mg doses on Days 8 and 15 of the first month of treatment + daily supplements of at least 500 mg of calcium and 400 IU of vitamin D
NCT00680992	II, Giant cell tumours of bone	An open-label, multicenter, phase 2 study of denosumab in subjects with giant cell tumour of bone	Safety profile of denosumab	530	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks with a loading dose of 120 mg (s.c.) on study days 8 and 15
NCT01951586	II, Non-small cell lung cancer	A randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial of denosumab in combination with chemotherapy as first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer	Relative benefit on overall survival	226	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks with a loading dose of 120 mg (s.c.) on study days 8 and 15
NCT02129699	III, Non-small cell lung cancer	A randomized, open-label phase III trial evaluating the addition of denosumab to standard first-line anti-cancer treatment in advanced NSCLC	Overall survival	1000	120 mg denosumab (s.c.) every 3–4 weeks + 4/6 cycles of standard (combination of platinum-based agents plus gemcitabine or pemetrexed)



Table 2 Continued

Clinical trial reference	Phase, cancer type	Title	Primary outcome	Patients enrolled	Treatment (references)
NCT00259740	II, Multiple myeloma	An open-label, multicenter phase 2 trial of denosumab in the treatment of relapsed or plateau-phase multiple myeloma	Complete or partial response based on M-protein assessments	96	120 mg denosumab (s.c.) on study days 1, 8, 15 and 29 and every 4 weeks thereafter
NCT01345019	III, Multiple myeloma	A randomized, double-blind, multicenter study of denosumab compared with zoledronic acid in the treatment of bone disease in subjects with newly diagnosed multiple myeloma	Time to the first on-study skeletal related event	1700	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks
NCT00330759	III, Multiple myeloma	A randomized, double-blind, multicenter study of denosumab compared with zoledronic acid (Zometa) in the treatment of bone metastases in subjects with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma	Time to the first on-study skeletal-related event	1779	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks
NCT02099461	I, Healthy patients, breast	A randomized, stratified, open-label, no-treatment-controlled, parallel group, multicenter phase 1 trial to evaluate the effect of denosumab on cellular proliferation in the human breast	Ratio of post-baseline to baseline Ki-67 index in mammary epithelial cells	82	Healthy volunteers, 60 mg denosumab (s.c.) on day 1 Percutaneous core needle breast biopsies on day 1 (prior to study treatment) and day 28
NCT01545648	II, Early breast cancer	Pilot study to evaluate the impact of denosumab on disseminated tumour cells in patients with early stage breast cancer	Reduction of bone marrow disseminated tumour cells	45	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks for total of 6 months, then every 12 weeks for two doses, for a total treatment course of one year
NCT01952054	II, Breast cancer	Phase II study of denosumab to define the role of bone related biomarkers in breast cancer bone metastasis	Reduction of circulating tumour cells	35	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks (+ hormone therapy)
NCT01864798	II, Early breast cancer	A pre-operative window study evaluating denosumab, a RANK ligand (RANKL) inhibitor and its biological effects in young premenopausal women diagnosed with early breast cancer	Geometric mean change in tumour Ki-67 expression	39	Denosumab, from 30 to 120 mg (s.c.) once a every 4 or 12 weeks for 25 weeks

Table 2 Continued

Clinical trial reference	Phase, cancer type	Title	Primary outcome	Patients enrolled	Treatment (references)
NCT00091832	II, Breast cancer with bone metastases	A randomized active-controlled study of AMG 162 in breast cancer subjects with bone metastasis who have not previously been treated with bisphosphonate therapy	Percent change from baseline to week 13 in creatinine-adjusted urinary N-telopeptide	255	Denosumab, from 30 to 180 mg (s.c.) once a every 4 or 12 weeks for 25 weeks
NCT01077154	III, Early breast cancer	A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase 3 study of denosumab as adjuvant treatment for women with early-stage breast cancer at high risk of recurrence (D-CARE)	Bone metastasis-free survival	4509	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks for 6 months. 120mg (s.c.) every 3 months for the next 4 and a half years Supplementation: oral calcium (at least 500 mg) and vitamin D (at least 400 IU) for 5 years
NCT00321464	III, Breast cancer with bone metastases	A randomized, double-blind, multicenter study of denosumab compared with zoledronic acid (Zometa®) in the treatment of bone metastases in subjects with advanced breast cancer	Time to first on-study skeletal related event	2049	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks
NCT00089661	III, Non-metastatic breast cancer	A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate AMG 162 in the treatment of bone loss in subjects undergoing aromatase inhibitor therapy for non-metastatic breast cancer	Lumbar spine bone mineral density percent change from baseline at month 12	252	Denosumab 60 mg (s.c.) every 6 months, beginning on Study day 1, for a total treatment period of 24 months
NCT02613416	II, Breast biomarkers	Phase II correlative study of denosumab effects on tissue and imaging breast biomarkers (pre- and post-menopausal women diagnosed with stage 0-III breast cancer)	Safety issue	44	120 mg denosumab (s.c.) per month



**Table 2 Continued**

Clinical trial reference	Phase, cancer type	Title	Primary outcome	Patients enrolled	Treatment (references)
NCT00321620	III, Prostate cancer with bone metastases	A randomized, double-blind, multicenter study of denosumab compared with zoledronic acid (Zometa®) in the treatment of bone metastases in men with hormone-refractory prostate cancer	Time to the first on-study skeletal-related event	1904	120 mg denosumab (s.c.) every 4 weeks Zoledronic acid 4 mg (i.v.)
NCT00286091	III, Non-metastatic prostate cancer	A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase 3 study of denosumab on prolonging bone metastasis-free survival in men with hormone refractory prostate cancer	Bone metastasis-free survival	1435	Denosumab 120 mg (s.c.) every 4 weeks
NCT00089674	III, Non-metastatic prostate cancer	A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate AMG 162 in the treatment of bone loss in subjects undergoing androgen-deprivation therapy for non-metastatic prostate cancer	Lumbar spine bone mineral density percent change from baseline at month 24	1468	Denosumab 60 mg (s.c.) at day 1, months 6, 12, 18, 24, 30
NCT01824342	III, Prostate cancer	An open label, single arm, extension study to evaluate the long term safety of denosumab for prolonging bone metastasis-free survival in men with hormone-refractory prostate cancer	Number of patients with treatment-emergent adverse events and deaths	18	Denosumab 120 mg (s.c.) every 4 weeks for up to 3 years

dendritic cells, expressing RANK, to enhance their survival and thereby increase the T-cell memory response [25]. More recently, Khan et al. [144] demonstrated that RANKL blockade can rescue melanoma-specific T-cells from thymic deletion, and increases the anti-tumour immune response as shown in melanoma.

Tumour-associated macrophages (TAMs) accumulate in the tumour microenvironment and, depending on their M2 or M1 phenotype, play a part in tumour growth, angiogenesis and metastasis [145]. RANK is present at the cell membrane of monocytes/macrophages and RANKL acts as a chemoattractant factor for these cells [146]. The M2-macrophages which mainly express RANK is strongly associated with the angiogenic process [147]. RANK/RANKL signalling in the M2-macrophages modulates the production of chemokines, promoting the proliferation of Treg lymphocytes in favour of an immunosuppressive environment [148]. In breast carcinoma, RANKL is mainly produced by Treg lymphocytes (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-lymphocytes expressing Foxp3). In this context, a vicious cycle is established between

TAMs, Treg and tumour cells resulting in tumour growth, the spread of cancer cells and amplification of the metastatic process [149]. In fact, T-lymphocytes appear to be the principal source of RANKL in tumorigenesis. Whether RANKL-producing T-lymphocytes are involved in the initial step of metastatic process or not, T-lymphocytes induce a permissive environment initiating the pre-metastatic niche [150].

#### RANK/RANKL and bone niche: ongoing clinical trials

When proliferative tumour cells are located in the bone environment (primary bone tumours or bone metastases), they dysregulate the balance between bone apposition and bone resorption in order to create a favourable microenvironment for their growth [151]. In this way, this bone microenvironment becomes a source of therapeutic targets, RANKL being one of them [152]. OPG-Fc was the first generation of drug targeting RANKL to be assessed

in postmenopausal women [152]. Nevertheless, due to its ability to bind to multiple ligands, and particularly to TRAIL, OPG-Fc based clinical trials have been suspended until the development of a monoclonal antibody targeting RANKL [153]. Denosumab, a fully-humanized antibody targeting RANKL and blocking its binding to RANK, has been developed to bypass this risk [51]. In osteoporotic patients, Denosumab was well-tolerated and a single s.c. dose resulted in a prolonged decrease in bone turnover [154]. The value of blocking RANKL activities has been also demonstrated by the inhibition bone resorption in numerous pre-clinical models of primary bone tumours (Ewing sarcoma [155], osteosarcoma [156,157]), bone metastases (breast [158], prostate [159], non-small cell lung cancer [160]) and in myeloma [161]) and in numerous phase II and III clinical trials (Table 2). In breast and prostate carcinoma patients, bone turnover markers were reduced in a way similar to that in the osteoporosis context and, in addition, delayed the onset of the first skeletal-related event and the risk of multiple SRE [162]. A comparison with bisphosphonate therapy demonstrated the superiority of Denosumab concerning the two previous parameters even if the overall survival rate was similar with both drugs. Additional clinical trials in metastatic diseases are currently in progress and their results will be very informative with regard to the clinical extension of Denosumab in oncology.

## CONCLUSIONS

Since their initial discovery in 1997, RANK/RANKL became key actors in first bone remodelling and then more recently in oncology. This molecular axis is clearly involved in all stages of tumorigenesis, including tumour hyperplasia, pre-neoplasia foci formation, cancer cell migration, neo-angiogenesis, immune cell chemoattraction and the establishment of an immunosuppressive environment and initiation of a pre-metastatic niche. In one decade, RANK/RANKL has not only transformed our vision of bone biology but has also strengthened the notion of “seed and soil”, conventionally used to explain the metastatic process. Targeting RANK/RANKL signalling has already shown its therapeutic efficacy in osteoporotic patients and its clinical advantages in the management of bone metastases from breast and prostate carcinomas. Current ongoing clinical trials will be crucial for better defining its potential side effects after long term use.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Nathalie Renema is currently employed by the Laboratoire Affilié (Nantes, France) and is preparing her PhD at the University of Nantes (INSERM UMR957). Benjamin Navet received a PhD fellowship from the French Ministry of Research (2013–2016).

## FUNDING

This work was supported by the French Cancer League (Equipe Labellisée Ligue 2012).

## REFERENCES

- Bissell, M.J. and Hines, W.C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**, 320–329 [CrossRef PubMed](#)
- Molon, B., Cali, B. and Viola, A. (2016) T cells and cancer: how metabolism shapes immunity. *Front. Immunol.* **7**, 20 [CrossRef PubMed](#)
- Paget, S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **133**, 571–573 [CrossRef](#)
- Plaks, V., Kong, N. and Werb, Z. (2015) The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* **16**, 225–238 [CrossRef PubMed](#)
- Ordóñez-Morán, P. and Huelsken, J. (2014) Complex metastatic niches: already a target for therapy? *Curr. Opin. Cell Biol.* **31**, 29–38 [CrossRef PubMed](#)
- Molofsky, A.V., Pardoll, R. and Morrison, S.J. (2004) Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 700–707 [CrossRef PubMed](#)
- Wan, L., Pantel, K. and Kang, Y. (2013) Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med.* **19**, 1450–1464 [CrossRef PubMed](#)
- Shiozawa, Y., Berry, J.E., Eber, M.R., Jung, Y., Yumoto, K., Cackowski, F.C., Yoon, H.J., Parsana, P., Mehra, R., Wang, J. et al. (2016). The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.9251
- Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G. and Rüger, R. (2016) Molecular mechanisms of bone metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* **13**, 1–12 [PubMed](#)
- Lu, X., Mu, E., Wei, Y., Riethdorf, S., Yang, Q., Yuan, M., Yan, J., Hua, Y., Tiede, B.J., Lu, X. et al. (2011) VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging  $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell* **20**, 701–714 [CrossRef PubMed](#)
- Wang, N., Docherty, F.E., Brown, H.K., Reeves, K.J., Fowles, A.C., Ottewill, P.D., Dear, T.N., Hohen, I., Croucher, P.I. and Eaton, C.L. (2014) Prostate cancer cells preferentially home to osteoblast-rich areas in the early stages of bone metastasis: evidence from *in vivo* models. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 2688–2696 [CrossRef PubMed](#)
- Spill, F., Reynolds, D.S., Kamm, R.D. and Zaman, M.H. (2016) Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **40**, 41–48 [CrossRef PubMed](#)
- Meads, M.B., Hazlehurst, L.A. and Dalton, W.S. (2008) The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2519–2526 [CrossRef PubMed](#)
- David, E., Blanchard, F., Heymann, M.F., De Pinieux, G., Gouin, F., Rédini, F. and Heymann, D. (2011) The bone niche of chondrosarcoma: a sanctuary for drug resistance, tumour growth and also a source of new therapeutic targets sarcoma. *Sarcoma* **2011**, 932451 [CrossRef PubMed](#)
- Jones, V.S., Huang, R.Y., Chen, L.P., Chen, Z.S., Fu, L. and Huang, R.P. (2016) Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 255–265 [PubMed](#)
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P. and Hermoso, M.A. (2014) Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* **2014**, 149185 [CrossRef PubMed](#)
- Dinarello, C.A. (2006) The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 307–313 [CrossRef PubMed](#)
- Dranoff, G. (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22 [CrossRef PubMed](#)





- 19 Grivennikov, S.I. and Karin, M. (2011) Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 104–108 [CrossRef PubMed](#)
- 20 Walsh, M.C. and Choi, Y. (2014) Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front. Immunol.* **5**, 511 [CrossRef PubMed](#)
- 21 Theoleyre, S., Wittrant, Y., KwanTat, S., Fortun, Y., Redini, F. and Heymann, D. (2004) The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 457–475 [CrossRef PubMed](#)
- 22 Wittrant, Y., Théoleyre, S., Chipoy, C., Padrines, M., Blanchard, F., Heymann, D. and Redini, F. (2004) RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1704**, 49–57 [PubMed](#)
- 23 Yasuda, H. (2013) RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World J. Orthop.* **4**, 207–217 [CrossRef PubMed](#)
- 24 Li, J., Yin, Q. and Wu, H. (2013) Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv. Immunol.* **119**, 135–153 [CrossRef PubMed](#)
- 25 Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T cell growth and dendritic cell function. *Nature* **390**, 175–179 [CrossRef PubMed](#)
- 26 Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.L., Steinman, R.M. and Choi, Y. (1997) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a New TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**, 2075–2080 [CrossRef PubMed](#)
- 27 Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S. et al. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165–176 [CrossRef PubMed](#)
- 28 Kong, Y.Y., Boyle, W.J. and Penninger, J.M. (1999) Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 188–193 [CrossRef PubMed](#)
- 29 Kodaira, K., Kodaira, K., Mizuno, A., Yasuda, H., Shima, N., Murakami, A., Ueda, M. and Higashio, K. (1999) Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. *Gene* **230**, 121–127 [PubMed](#)
- 30 Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M. et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3597–3602 [CrossRef PubMed](#)
- 31 Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M. and Hirokawa, K. (2001) Determination of three isoforms of the Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* **142**, 1419–1426 [PubMed](#)
- 32 Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Temps, P., Choi, Y. and Blodet, C.P. (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**, 13613–13618 [CrossRef PubMed](#)
- 33 Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. and Tanaka, S. (2006) Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J. Biol. Chem.* **281**, 36846–36855 [CrossRef PubMed](#)
- 34 Georges, S., Ruiz Velasco, C., Trichet, V., Fortun, Y., Heymann, D. and Padrines, M. (2009) Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 29–41 [CrossRef PubMed](#)
- 35 Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N.J., Thomas, R.J., Hards, D.K., Quinn, J.M., Niforas, P., Ng, K.W., Martin, T.J. and Gillespie, M.T. (1999) Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* **25**, 525–534 [CrossRef PubMed](#)
- 36 Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W. and Osdoby, P. (2001) Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 20659–20672 [CrossRef PubMed](#)
- 37 Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K. and Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 199–204 [CrossRef PubMed](#)
- 38 Quinn, J.M., Elliott, J., Gillespie, M.T. and Martin, T.J. (1998) A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology* **139**, 4424–4427 [CrossRef PubMed](#)
- 39 Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J.J., Dusevich, V., Bonewald, L., Manolagas, S.C. and O'Brien, C.A. (2015) Osteocytes not osteoblasts or lining cells are the main source of the RANKL required for osteoclast formation in remodeling bone. *PLoS One* **10**, e0138189 [CrossRef PubMed](#)
- 40 Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I. et al. (1999) Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3540–3545 [CrossRef PubMed](#)
- 41 Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capprelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S. et al. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304–309 [CrossRef PubMed](#)
- 42 Takayanagi, H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292–304 [CrossRef PubMed](#)
- 43 Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Vologodskaja, M., Steinman, R.M. and Choi, Y. (1998) The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB Activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 28355–28359 [CrossRef PubMed](#)
- 44 Kanazawa, K. and Kudo, A. (2005) Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 2053–2060 [CrossRef PubMed](#)
- 45 Télétchéa, S., Stresing, V., Hervouet, S., Baud'huin, M., Heymann, M.F., Bertho, G., Charrier, C., Ando, K. and Heymann, D. (2014) Novel RANK antagonists for the treatment of bone resorptive disease: theoretical predictions and experimental validation. *J. Bone Miner. Res.* **29**, 1466–1477 [CrossRef PubMed](#)
- 46 Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D.M. and Suda, T. (1999) Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J. Exp. Med.* **190**, 1741–1754 [CrossRef PubMed](#)

- 47 Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) RANK is essential signalling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 396–400 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 48 Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G. et al. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 1566–1571 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 49 Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R. et al. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* **13**, 2412–2424 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 50 Baud'huin, M., Lamoureux, F., Duplomb, L., R dini, F. and Heymann, D. (2007) RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2334–2350 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 51 Santini, D., Perrone, G., Roato, I., Godio, L., Pantano, F., Grasso, D., Russo, A., Vincenzi, B., Fratto, M.E., Sabbatini, R. et al. (2011) Expression pattern of receptor activator of NF- B (RANK) in a series of primary solid tumors and related metastases. *J. Cell Physiol.* **226**, 780–784 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 52 Santini, D., Schiavon, G., Vincenzi, B., Gaeta, L., Pantano, F., Russo, A., Ortega, C., Porta, C., Galluzzo, S., Armento, G. et al. (2011) Receptor activator of NF- B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* **6**, e19234 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 53 Bhatia, P., Sanders, M.M. and Hansen, M.F. (2005) Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 162–165 [PubMed](#)
- 54 Park, H.S., Lee, A., Chae, B.J., Bae, J.S., Song, B.J. and Jung, S.S. (2014) Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **110**, 807–812 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 55 Pfitzner, B.M., Branstetter, D., Loibl, S., Denkert, C., Lederer, B., Schmitt, W.D., Dombrowski, F., Werner, M., R diger, T., Dougall, W.C. and von Minckwitz, G. (2014) RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 307–315 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 56 Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Koziaradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V. et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 57 Owen, S., Ye, L., Sanders, A.J., Mason, M.D. and Jiang, W.G. (2013) Expression profile of receptor activator of nuclear- B (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer. *Anticancer Res.* **33**, 199–206 [PubMed](#)
- 58 Van Poznak, C., Cross, S.S., Saggese, M., Hudis, C., Panageas, K.S., Norton, L., Coleman, R.E. and Hoken, I. (2006) Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *J. Clin. Pathol.* **59**, 56–63 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 59 Azim, Jr, H.A., Peccatori, F.A., Broh e, S., Branstetter, D., Loi, S., Viale, G., Piccart, M., Dougall, W.C., Pruneri, G. and Sotiriou, C. (2015) RANKL ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy. *Breast Cancer Res.* **17**, 24 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 60 Hu, H., Wang, J., Gupta, A., Shidfar, A., Branstetter, D., Lee, O., Ivancic, D., Sullivan, M., Chatterton, Jr, R.T., Dougall, W.C. and Khan, S.A. (2014) RANKL expression in normal and malignant breast tissue responds to progesterone and is up-regulated during the luteal phase. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 515–523 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 61 Shang, W.Q., Li, H., Liu, L.B., Chang, K.K., Yu, J.J., Xie, F., Li, M.Q. and Yu, J.J. (2015) RANKL/RANK interaction promotes the growth of cervical cancer cells by strengthening the dialogue between cervical cancer cells and regulation of IL-8 secretion. *Oncol. Rep.* **34**, 3007–3016 [PubMed](#)
- 62 Hsu, C.J., Lin, T.Y., Kuo, C.C., Tsai, C.H., Lin, M.Z., Hsu, H.C., Fong, Y.C. and Tang, C.H. (2010) Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration. *J. Cell Biochem.* **111**, 138–147 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 63 Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F. and Heymann, D. (2003) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am. J. Pathol.* **163**, 2021–2031 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 64 Yin, J., Wang, L., Tang, W., Wang, X., Lv, L., Shao, A., Shi, Y., Ding, G., Chen, S. and Gu, H. (2014) RANK rs1805034 T>C polymorphism is associated with susceptibility of esophageal cancer in a Chinese population. *PLoS One* **9**, e101705 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 65 Atkins, G.J., Kostakis, P., Vincent, C., Farrugia, A.N., Houchins, J.P., Findlay, D.M., Evdokiou, A. and Zannettino, A.C. (2006) RANK expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1339–1349 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 66 Branstetter, D.G., Nelson, S.D., Manivel, J.C., Blay, J.Y., Chawla, S., Thomas, D.M., Jun, S. and Jacobs, I. (2012) Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4415–4424 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 67 Song, F.N., Duan, M., Liu, L.Z., Wang, Z.C., Shi, J.Y., Yang, L.X., Zhou, J., Fan, J., Gao, Q. and Wang, X.Y. (2014) RANKL promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via NF- B-mediated epithelial–mesenchymal transition. *PLoS One* **9**, e108507 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 68 Sasaki, A., Ishikawa, K., Haraguchi, N., Inoue, H., Ishio, T., Shibata, K., Ohta, M., Kitano, S. and Mori, M. (2007) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 1191–1199 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 69 Peng, X., Guo, W., Ren, T., Lou, Z., Lu, X., Zhang, S., Lu, Q. and Sun, Y. (2013) Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* **8**, e58361 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 70 Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B. and Younes, A. (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* **98**, 2784–2790 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 71 Nosaka, K., Miyamoto, T., Sakai, T., Mitsuya, H., Suda, T. and Matsuoka, M. (2002) Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia: overexpression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on adult T-cell leukemia cells. *Blood* **99**, 634–640 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 72 Barcala, V., Ruybal, P., Garcia Rivello, H., Waldner, C., Ascione, A. and Mongini, C. (2003) RANKL expression in a case of follicular lymphoma. *Eur. J. Haematol.* **70**, 417–419 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 73 Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Koziaradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V. et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 [CrossRef](#) [PubMed](#)





- 74 Kupas, V., Weishaupt, C., Siepmann, D., Kaserer, M.L., Eickelmann, M., Metze, D., Luger, T.A., Beissert, S. and Loser, K. (2011) RANK is expressed in metastatic melanoma and highly upregulated on melanoma-initiating cells. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 944–955 [CrossRef PubMed](#)
- 75 Roux, S., Meignin, V., Quillard, J., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Fermand, J.P., Milgrom, E. and Mariette, X. (2002) RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **117**, 86–92 [CrossRef PubMed](#)
- 76 Farrugia, A.N., Atkins, G.J., To, L.B., Pan, B., Horvath, N., Kostakis, P., Findlay, D.M., Bardy, P. and Zannettino, A.C. (2003) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation *in vitro* and correlates with bone destruction *in vivo*. *Cancer Res.* **63**, 5438–5445 [PubMed](#)
- 77 Granchi, D., Amato, I., Battistelli, L., Avnet, S., Capaccioli, S., Papucci, L., Donnini, M., Pellacani, A., Brandi, M.L., Giunti, A. and Baldini, N. (2004) *In vitro* blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand prevents osteoclastogenesis induced by neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer* **111**, 829–838 [CrossRef PubMed](#)
- 78 Chuang, F.H., Hsue, S.S., Wu, C.W. and Chen, Y.K. (2009) Immunohistochemical expression of RANKL, RANK, and OPG in human oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **38**, 753–758 [CrossRef PubMed](#)
- 79 Mori, K., Le Goff, B., Berreur, M., Riet, A., Moreau, A., Blanchard, F., Chevalier, C., Guisle-Marsollier, I., Léger, J., Guicheux, J. et al. (2007) Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J. Pathol.* **111**, 555–562 [CrossRef](#)
- 80 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. and Koh, J.S. (2011) RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **56**, 738–743 [CrossRef PubMed](#)
- 81 Chen, G., Sircar, K., Aprikian, A., Potti, A., Goltzman, D. and Rabbani, S.A. (2006) Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* **107**, 289–298 [CrossRef PubMed](#)
- 82 Armstrong, A.P., Miller, R.E., Jones, J.C., Zhang, J., Keller, E.T. and Dougall, W.C. (2008) RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* **68**, 92–104 [CrossRef PubMed](#)
- 83 Odero-Marrah, V.A., Wang, R., Chu, G., Zayzafoon, M., Xu, J., Shi, C., Marshall, F.F., Zhou, H.E. and Chung, L.W. (2008) Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cell Res.* **18**, 858–870 [CrossRef PubMed](#)
- 84 Mikami, S., Katsube, K., Oya, M., Ishida, M., Kosaka, T., Mizuno, R., Mochizuki, S., Ikeda, T., Mukai, M. and Okada, Y. (2009) Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J. Pathol.* **218**, 530–539 [CrossRef PubMed](#)
- 85 Heymann, M.F., Riet, A., Le Goff, B., Battaglia, S., Paineau, J. and Heymann, D. (2008) OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul. Pept.* **148**, 46–53 [CrossRef PubMed](#)
- 86 Park, H.S., Lee, A., Chae, B.J., Bae, J.S., Song, B.J. and Jung, S.S. (2014) Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **110**, 807–812 [CrossRef PubMed](#)
- 87 Pfitzner, B.M., Branstetter, D., Loibl, S., Denkert, C., Lederer, B., Schmitt, W.D., Dombrowski, F., Werner, M., Rüdiger, T., Dougall, W.C. and von Minckwitz, G. (2014) RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 307–315 [CrossRef PubMed](#)
- 88 Zhang, L., Teng, Y., Zhang, Y., Liu, J., Xu, L., Qu, J., Hou, K., Yang, X., Liu, Y. and Qu, X. (2012) Receptor activator for nuclear factor kappa B expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. *J. Clin. Pathol.* **65**, 36–40 [CrossRef PubMed](#)
- 89 Trieb, K. and Windhager, R. (2015) Receptor activator of nuclear factor kappa B expression is a prognostic factor in human osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **10**, 1813–1815 [PubMed](#)
- 90 Bago-Horvath, Z., Schmid, K., Rössler, F., Nagy-Bojarszky, K., Funovics, P. and Sulzbacher, I. (2014) Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma. *Pathology* **46**, 411–415 [CrossRef PubMed](#)
- 91 Papanastasiou, A.D., Sirinian, C. and Kalofonos, H.P. (2012) Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res.* **14**, R112 [CrossRef PubMed](#)
- 92 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. and Koh, J.S. (2011) RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **56**, 738–743 [CrossRef PubMed](#)
- 93 Cathomas, R., Rothermundt, C., Bode, B., Fuchs, B., von Moos, R. and Schwitler, M. (2015) RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? *Oncology* **88**, 257–260 [CrossRef PubMed](#)
- 94 Roux, S., Amazit, L., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Milgrom, E. and Mariette, X. (2002) RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone. *Am. J. Clin. Pathol.* **117**, 210–216 [CrossRef PubMed](#)
- 95 Chawla, S., Henshaw, R., Seeger, L., Choy, E., Blay, J.Y., Ferrari, S., Kroep, J., Grimer, R., Reichardt, P., Rutkowski, P. et al. (2013) Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **14**, 901–908 [CrossRef PubMed](#)
- 96 Raju, R., Balakrishnan, L., Nanjappa, V., Bhattacharjee, M., Getnet, D., Muthusamy, B., Kurian Thomas, J., Sharma, J., Rahiman, B.A. et al. (2011) A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. *Database (Oxford)* **2011**, bar021 [PubMed](#)
- 97 Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D. and Dougall, W.C. (1998) The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 34120–34127 [CrossRef PubMed](#)
- 98 Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S. et al. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes. Dev.* **13**, 1015–1024 [CrossRef PubMed](#)
- 99 Jin, G., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S. and Inoue, J.I. (2005) RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J.* **24**, 790–799 [CrossRef PubMed](#)
- 100 Darnay, B.G., Ni, J., Moore, P.A. and Aggarwal, B.B. (1999) Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 7724–7731 [CrossRef PubMed](#)
- 101 Kim, H.H., Lee, D.E., Shin, J.N., Lee, Y.S., Jeon, Y.M., Chung, C.H., Ni, J., Kwon, B.S. and Lee, Z.H. (1999) Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* **443**, 297–302 [CrossRef PubMed](#)



- 102 Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T. et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309–319 [CrossRef PubMed](#)
- 103 Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A. et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3597–3602 [CrossRef PubMed](#)
- 104 Baud'huin, M., Duplomb, L., Teletchea, S., Lamoureaux, F., Ruiz-Velasco, C., Maillasson, M., Redini, F., Heymann, M.F. and Heymann, D. (2013) Osteoprotegerin: multiple partners for multiples functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**, 401–409 [CrossRef PubMed](#)
- 105 Gonda, T.A., Tu, S. and Wang, T.C. (2009) Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle* **8**, 2005–2013 [CrossRef PubMed](#)
- 106 Kwan Tat, S., Padriñes, M., Théoleyre, S., Couillaud-Battaglia, S., Heymann, D., Redini, F. and Fortun, Y. (2006) OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone* **39**, 706–715 [CrossRef PubMed](#)
- 107 Théoleyre, S., Kwan Tat, S., Vusio, P., Blanchard, F., Gallagher, J., Ricard-Blum, S., Fortun, Y., Padriñes, M., Redini, F. and Heymann, D. (2006) Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 460–467 [CrossRef PubMed](#)
- 108 Standal, T., Seidel, C., Hjertner, Ø., Plesner, T., Sanderson, R.D., Waage, A., Borsset, M. and Sundan, A. (2002) Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* **100**, 3002–3007 [CrossRef PubMed](#)
- 109 Lamoureaux, F., Picarda, G., Garrigue-Antar, L., Baud'huin, M., Trichet, V., Vidal, A., Miot-Noirault, E., Pitard, B., Heymann, D. and Rédini, F. (2009) Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res.* **69**, 526–536 [CrossRef PubMed](#)
- 110 Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R. et al. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **273**, 14363–14367 [CrossRef PubMed](#)
- 111 Holen, I., Croucher, P.J., Hamdy, F.C. and Eaton, C.L. (2002) Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **62**, 1619–1623 [PubMed](#)
- 112 Baud'huin, M., Duplomb, L., Téletchea, S., Charrier, C., Maillasson, M., Fouassier, M. and Heymann, D. (2009) Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J. Biol. Chem.* **284**, 31704–31713 [CrossRef PubMed](#)
- 113 Luo, J., Yang, Z., Ma, Y., Yue, Z., Lin, H., Qu, G., Huang, J., Dai, W., Li, C., Zheng, C. et al. (2016) LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat. Med.* **22**, 539–546 [CrossRef PubMed](#)
- 114 Styrkarsdóttir, U., Thorleifsson, G., Sulem, P., Gudbjartsson, D.F., Sigurdsson, A., Jonasdóttir, A., Jonasdóttir, A., Oddsson, A., Helgason, A., Magnusson, O.T. et al. (2013) Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature* **497**, 517–520 [CrossRef PubMed](#)
- 115 Zhu, Y.B., Xu, L., Chen, M., Ma, H.N. and Lou, F. (2013) GPR48 promotes multiple cancer cell proliferation via activation of Wnt signaling. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 4775–4778 [CrossRef PubMed](#)
- 116 Liang, F., Yue, J., Wang, J., Zhang, L., Fan, R., Zhang, H. and Zhang, Q. (2015) GPCR48/LGR4 promotes tumorigenesis of prostate cancer via PI3K/Akt signaling pathway. *Med. Oncol.* **32**, 49 [CrossRef PubMed](#)
- 117 Luo, W., Rodriguez, M., Valdez, J.M., Zhu, X., Tan, K., Li, D., Siwko, S., Xin, L. and Liu, M. (2013) Lgr4 is a key regulator of prostate development and prostate stem cell differentiation. *Stem Cells* **31**, 2492–2505 [CrossRef PubMed](#)
- 118 Liu, J., Wei, W., Guo, C.A., Han, N., Pan, J.F., Fei, T. and Yan, Z.Q. (2013) Stat3 upregulates leucine-rich repeat-containing protein-coupled receptor 4 expression in osteosarcoma cells. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 310691 [PubMed](#)
- 119 Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L. et al. (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41–50 [CrossRef PubMed](#)
- 120 Kim, N.S., Kim, H.J., Koo, B.K., Kwon, M.C., Kim, Y.W., Cho, Y., Yokota, Y., Penninger, J.M. and Kong, Y.Y. (2006) Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1002–1013 [CrossRef PubMed](#)
- 121 Gonzalez-Suarez, E., Branstetter, D., Armstrong, A., Dinh, H., Blumberg, H. and Dougall, W.C. (2007) RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol. Cell Biol.* **27**, 1442–1454 [CrossRef PubMed](#)
- 122 Gonzalez-Suarez, E., Jacob, A.P., Jones, J., Miller, R., Roudier-Meyer, M.P., Erwert, R., Pinkas, J., Branstetter, D. and Dougall, W.C. (2010) RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* **468**, 103–137 [CrossRef PubMed](#)
- 123 Palafox, M., Ferrer, I., Pellegrini, P., Vila, S., Hernandez-Ortega, S., Urruticoechea, A., Ciement, F., Soler, M.T., Muñoz, P., Viñals, F. et al. (2012) RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 [CrossRef PubMed](#)
- 124 Yamada, T., Tsuda, M., Takahashi, T., Totsuka, Y., Shindoh, M. and Ohba, Y. (2011) RANKL expression specifically observed *in vivo* promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. *Am. J. Pathol.* **178**, 2845–2856 [CrossRef PubMed](#)
- 125 Liu, Y., Wang, J., Ni, T., Wang, L., Wang, Y. and Sun, X. (2016), CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cells. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.8291
- 126 Mori, K., Le Goff, B., Charrier, C., Battaglia, S., Heymann, D. and Rédini, F. (2007) DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NF-kappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone* **40**, 981–990 [CrossRef PubMed](#)
- 127 Li, X., Liu, Y., Wu, B., Dong, Z., Wang, Y., Lu, J., Shi, P., Bai, W. and Wang, Z. (2014) Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. *Oncol. Rep.* **32**, 2605–2611 [PubMed](#)
- 128 Shin, M., Matsuo, K., Tada, T., Fukushima, H., Furuta, H., Ozeki, S., Kadowaki, T., Yamamoto, K., Okamoto, M. and Jimi, E. (2011) The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis* **32**, 1634–1640 [CrossRef PubMed](#)
- 129 Chen, L.M., Kuo, C.H., Lai, T.Y., Lin, Y.M., Su, C.C., Hsu, H.H., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Huang, C.Y. and Tang, C.H. (2011) RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *J. Cell. Biochem.* **112**, 933–941 [CrossRef PubMed](#)



- 130 Song, F.N., Duan, M., Liu, L.Z., Wang, Z.C., Shi, J.Y., Yang, L.X., Zhou, J., Fan, J., Gao, Q. and Wang, X.Y. (2014) RANKL promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via NF- $\kappa$ B-mediated epithelial–mesenchymal transition. *PLoS One* **9**, e108507 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 131 Wang, J., Sun, X., Zhang, H., Wang, Y. and Li, Y. (2015) MPA influences tumor cell proliferation, migration, and invasion induced by RANKL through PRB involving the MAPK pathway in endometrial cancer. *Oncol. Rep.* **33**, 799–809 [PubMed](#)
- 132 Golden, D., Saria, E.A. and Hansen, M.F. (2015) Regulation of osteoblast migration involving receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) signaling. *J. Cell Physiol.* **230**, 2951–2960 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 133 Beristain, A.G., Narala, S.R., Di Grappa, M.A. and Khokha, R. (2012) Homotypic RANK signaling differentially regulates proliferation, motility and cell survival in osteosarcoma and mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* **125**, 943–955 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 134 Mikami, S., Katsube, K., Oya, M., Ishida, M., Kosaka, T., Mizuno, R., Mochizuki, S., Ikeda, T., Mukai, M. and Okada, Y. (2009) Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J. Pathol.* **218**, 530–539 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 135 Min, J.K., Kim, Y.M., Kim, Y.M., Kim, E.C., Gho, Y.S., Kang, I.J., Lee, S.Y., Kong, Y.Y. and Kwon, Y.G. (2003) Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells: concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J. Biol. Chem.* **278**, 39548–39557 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 136 Kim, Y.M., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Kim, H.S., Kim, J.D., Choi, Y., Kim, K.W., Lee, S.Y. and Kwon, Y.G. (2002) TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 6799–6805 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 137 Kim, H.H., Shin, H.S., Kwak, H.J., Ahn, K.Y., Kim, J.H., Lee, H.J., Lee, M.S., Lee, Z.H. and Koh, G.Y. (2003) RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J.* **17**, 2163–2165 [PubMed](#)
- 138 Benslimane-Ahmmim, Z., Heymann, D., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Laurendeau, I., Bièche, I., Smedja, D.M., Galy-Fauroux, I., Collic-Jouault, S. et al. (2011) Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 834–843 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 139 Min, J.K., Cho, Y.L., Choi, J.H., Kim, Y., Kim, J.H., Yu, Y.S., Rho, J., Mochizuki, N., Kim, Y.M., Oh, G.T. and Kwon, Y.G. (2007) Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* **109**, 1496–1502
- 140 Mueller, C.G. and Hess, E. (2012) Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. *Front. Immunol.* **3**, 261 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 141 Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A. et al. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315–323 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 142 Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M. et al. (2008) The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* **29**, 423–437 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 143 Akiyama, T., Shinzawa, M., Qin, J. and Akiyama, N. (2013) Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **4**, 249 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 144 Khan, I.S., Mouchess, M.L., Zhu, M.L., Conley, B., Fasano, K.J., Hou, Y., Fong, L. and Su, M.A. (2014) Enhancement of an anti-tumor immune response by transient blockade of central T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **211**, 761–768 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 145 Cook, J. and Hagemann, T. (2013) Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 595–601 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 146 Breuil, V., Schmid-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., Rezzonico, R., Euler-Ziegler, L. and Rossi, B. (2003) The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic for human monocytes. *FASEB J.* **17**, 2163–2165 [PubMed](#)
- 147 Kambayashi, Y., Fujimura, T., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A. and Aiba, S. (2015) The possible interaction between receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand expressed by extramammary paget cells and its ligand on dermal macrophages. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2547–2550 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 148 Fujimura, T., Kambayashi, Y., Furudate, S., Asano, M., Kakizaki, A. and Aiba, S. (2015) Receptor activator of NF-kappaB ligand promotes the production of CCL17 from RANK+ M2 macrophages. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2884–2887 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 149 Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., Grivennikov, S., Cheng, J.Q., Hoffman, R.M. and Karin, M. (2011) Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signalling. *Nature* **470**, 548–553 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 150 Monteiro, A.C., Leal, A.C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A.C., Kestelman, F., Chaves, S.B., Azevedo, R.B., Monteiro, J.P. and Bonomo, A.T. (2013) Cells induce pre-metastatic osteolytic disease and help bone metastases establishment in a mouse model of metastatic breast cancer. *PLoS One* **8**, e68171 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 151 Esposito, M. and Kang, Y. (2014) Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis. *Pharmacol. Ther.* **141**, 222–233 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 152 Bekker, P.J., Holloway, D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P.T. and Dunstan, C.R. (2001) The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 348–360 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 153 Gobin, B., Baud'huin, M., Isidor, B., Heymann, D. and Heymann, M.F. (2012) Monoclonal antibodies targeting RANKL in bone metastasis treatment. In *Monoclonal antibodies in oncology* (Fatih, M., ed.), pp. 42–53, Uckum, eBook Future Medicine Ltd
- 154 Bekker, P.J., Holloway, D.L., Rasmussen, A.S., Murphy, R., Martin, S.W., Leese, P.T., Holmes, G.B., Dunstan, C.R. and DePaoli, A.M.A. (2004) Single-dose placebo-controlled study of AMG162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1059–1066 [CrossRef](#)
- 155 Picarda, G., Matous, E., Amiaud, J., Charrier, C., Lamoureux, F., Heymann, M.F., Tirode, F., Pitard, B., Trichet, V., Heymann, D. and Redini, F. (2013) Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing's sarcoma by inhibiting RANKL. *J. Bone Oncol.* **2**, 95–104 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 156 Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D. and Redini, F. (2007) Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **67**, 7308–7318 [CrossRef](#) [PubMed](#)



- 157 Lamoureux, F., Picarda, G., Rousseau, J., Gourden, C., Battaglia, S., Charrier, C., Pitard, B., Heymann, D. and Rédini, F. (2008) Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3389–3398 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 158 Zheng, Y., Zhou, H., Fong-Yee, C., Modzelewski, J.R., Seibel, M.J. and Dunstan, C.R. (2008) Bone resorption increases tumour growth in a mouse model of osteosclerotic breast cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 559–567 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 159 Miller, R.E., Roudier, M., Jones, J., Armstrong, A., Canon, J. and Dougall, W.C. (2008) RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2160–2169 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 160 Miller, R.E., Jones, J.C., Tometsko, M., Blake, M.L. and Dougall, W.C. (2014) RANKL inhibition blocks osteolytic lesions and reduces skeletal tumor burden in models of non-small-cell lung cancer bone metastases. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 345–354 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 161 Vanderkerken, K., De Leenheer, E., Shipman, C., Asosingh, K., Willems, A., Van Camp, B. and Croucher, P. (2003) Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res.* **63**, 287–289 [PubMed](#)
- 162 Lipton, A., Fizazi, K., Stopeck, A.T., Henry, D.H., Smith, M.R., Shore, N., Martin, M., Vadhan-Raj, S., Brown, J.E., Richardson, G.E. et al. (2016) Effect of denosumab versus zoledronic acid in preventing skeletal-related events in patients with bone metastases by baseline characteristics. *Eur. J. Cancer* **53**, 75–83 [CrossRef](#) [PubMed](#)

---

Received 10 May 2016/2 June 2016; accepted 8 June 2016

Version of Record published 8 June 2016, doi 10.1042/BSR20160150

---





C H A P T E R

14

Homeobox genes from the *Dlx* family  
and bone cancers

*Benjamin Navet, Frédéric Léxot*

INSERM UMR 957, Nantes University, Faculty of Medicine, Nantes F-44035, France

INTRODUCTION

Homeobox genes were discovered in *Drosophila melanogaster* as being responsible, when mutated, for phenotypic changes during early embryonic development such as body segment replacement (antenna toward pedia) or duplication (thoracic segment T2)<sup>1-7</sup>. Sequence homology studies with these two initial genes (called Antennapedia and Ultrabithorax) led to the isolation of similar genes in many other species from the Nematode to Zebra Fish, Xenope, Mouse and Human<sup>8</sup>. A highly conserved sequence of 183bp called "homeobox" was found present in these genes<sup>4</sup>, and genes containing such a homeobox sequence were named "homeobox genes". The homeobox encodes a protein domain (61 amino acids) called the "homeodomain", which can bind to specific DNA sequences<sup>5</sup>. With time and the achievement of whole-genome sequencing, the homeobox gene family has been extended, in humans, to a total number of 300 loci corresponding to 235 functional genes and 65 pseudo-genes<sup>9</sup>. Within this important superfamily, two groups can be distinguished. The first group corresponds to "HOX" homeobox genes that are organized into four clusters in mammalian genomes. These clusters, probably obtained by successive duplications<sup>10</sup>, are localized on different chromosomes (Table 14.1) and contain 13 series of paralog genes<sup>8,11,12</sup>. The second group corresponds to all other homeobox genes, divergent from HOX homeobox genes and dispersed in genomes<sup>9</sup>. The *Dlx* homeobox genes are peculiar divergent homeobox genes since they are also organized in clusters and are furthermore located on the same chromosomes as HOX clusters (Table 14.1).

The present chapter provides a review of the current state of knowledge of the *Dlx* homeobox genes with a special focus on the implication of these genes in bone formation and bone tumors.

DLX HOMEBOX GENES

*Dlx* homeobox gene origin


Homeobox genes are an exemplary illustration of gene conservation during the evolution of genes controlling the development. The development of complex anatomy by organisms often requires multiple duplications of individual ancestral genes. Indeed, while in invertebrates a single gene called Distal-less (*Dll*) is present, several *Dlx* genes have been described in vertebrates<sup>3,13-15</sup>. In particular, humans and mice have six *Dlx* homeobox genes<sup>16-18</sup>. The high conservation of the *Dlx* homeobox sequence, paralog in a species, ortholog between species, supports the hypothesis of an initial split of an ancestral gene on the same chromosome, followed by successive chromosomal duplications of this cis-paralog pair under maintenance of their orientation<sup>19-21</sup>. The analysis of the *Dlx* gene sequences in vertebrates<sup>22</sup> has led to the classification of this gene family into two groups of trans-paralog genes (Figure 14.1):

*Dlx2*, *Dlx3* and *Dlx5* being closer to *Dll* with a homology of 68% for the homeobox sequence and maintenance of the first intron position,

*Dlx1*, *Dlx4* and *Dlx6* sharing only 44% homology with *Dll* for the homeobox sequence<sup>19</sup>.

Bone Cancer. DOI: 10.1016/B978-0-12-416721-6.00014-5  
Copyright © 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

TABLE 14.1 Chromosome localization of the HOX and DLX gene clusters in mouse and human

		Mouse	Human
HOX-A	DLX5-DLX6	Chr 6	Chr 7
HOX-B	DLX3-DLX4	Chr 11	Chr 17
HOX-C		Chr 15	Chr 12
HOX-D	DLX1-DLX2	Chr 2	Chr 2

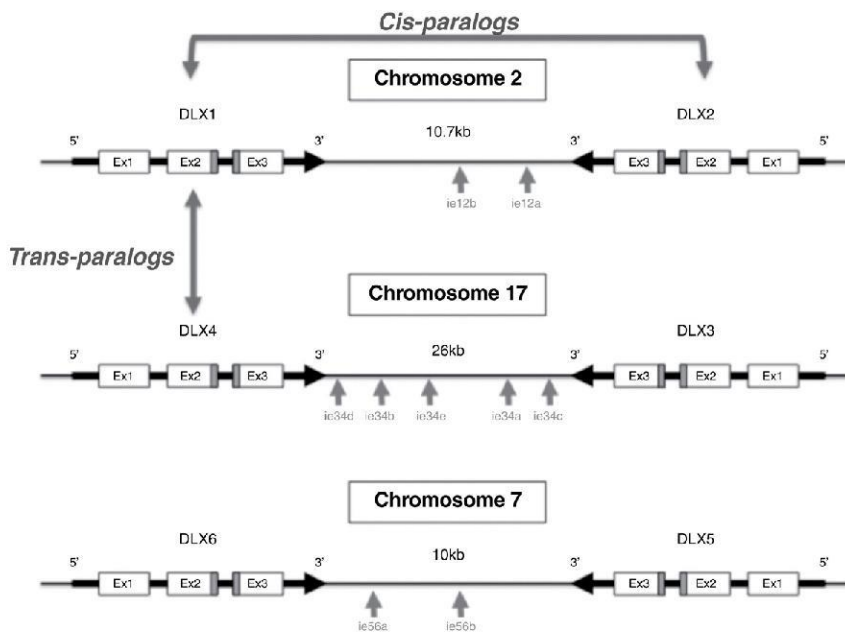


FIGURE 14.1 Schematic representation of the *Dlx* gene cluster organization in humans. The *Dlx* gene structure is also represented. Homeobox sequences are shown in grey. Intergenic enhancers are shown with arrows.

From a phylogenetic point of view, it seems that the ancestral gene split occurred after the divergence between arthropods (insects) and chordate (vertebrates), but before the divergence between vertebrates and tunicates<sup>23</sup>. With regard to the *Dlx* gene cluster duplications, which occurred simultaneously with the HOX cluster<sup>19</sup>, these took place before the furcation between Zebra Fish and tetrapods, since several pairs of *Dlx* genes in cis-paralog position are present in Zebra Fish. However, the presence of two supplementary *Dlx* genes in this fish in cis-paralog position<sup>22,24-26</sup> raises an open question: have such supplementary *Dlx* existed and been lost in vertebrates, or are these genes the result of duplication posterior to the separation between fish and tetrapods?

#### Chromosomal organization and structure of *Dlx* homeobox genes

*Dlx* homeobox genes are organized in three pairs of cis-paralog genes in a tail-to-tail orientation (Figure 14.1). As previously mentioned (Table 14.1), each pair is associated to a HOX gene cluster in 3' position<sup>16,27-29</sup>. All *Dlx* genes have the same genomic organization (Figure 14.1) with three exons<sup>16,21,22,28-35</sup>. Each exon contains a coding sequence and the homeobox is shared between exon 2 and 3 (Figure 14.1). Because of the tail-to-tail orientation of *Dlx* genes in the cluster, each gene has its own promoter and can be regulated independently of its cis-paralog. However,

#### I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS

intergenic enhancers have been found in each cluster (Figure 14.1), which enable the transcriptional co-regulation of each pair of genes<sup>20,36,37</sup>. These intergenic enhancers have been shown to be functional during embryonic development<sup>38-40</sup>.

s0040 **Dlx homeobox gene transcripts**

p0045 Several transcripts have been described for certain *Dlx* homeobox genes. These transcripts may have resulted either from an alternative transcription, from an alternative splicing or from a bidirectional transcription with the presence of an antisense transcript. The *Dlx* homeobox gene transcription modalities are very variable, with a single transcript for *Dlx2* and *Dlx3*, two transcripts for *Dlx4* resulting from an alternative splicing, two transcripts for *Dlx6* including an antisense transcript, and four alternatively spliced sense transcripts as well as an antisense transcript for *Dlx1*<sup>28,32</sup>. With regard to *Dlx5*, three sense transcripts resulting from alternative splicing have been reported in mouse with only one transcript containing the homeobox<sup>32</sup>. In human, a unique transcript (1.8kb) has been identified<sup>27,41</sup>.

p0050 *Dlx* antisense transcripts are the exact complementary sequence to sense transcripts owing to the fact that they originate from the same locus. This category of antisense RNA is called cis-antisense<sup>42</sup>. The function associated to these *Dlx* antisense transcripts remains unknown. However, the implication of such antisense transcripts in the regulation of the expression of the homeoprotein encoded by the sense transcript has been reported during embryonic development for a homeobox gene called *Msx1*<sup>43,44</sup>. A similar function may exist for *Dlx* homeobox antisense gene transcripts, as suggested by *Dlx1* antisense invalidation experiments<sup>45</sup>.

s0045 **DLX HOMEOPROTEINS**

s0050 **The homeodomain**

p0055 The homeodomain (61 amino-acids) has a secondary structure formed of three  $\alpha$  helices. The second and third helices, linked by a  $\beta$  turn, form a helix-turn-helix motif which enables DNA binding<sup>31,32</sup>. The carboxyl terminal part of the third helix specifically recognizes a DNA sequence (responsive element) and binds to the major furrow of the genomic DNA double helix<sup>5,46</sup>. The helix-turn-helix motif is highly conserved in the DLX family<sup>23</sup>. Small variations of sequence in the first helix and in the link between first helices can be used to discriminate between members of the DLX family and to distinguish them from all other homeoprotein families<sup>23</sup>.

s0055 **Other conserved domains**

p0060 Other domains have been found conserved in DLX homeoproteins. In both parts of the homeodomain, conserved sequences have been named "homeodomain extensions"<sup>17</sup>. Their associated function is still unknown but an involvement in DNA sequence recognition is suspected. In the N-terminal part of DLX homeoproteins, two conserved sequences have been found and named DLX homology regions 1 and 2<sup>24,46</sup>. The function of these conserved regions is still unknown. Finally, two nuclear localization signals have been found in all DLX with the exception of DLX4, which only has one<sup>47</sup>.

s0060 **Biochemical peculiarities of DLX homeoproteins**

p0065 Like all homeoproteins, DLX binds directly<sup>48</sup> as a monomer<sup>46</sup> to DNA sequences (responsive elements) rich in A and T bases<sup>5,32,49,50</sup>. DLX homeoproteins can bind to the same nucleotide core sequence 5' TAATT 3' present on the promoter of shared target genes such as osteocalcin<sup>51-56</sup>. Each DLX homeoprotein can also bind to specific sequences not recognized by other DLX (Table 14.2).

s0015 **TABLE 14.2** Examples of specific responsive elements of DLX homeoproteins

	Sequences	References
DLX2	CACTAATTGAG	57
DLX3	(A/C/G)TAATT(G/A)(C/G)	52
DLX4	TCAATTAATTGA	34

3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)



TABLE 14.3 DLX homeoprotein target genes

	Target genes	References
DLX1	<i>Activin A, Bmp-4, Fgf10, Ptc1, Shh, Smad4, Tgf-β1</i>	58,59
DLX2	<i>Activin A, Amel, Coll 1α1, Coll 2α1, Fgf10, Ie12b, Ie56, Ocn, Ptc1, Shh, Sost, Vdr, Wnt5a</i>	36,51,53,59-71
DLX3	<i>Bmps, Bsp, Coll 1α1, Ocn, Opn, Runx2, Sost, Tnap</i>	53,71-73
DLX4	<i>Bmps, c-myc, Gata1, Sost</i>	71,72,74
DLX5	<i>Activin A, Bmps, Bsp, Coll 1α1, Ie56, Ocn, Opn, Runx2, Sost, Tnap, Vdr, Wnt5a</i>	36,51,53,60-63,65,66,70,71,75-80
DLX6	<i>Bmps, Sost</i>	71,80

TABLE 14.4 Proteins that may form dimers with DLX homeoproteins

	Partner proteins	References
DLX1	ALX4, BARX1, CDX1, CDX4, FOXA1, HOXB13, MIXL1, SAAD4, SP7, TBX21	58,83
DLX2	ALX4, DIP2A, FOXJ1, HOXC8, MSX1, MSX2, NCOA2, PI3KR1, SP7, SUMO3, UBC, XRCC6	46,83-89
DLX3	RUNX2	53
DLX4	DLXIN, LSM3, SP7, ZFP263	82,83,88
DLX5	ALX4, CDX2, DLXIN, HNF4G, HOXB13, HOXC8, JDP2, MSX1, MSX2, NCOA2, NFE2, RUNX2, SOX8, SOX10, SPEN, SP7, SRY, UBC	46,82,83,87,89-91
DLX6	HSP90AA1	92

To date, a large variety of DLX homeoprotein target genes have been reported. Table 14.3 gives a non-exhaustive list of these target genes focusing on those encoding proteins implicated in mineralized tissue formation.

#### Binding with other proteins

DLX homeoproteins can form homo-dimers or hetero-dimers with homeoproteins from other families through their homeodomains<sup>46</sup>. Such dimer formation inhibits the binding of both homeoproteins to DNA and consequently their transcriptional activities<sup>46</sup>. For instance, DLX3 and MSX1 can form a heterodimer in keratinocytes<sup>81</sup> and DLX5 and MSX2 in dental mesenchyme cells<sup>68</sup>. Dimerization has been shown to be controlled by a protein from the melanoma antigen (MAGE) family called DLXIN that enables the formation of multimers *in vivo* through association with, for instance, DLX5, DLX4 and MSX2<sup>82</sup>.

DLX homeoproteins can also form dimers with other transcription factors with reciprocal inhibition of their transcriptional activities. For instance, binding of DLX3 or DLX5 with RUNX2<sup>53,76</sup> inhibits the progression of osteoblastic cell differentiation. Indeed, each DLX and RUNX2 hetero-dimerization blocks their respective impacts on the osteocalcin promoter<sup>53,76</sup>. Heterodimer formation was also suggested with another transcription factor important during osteoblastogenesis called SP7 or Osterix<sup>83</sup>.

Table 14.4 gives an overview of the proteins (including homeoproteins) that may form dimers with the DLX homeoproteins.

### DLX HOMEODOMAIN GENE EXPRESSIONS AND FUNCTIONS IN SKELETON

#### Embryonic development – morphogenesis

##### Limb development

Limb development can be subdivided into three stages called bud, paddle and rotation stages.

Limb buds appear as lateral mesoderm outgrowth covered by ectoderm. A thickening of the ectoderm localized in the distal part of each bud constitutes the apical ectodermal ridge (AER). The AER plays a crucial role in the bud extension. The underlying mesenchyme is named the progression zone<sup>93,94</sup>. All *Dlx* are expressed in the AER, suggesting a role of these homeobox genes in AER formation and the regulation of its activities<sup>20,50,80,93-104</sup>.

#### I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS

p0100 The paddle stage is achieved after a rapid extension of the limb bud and the formation in its distal part of a flat structure: the paddle. Then, furrows appear in the paddle as a consequence of mesodermal cell apoptosis in areas corresponding to interdigital regions. These furrows separate the pre-cartilaginous draft of fingers and toes. While the expression of the homeobox gene *Msx1* is limited to the distal mesenchyme that will form the chondrogenic condensations<sup>80,105–108</sup>, the expression of the homeobox genes *Dlx5* and *Msx2* is found in cells that do not participate to these chondrogenic condensations. Therefore, these homeobox genes are found in posterior zones of the mesenchyme and posterior necrotic zones<sup>46,98</sup>. Surprisingly, the limb development appears to be normal in *Dlx1*<sup>–/–</sup>, *Dlx2*<sup>–/–</sup>, and *Dlx5*<sup>–/–</sup>, transgenic mice<sup>33,109–111</sup>. However, in mice lacking both *Dlx5* and *Dlx6*, limb malformations have been observed including palmar clefts, missing median fingers and fusion of lateral fingers<sup>80,102,103</sup>. Finally, it seems that homeobox genes from the *Dlx* family, more particularly *Dlx5* and *Dlx6*, are essential for the formation of interdigital furrows through the control of cell apoptosis.

p0105 Concerning the rotation stage during which forelimbs and hindlimbs undergo lateral and ventral rotations, respectively, the expression of the *Dlx* homeobox genes has not yet been reported.

#### s0085 **Craniofacial development**

p0110 In mammals, craniofacial development is set up from the branchial arches. There are five branchial arches corresponding to mesenchyme covered by the ectoderm on the outside and the endoderm on the inside except for the first branchial arch which is covered by ectoderm on both sides. The mesenchyme contains many cells deriving from the neural crest. The first branchial arch gives rise to the face (i.e. maxilla, mandible) and the other arches to the neck. Homeobox genes from the *Dlx* family have a peculiar expression in branchial arches. Indeed, while *Dlx1* and *Dlx2* are widely expressed in the first and second branchial arches, the expression of *Dlx3*, *Dlx5* and *Dlx6* is restricted to the distal part of these arches<sup>17,33,78,95,96,112–115</sup>. Moreover, in the first branchial arch, *Dlx5* and *Dlx6* expression is limited to the posterior part (mandibular area) while *Dlx1* and *Dlx2* expression is observed in the whole arch. The differential expression of the *Dlx* homeobox genes in the first branchial arch suggests a role for encoded homeoproteins in the patterning of this arch. Such a role has been demonstrated by the phenotype of double null mutant mice for *Dlx1-Dlx2* and *Dlx5-Dlx6*. Indeed, an absence of upper molars is observed in the *Dlx1* and *Dlx2* double null mutant<sup>33,115</sup> and a lower jaw into upper jaw transformation is present in the *Dlx5* and *Dlx6* double null mutant<sup>115,116</sup>.

#### s0090 **Bone growth – histogenesis**

p0115 Two major ossification mechanisms exist: the endochondral formation for most bones of the axial and appendicular skeleton, and the intra-membranous formation for bones of the skull and some specific flat bones such as the breastbone and the shoulder blade.

p0120 *Dlx* homeobox gene expression has been shown to be implicated in bone formation by bone forming cells during both mechanisms, but also in bone resorbing osteoclasts necessary for bone growth.

#### s0095 ***Dlx* and osteoblast differentiation in membranous bones**

p0125 Osteoblast differentiation (osteoblastogenesis) encompasses several stages that can be identified by the expression of different phenotypic markers. Type I collagen and the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) are markers of the early stages of osteoblast differentiation while the expression of osteocalcin (OCN) and mineralization are traits of the terminal differentiation. RUNX2 (with its CBF $\beta$  sub-unit) and SP7 (Osterix) are transcription factors implicated in osteoblastogenesis<sup>117</sup>. In-depth studies of interrelations between DLX, RUNX2 and another homeoprotein, MSX2, and their impact on the transcription of the osteocalcin gene have been performed in the calvaria primary culture model. As reported in Table 14.3, osteocalcin is a target gene of DLX homeoproteins. Several responsive elements for homeoproteins have been identified in the osteocalcin promoter sequence. With regard to osteocalcin gene transcription, some studies (based on gene over-expression) have reported an inhibitory effect of the DLX homeoproteins<sup>51,110</sup> while others showed a stimulatory effect<sup>53,61,118</sup>. In fact, according to the differentiation stage, the DLX homeoproteins and their partners (such as MSX2 and RUNX2) have been shown to bind sequentially to the osteocalcin promoter modulating its transcriptional activity in both ways<sup>53</sup>. A detailed analysis of the *Dlx* homeobox gene expression during osteoblastogenesis<sup>119</sup> showed that only four *Dlx* (*Dlx2*, *Dlx3*, *Dlx5* and *Dlx6*) are expressed with different expression patterns. *Dlx2*, *Dlx5* and *Dlx6* have a relatively higher expression in pre-osteoblast and immature osteoblast populations, whereas *Dlx3* is dramatically enriched in mature osteoblasts and osteocytes. Consequently the homeoprotein composition differs from one stage to another with consequences on the osteocalcin promoter transcription. Taking into account the fact that DLX homeoproteins may form dimers with other transcription factor such as MSX2, RUNX2 and SP7 (Table 14.4) and subsequently inhibit each other's transcriptional activities,

### 3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)



a complete elucidation of the transcriptional regulation of osteocalcin by DLX homeoproteins appears difficult to achieve. Nevertheless, *Dlx5*<sup>-/-</sup>, transgenic mice have shown a delay in the differentiation of membranous bone osteoblasts<sup>111,115</sup>, while patients suffering from the tricho-dento-osseous (TDO) syndrome (DLX3 loss-of-function)<sup>52</sup> show an increase of skull bone thickness, indicating that DLX homeoproteins are essential for osteoblast maturation.

st0100 ***Dlx* and chondroblast differentiation in endochondral bones**

p0130 The endochondral ossification comprises several stages: the pre-cartilaginous blastema formation, the diaphyseal ossification and the epiphyseal ossification. *Dlx5* and *Dlx6* homeobox gene expression is observed in all chondrogenic condensations in the embryo and during the different phases of chondrogenesis necessary for skeleton implementation<sup>27,97-99,120-125</sup>. From the beginning of the vascular invasion and the initial calcification of the cartilaginous matrix, cells start a maturation program during which *Dlx* homeobox genes are expressed. From a cytologic viewpoint, the endochondral ossification corresponds to the chondrocyte maturation with successive stages of proliferative, pre-hypertrophic and hypertrophic chondrocytes. Cartilaginous matrix mineralization is then pursued by an osseous reorganization. The regulation of this cellular maturation progress requires several signaling factors such as IHH, BMP, FGF and PTHrP<sup>126-129</sup>. Studies have demonstrated that *Dlx* homeobox genes are downstream targets of BMP signaling during chondrogenesis regulation<sup>64,130,131</sup>. Indeed, type II collagen expression in chondrocytes is stimulated by BMP2 through the homeoprotein DLX2<sup>64</sup>. Other studies have evidenced the expression of DLX3<sup>132</sup>, DLX5<sup>121,123,124</sup> and DLX6<sup>124</sup> in proliferative and pre-hypertrophic chondrocytes. DLX5 and DLX6 expression was further shown to be maintained in the hypertrophic chondrocyte<sup>121,123,124</sup>, while DLX3 expression is switched off<sup>132</sup>. In the perichondrium and the periosteum, the expression of these three DLXs was also reported<sup>110,121,123,124,132</sup>.

p0135 Homeoproteins DLX5 and DLX6 therefore appear to be important positive regulators all throughout chondrocyte differentiation. This was confirmed by the analysis of long bones of *Dlx5* and *Dlx6* double null mutant mice<sup>80,102-104,115,133</sup>. In these mutants, a delay of the chondrocyte differentiation program is observed with an accumulation of pre-hypertrophic chondrocytes. A temporary delay of IHH expression is also observed while PTHrP expression appears to be unaffected in the double null mutant. Interestingly, a human form of autosomal dominant ectrodactyly called Split-hand/foot malformation (SHFM1) was associated to a deletion in the *Dlx5-Dlx6* cluster locus, more specifically the critical region corresponding to 7q21.2-q21.3 (OMIM # 183600).

st0105 ***Dlx* and osteoclastogenesis**

p0140 Osteoclasts are cells from haematopoietic origin that are in charge of bone resorption necessary for skeletal growth and bone remodeling. *Dlx* homeobox gene expression was investigated during osteoclastogenesis<sup>134</sup>. Four *Dlx* homeobox genes (*Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5* and *Dlx6*) were expressed during osteoclastogenesis with two different expression patterns. *Dlx5* and *Dlx6* were continuously expressed during osteoclastogenesis with no significant modulation. By contrast, *Dlx1* and *Dlx2*, which were not detected in the pre-osteoclast, have a gradually increasing expression during osteoclastogenesis and high expression levels in resorbing osteoclasts<sup>134</sup>. The mechanism associated with this *Dlx* homeobox gene expression is still unknown.

st0110

**DLX HOMEBOX GENES AND CANCERS**

st0115 ***Dlx* expression in non-osseous cancers**

p0145 Abnormal expression of one or various *Dlx* homeobox genes has been described in various types of cancers, such as blood cancers (leukemia, lymphoma, and myeloma: *Dlx2-3-4-5-6*)<sup>135-143</sup>, breast cancers (*Dlx2-4-5-6*)<sup>138,144-150</sup>, lung cancers (*Dlx1-4-5*)<sup>142,151-153</sup>, prostate cancers (*Dlx1-2-4*)<sup>154,155</sup>, colon cancers (*Dlx4*)<sup>156</sup>, odontogenic cancers (*Dlx2-3-4*)<sup>157,158</sup>, glioblastoma cancers (*Dlx2*)<sup>159</sup>, testicular cancers (*Dlx6*)<sup>160</sup>, choriocarcinoma cancers (*Dlx4*)<sup>161-163</sup> and ovarian cancers (*Dlx4*)<sup>164,165</sup>. The origin of such abnormal expression remains unknown in most cases.

p0150 Moreover, aberrant methylations of *Dlx* homeobox genes have been detected in blood (*Dlx3*)<sup>139</sup>, breast (*Dlx4*)<sup>166</sup>, lung (*Dlx1*)<sup>167</sup> and testicular cancers (*Dlx6*)<sup>160</sup>, as well as the presence of chromosomal rearrangements in the proximity of *Dlx* homeobox gene cluster loci in blood cancers (lymphoma: *Dlx5-Dlx6* locus; leukemia: *Dlx1-Dlx2* and *Dlx3-Dlx4* loci)<sup>137,168</sup>.

p0155 With regard to the role of *Dlx* homeobox genes together with their *Msx* homeobox gene partners in tumor growth, published results are highly disparate but nevertheless can be subdivided into two categories. First, these homeoproteins may act on tumor cell proliferation, differentiation and apoptosis through their interactions with some oncogenes (AKT2<sup>142</sup>, IRS-2<sup>165</sup>, P53<sup>169</sup>, P63<sup>170</sup>, V-Ki-ras<sup>171</sup>, v-raf<sup>171</sup>, GATA-1<sup>135</sup>, c-myc<sup>135,140</sup>, Bcl2<sup>140,172</sup>, TWIST<sup>180</sup>, DLXIN<sup>82,173-175</sup>) and their ability to modulate signaling pathways (BMP<sup>176</sup>, FGF<sup>164</sup>, Hh<sup>177</sup>, Wnt<sup>178,179</sup>, TNF $\alpha$ <sup>180</sup>; v-egf<sup>164</sup>, cyclin D1<sup>181</sup>).

I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS

p0160 On the other hand, these homeoproteins may take part in the epithelium-to-mesenchyme transition (EMT) characteristic of certain cancers such as breast<sup>150,182</sup>, stomach<sup>179</sup> and pancreatic<sup>183</sup> cancer. The EMT is considered a crucial step for tumor metastasis to bone (for review<sup>184,185</sup>), thus raising the question of an implication of *Dlx* homeobox genes in the bone metastasis process.

s0120 ***Dlx* expression in bone tumors**

s0125 **Bone metastasis: secondary bone tumors**

p0165 *Dlx* homeobox gene expression in bone metastasis has been reported only for breast cancer<sup>149,150</sup>. Elevated expression of DLX4 in primary tumors has been shown to enhance tumor cell migration, invasion and metastasis via the up-regulation of TWIST which is known to stimulate the EMT<sup>150</sup>. Interestingly, the over-expression of BP1, the protein encoded by the second transcript of the *Dlx4* homeobox gene, in primary tumors of patients was not associated with an increased risk of metastasis but was clearly correlated with histological grade<sup>138</sup>. Therefore, the two proteins, DLX4 and BP1, may have different implications in tumorigenesis despite the fact that both of them contain the full homeodomain sequence. Further studies are necessary to understand the different roles of these two proteins.

p0170 Another study focusing on the role of *Dlx* homeobox genes in bone metastasis has highlighted the fact that a mutually exclusive expression of the homeoproteins DLX2 and DLX5-6 is associated with the metastatic potential of human breast cancer cells<sup>149</sup>. Indeed, DLX2 was expressed in the primary tumor and switched off in metastases whereas DLX5 and DLX6 were highly expressed in metastases but not in the primary tumor. Furthermore, a significant correlation between DLX2 expression in primary tumors and prolonged disease-free survival and a lower incidence of relapse was reported<sup>149</sup>. However, such a beneficial effect of DLX2 expression in tumor cells remains unclear, since an implication of DLX2 in tumor progression via the regulation of metabolic stress-induced necrosis has also been suggested<sup>186</sup>. Further studies are necessary to determine the positive as well as negative effects of DLX homeoprotein expression when considering the metastatic ability of tumor cells.

s0130 **Primary bone tumors**

p0175 Surprisingly, while *Dlx* homeobox gene expression patterns and functions have been widely studied during osteoblastogenesis and in mature osteoblasts (cf IV), only one study has investigated the expression and function of these genes in primary bone tumors<sup>71</sup>. This study investigating sclerostin regulation by BMPs showed that five *Dlx* genes, *Dlx2*, -3, -4, -5 and -6, are expressed in the human osteosarcoma cell-line Saos-2, and that all encoded homeoproteins except for DLX4 are modulated by BMPs to regulate sclerostin expression. However, as mentioned earlier in this chapter, *Dlx4* and *Dlx1* are not normally expressed during osteoblastogenesis<sup>119</sup>. No hypothesis was raised by the authors of the study with regard to the unexpected expression of *Dlx4* transcripts in these osteoblastic tumor cells.

p0180 To further investigate the expression of *Dlx* homeobox genes in primary bone tumors, RT-qPCR experiments were performed by our group on total RNA extracted from 7 human osteosarcoma and 8 Ewing sarcoma cell-lines (Figure 14.2). While osteosarcoma cell-lines expressed all six *Dlx* homeobox genes (Figure 14.2A), in the Ewing sarcoma cell-lines no expression of *Dlx2* was observed (Figure 14.2B). Ewing sarcomas are characterized by a chromosomal rearrangement leading to the synthesis of a fusion protein (See Chapters) with transcriptional ability. This absence of *Dlx2* expression raises the question whether this fusion protein may inhibit *Dlx2* expression. Further studies are necessary to characterize this potential inhibition and to determine its involvement in the tumorigenesis of bone. Q1

p0185 With regard to *Dlx4*, its expression was confirmed in all tumors analyzed (osteosarcoma and Ewing sarcoma), suggesting an implication of *Dlx4* in tumorigenesis. Interestingly, the unexpected expression of *Dlx1* was also reported in all cell-lines.

p0190 In summary, it seems that three *Dlx* homeobox genes may be implicated in primary bone tumor development: *Dlx1* and *Dlx4* in osteosarcomas and Ewing sarcomas through their abnormal expression in cells of the osteoblastic lineage, and *Dlx2* in Ewing sarcomas through its absence in these cells. However, their exact functions remain to be elucidated.

s0135

## CONCLUSIONS

p0195 *Dlx* homeobox genes are a family of transcription factors clearly implicated in skeleton formation. Expression of these genes has been described in several cancers, in breast cancer bone metastasis as well as in primary bone tumors (osteosarcoma and Ewing sarcoma). The exact role(s) of these genes in bone cancer is still unknown but their ectopic

### 3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)



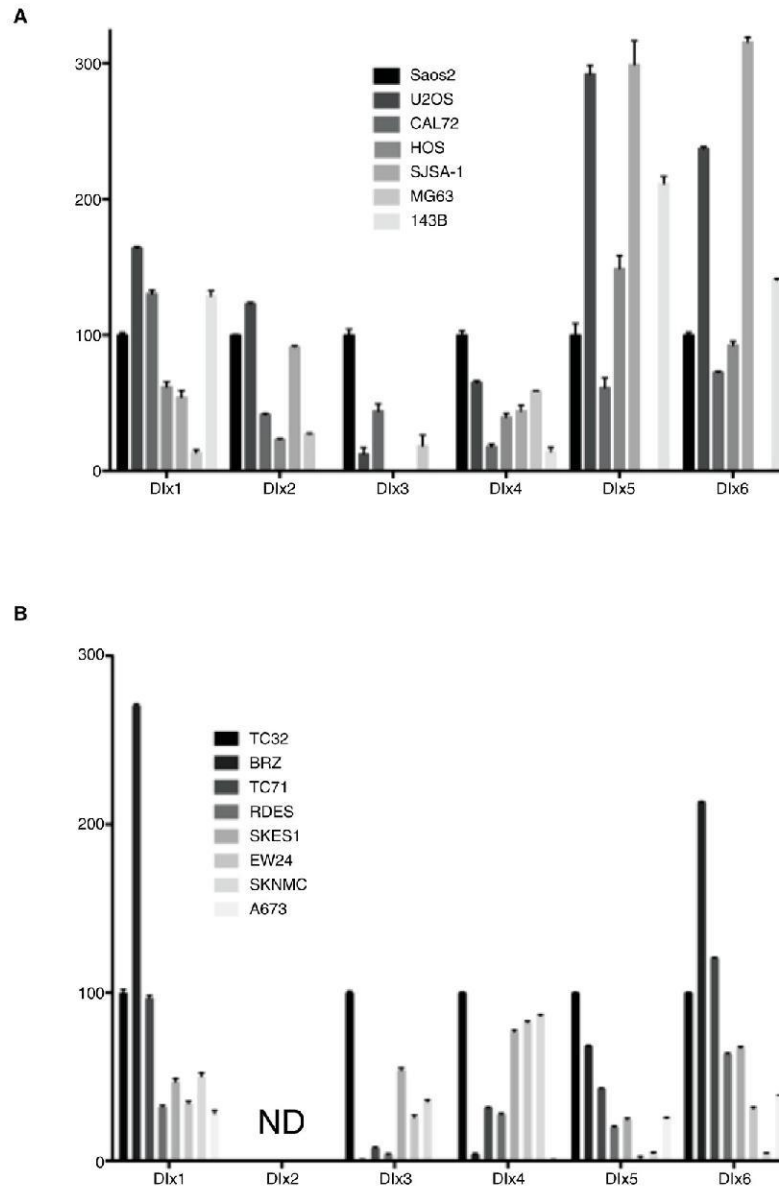


FIGURE 14.2 *Dlx* homeobox gene expression in human osteosarcoma (A) and Ewing sarcoma (B) cell-lines.

I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS

expression (*Dlx1* and *Dlx4*) in osteoblastic tumor cells and the unexpected absence of *Dlx2* expression in all Ewing sarcoma cell-lines analyzed suggest the involvement of these genes in the tumorigenesis process. Further, more in-depth studies are necessary to elucidate the role of Dlx homeobox genes in bone cancer.

## References

- bib0010 1. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978;276:565-70.
- bib0015 2. McGinnis W, Levine MS, Hafen E, et al. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 1984;308:428-33.
- bib0020 3. Gehring WJ. Homeo boxes in the study of development. *Science* 1987;236:1245-52.
- bib0025 4. Gehring WJ, Müller M, Affolter M, et al. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet TIG* 1990;6:323-9.
- bib0030 5. Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* 1994;63:487-526.
- bib0035 6. De Robertis EM, Morita EA, Cho KW. Gradient fields and homeobox genes. *Dev Camb Engl* 1991;112:669-78.
- bib0040 7. Bally-Cuif L, Wassef M. Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:450-8.
- bib0045 8. Vieille-Grosjean I, Hunt P, Gulisano M, et al. Branchial HOX gene expression and human craniofacial development. *Dev Biol* 1997;183:49-60.
- bib0050 9. Holland PWH, Booth HAF, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol* 2007;5:47.
- bib0055 10. Bailey WJ, Kim J, Wagner GP, Ruddle FH. Phylogenetic reconstruction of vertebrate Hox cluster duplications. *Mol Biol Evol* 1997;14:843-53.
- bib0060 11. Krumlauf R. Mouse Hox genetic functions. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:621-5.
- bib0065 12. Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfoy B, Poupon MF, Dutrillaux B. Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet* 1996;73:114-5.
- bib0070 13. Cohen SM, Brönnner G, Küttner F, et al. Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 1989;338:432-4.
- bib0075 14. Holland PW. Cloning and evolutionary analysis of msh-like homeobox genes from mouse, zebrafish and ascidian. *Gene* 1991;98:253-7.
- bib0080 15. Holland PW, Garcia-Fernández J. Hox genes and chordate evolution. *Dev Biol* 1996;173:382-95.
- bib0085 16. Nakamura S, Stock DW, Wydner KL, et al. Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: *Dlx7*. *Genomics* 1996;38:314-24.
- bib0090 17. Robinson GW, Mahon KA. Differential and overlapping expression domains of *Dlx-2* and *Dlx-3* suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech Dev* 1994;48:199-215.
- bib0095 18. Robinson GW, Wray S, Mahon KA. Spatially restricted expression of a member of a new family of murine Distal-less homeobox genes in the developing forebrain. *New Biol* 1991;3:1183-94.
- bib0100 19. Stock DW, Ellies DL, Zhao Z, et al. The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10858-63.
- bib0105 20. Sumiyama K, Irvine SQ, Stock DW, et al. Genomic structure and functional control of the *Dlx3-7* bigene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:780-5.
- bib0110 21. Sumiyama K, Irvine SQ, Ruddle FH. The role of gene duplication in the evolution and function of the vertebrate *Dlx*/distal-less bigene clusters. *J Struct Funct Genomics* 2003;3:151-9.
- bib0115 22. Ellies DL, Stock DW, Hatch G, et al. Relationship between the genomic organization and the overlapping embryonic expression patterns of the zebrafish *dlx* genes. *Genomics* 1997;45:580-90.
- bib0120 23. Weiss KM, Bollekens J, Ruddle FH, Takashita K. Distal-less and other homeobox genes in the development of the dentition. *J Exp Zool* 1994;270:273-84.
- bib0125 24. Zerucha T, Muller JP, Chartrand N, Ekker M. Cross-interactions between two members of the *Dlx* family of homeobox-containing genes during zebrafish development. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 1997;75:613-22.
- bib0130 25. Zerucha T, Ekker M. Distal-less-related homeobox genes of vertebrates: evolution, function, and regulation. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 2000;78:593-601.
- bib0135 26. Neidert AH, Virupannavar V, Hooker GW, Langeland JA. Lamprey *Dlx* genes and early vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1665-70.
- bib0140 27. Simeone A, Acampora D, Pannese M, et al. Cloning and characterization of two members of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2250-4.
- bib0145 28. McGuinness T, Porteus MH, Smiga S, et al. Sequence, organization, and transcription of the *Dlx-1* and *Dlx-2* locus. *Genomics* 1996;35:473-85.
- bib0150 29. Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in *DLX3* associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:563-9.
- bib0155 30. Price M, Lemaistre M, Pischetola M, Di Lauro R, Duboule D. A mouse gene related to Distal-less shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* 1991;351:748-51.
- bib0160 31. Shirasawa T, Sakamoto K, Tkahashi H. Molecular cloning and evolutionary analysis of a mammalian homologue of the Distal-less 3 (*Dlx-3*) homeobox gene. *FEBS Lett* 1994;351:380-4.
- bib0165 32. Liu JK, Ghattas I, Liu S, Chen S, Rubenstein JL. *Dlx* genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1997;210:498-512.
- bib0170 33. Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, et al. Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 1997;185:165-84.
- bib0175 34. Quinn LM, Johnson BV, Nicholl J, et al. Isolation and identification of homeobox genes from the human placenta including a novel member of the Distal-less family, *DLX4*. *Gene* 1997;187:55-61.

### 3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)



35. Thomas BL, Tucker AS, Qui M, et al. Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Dev Camb Engl* 1997;124:4811–8.
36. Zerucha T, Stühmer T, Hatch G, et al. A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2000;20:709–21.
37. Sumiyama K, Ruddle FH. Regulation of Dlx3 gene expression in visceral arches by evolutionarily conserved enhancer elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4030–4.
38. Park BK, Sperber SM, Choudhury A, et al. Intergenic enhancers with distinct activities regulate Dlx gene expression in the mesenchyme of the branchial arches. *Dev Biol* 2004;268:532–45.
39. Poirtras L, Ghanem N, Hatch G, Ekker M. The proneural determinant MASH1 regulates forebrain Dlx1/2 expression through the H12b intergenic enhancer. *Dev Camb Engl* 2007;134:1755–65.
40. Yu M, Xi Y, Pollack J, et al. Activity of dlx5a/dlx6a regulatory elements during zebrafish GABAergic neuron development. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 2011;29:681–91.
41. Davideau JL, Demri P, Gu TT, et al. Expression of DLX5 during human embryonic craniofacial development. *Mech Dev* 1999;81:183–6.
42. Werner A, Bernal A. Natural antisense transcripts: sound or silence? *Physiol Genomics* 2005;23:125–31.
43. Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, et al. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7336–41.
44. Coudert AE, Pibouin L, Vi-Fane B, et al. Expression and regulation of the Msx1 natural antisense transcript during development. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5208–18.
45. Kraus P, Sivakamasundari V, Lim SL, et al. Making sense of Dlx1 antisense RNA. *Dev Biol* 2013;376:224–35.
46. Zhang H, Hu G, Wang H, et al. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 1997;17:2920–32.
47. Coubrough ML, Bendall AJ. Impaired nuclear import of mammalian Dlx4 proteins as a consequence of rapid sequence divergence. *Exp Cell Res* 2006;312:3880–91.
48. Morasso MI, Markova NG, Sargent TD. Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J Cell Biol* 1996;135:1879–87.
49. Vachon G, Cohen B, Pfeifle C, et al. Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *Distal-less*. *Cell* 1992;71:437–50.
50. Morasso MI, Mahon KA, Sargent TD. A *Xenopus* distal-less gene in transgenic mice: conserved regulation in distal limb epidermis and other sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3968–72.
51. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, et al. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1997;11:1681–94.
52. Feledy JA, Morasso MI, Jang SI, Sargent TD. Transcriptional activation by the homeodomain protein distal-less 3. *Nucleic Acids Res* 1999;27:764–70.
53. Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, et al. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 2004;24:9248–61.
54. Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, et al. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem* 2006;281:40515–26.
55. Hassan MQ, Saini S, Gordon JAR, et al. Molecular switches involving homeodomain proteins, HOXA10 and RUNX2 regulate osteoblastogenesis. *Cells Tissues Organs* 2009;189:122–5.
56. Roca H, Franceschi RT. Analysis of transcription factor interactions in osteoblasts using competitive chromatin immunoprecipitation. *Nucleic Acids Res* 2008;36:1723–30.
57. Iler N, Rowitch DH, Echelard Y, et al. A single homeodomain binding site restricts spatial expression of Wnt-1 in the developing brain. *Mech Dev* 1995;53:87–96.
58. Chiba S, Takeshita K, Imai Y, et al. Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15577–82.
59. Jeong J, Cesario J, Zhao Y, et al. Cleft palate defect of Dlx1/2<sup>-/-</sup> mutant mice is caused by lack of vertical outgrowth in the posterior palate. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 2012;241:1757–69.
60. Dodig M, Kronenberg MS, Bedalov A, et al. Identification of a TAAT-containing motif required for high level expression of the COL1A1 promoter in differentiated osteoblasts of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996;271:16422–9.
61. Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry (Mosc)* 1998;37:16360–8.
62. Tadić T, Erceg I, Stover ML, et al. Dlx5 induces expression of COL1A1 promoter contained in a retrovirus vector. *Croat Med J* 2001;42:436–9.
63. Tadić T, Dodig M, Erceg I, et al. Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2002;17:1008–14.
64. Xu SC, Harris MA, Rubenstein JL, et al. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) signaling to the Col2alpha1 gene in chondroblasts requires the homeobox gene Dlx-2. *DNA Cell Biol* 2001;20:359–65.
65. Lézet F, Descroix V, Mesbah M, et al. Cross-talk between Msx/Dlx homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization. *Connect Tissue Res* 2002;43:509–14.
66. Harris SE, Guo D, Harris MA, et al. Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci J Virtual Libr* 2003;8:s1249–1265.
67. Zhou Q-P, Le TN, Qiu X, et al. Identification of a direct Dlx homeodomain target in the developing mouse forebrain and retina by optimization of chromatin immunoprecipitation. *Nucleic Acids Res* 2004;32:884–92.
68. Lézet F, Thomas B, Greene SR, et al. Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation. *J Cell Physiol* 2008;216:688–97.
69. Potter GB, Petryniak MA, Shevchenko E, et al. Generation of Cre-transgenic mice using Dlx1/Dlx2 enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. *Mol Cell Neurosci* 2009;40:167–86.

I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS



- bib0355 70. Paina S, Garzotto D, DeMarchis S, et al. Wnt5a is a transcriptional target of Dlx homeogenes and promotes differentiation of interneuron progenitors in vitro and in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2011;31:2675–87.
- bib0360 71. Yu L, van der Valk M, Cao J, et al. Sclerostin expression is induced by BMPs in human Saos-2 osteosarcoma cells but not via direct effects on the sclerostin gene promoter or ECR5 element. *Bone* 2011;49:1131–40.
- bib0365 72. Esterberg R, Fritz A. *dlx3b/4b* are required for the formation of the preplacodal region and otic placode through local modulation of BMP activity. *Dev Biol* 2009;325:189–99.
- bib0370 73. Choi SJ, Song IS, Feng JQ, et al. Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. *Dev Biol* 2010;344:682–92.
- bib0375 74. Shimamoto T, Ohyashiki K, Takeshita K. DLX-7 homeobox gene regulates *c-myc* and GATA-1 gene expression in different stages respectively. *Int J Oncol* 1999;15:307–13.
- bib0380 75. Benson MD, Bargeon JL, Xiao G, et al. Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression. *J Biol Chem* 2000;275:13907–17.
- bib0385 76. Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, et al. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 2001;6:851–6.
- bib0390 77. Kim Y-J, Lee M-H, Wozney JM, et al. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem* 2004;279:50773–80.
- bib0395 78. Levi G, Mantero S, Barbieri O, et al. Msx1 and Dlx5 act independently in development of craniofacial skeleton, but converge on the regulation of Bmp signaling in palate formation. *Mech Dev* 2006;123:3–16.
- bib0400 79. Holleville N, Matéos S, Bontoux M, et al. Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev Biol* 2007;304:860–74.
- bib0405 80. Vieux-Rochas M, Bouhali K, Mantero S, et al. BMP-mediated functional cooperation between Dlx5/Dlx6 and Msx1/Msx2 during mammalian limb development. *PLoS One* 2013;8:e51700.
- bib0410 81. Bryan JT, Morasso MI. The Dlx3 protein harbors basic residues required for nuclear localization, transcriptional activity and binding to Msx1. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 22):4013–23.
- bib0415 82. Masuda Y, Sasaki A, Shibuya H, et al. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* 2001;276:5331–8.
- bib0420 83. Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, et al. An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 2010;140:744–52.
- bib0425 84. Rosas-Acosta G, Russell WK, Deyrieux A, et al. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics MCP* 2005;4:56–72.
- bib0430 85. Schild-Poulter C, Pope L, Giffin W, et al. The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001;276:16848–56.
- bib0435 86. Venugopalan SR, Li X, Amen MA, et al. Hierarchical interactions of homeodomain and forkhead transcription factors in regulating odontogenic gene expression. *J Biol Chem* 2011;286:21372–83.
- bib0440 87. Wagner SA, Beli P, Weiner BT, et al. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics MCP* 2011;10. M111.013284.
- bib0445 88. Wang J, Huo K, Ma L, et al. Toward an understanding of the protein interaction network of the human liver. *Mol Syst Biol* 2011;7:536.
- bib0450 89. Yu G, Zerucha T, Ekker M, Rubenstein JL. Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;130:217–30.
- bib0455 90. Newberry EP, Latifi T, Towler DA. The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry (Mosc)* 1999;38:10678–90.
- bib0460 91. Wissmüller S, Kosian T, Wolf M, et al. The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1735–44.
- bib0465 92. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 2012;150:987–1001.
- bib0470 93. Cohn MJ, Tickle C. Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet TIG* 1996;12:253–7.
- bib0475 94. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997;90:979–90.
- bib0480 95. Dollé P, Price M, Duboule D. Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development. *Differ Res Biol Divers* 1992;49:93–9.
- bib0485 96. Bulfone A, Kim HJ, Puelles L, et al. The mouse Dlx-2 (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev* 1993;40:129–40.
- bib0490 97. Zhao GQ, Zhao S, Zhou X, et al. rDlx, a novel distal-less-like homeoprotein is expressed in developing cartilages and discrete neuronal tissues. *Dev Biol* 1994;164:37–51.
- bib0495 98. Ferrari D, Sumoy L, Gannon J, et al. The expression pattern of the Distal-less homeobox-containing gene Dlx-5 in the developing chick limb bud suggests its involvement in apical ectodermal ridge activity, pattern formation, and cartilage differentiation. *Mech Dev* 1995;52:257–64.
- bib0500 99. Ferrari D, Harrington A, Dealy CN, Koshier RA. Dlx-5 in limb initiation in the chick embryo. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1999;216:10–5.
- bib0505 100. Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 2000;247:17–31.
- bib0510 101. Panganiban G, Rubenstein JLR. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Dev Camb Engl* 2002;129:4371–86.
- bib0515 102. Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev* 2002;16:1089–101.
- bib0520 103. Kraus P, Lufkin T. Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development. *Am J Med Genet A* 2006;140:1366–74.
- bib0525 104. Lo Iacono N, Mantero S, Chiarelli A, et al. Regulation of Dlx5 and Dlx6 gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. *Dev Camb Engl* 2008;135:1377–88.
- bib0530 105. Hill RE, Jones PF, Rees AR, et al. A new family of mouse homeobox-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev* 1989;3:26–37.

### 3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)



- bib0535 106. Robert B, Sassoon D, Jacq B, et al. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J* 1989;8:91-100.
- bib0540 107. Davidson DR, Crawley A, Hill RE, Tickle C. Position-dependent expression of two related homeobox genes in developing vertebrate limbs. *Nature* 1991;352:429-31.
- bib0545 108. Suzuki HR, Padanilam BJ, Vitale E, et al. Repeating developmental expression of G-Hox 7, a novel homeobox-containing gene in the chicken. *Dev Biol* 1991;148:375-88.
- bib0550 109. Qiu M, Bulfone A, Martinez S, et al. Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain. *Genes Dev* 1995;9:2523-38.
- bib0555 110. Acampora D, Merlo GR, Paleari L, et al. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. *Dev Camb Engl* 1999;126:3795-809.
- bib0560 111. Depew MJ, Liu JK, Long JE, et al. Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Dev Camb Engl* 1999;126:3831-46.
- bib0565 112. Dirksen ML, Mathers P, Jamrich M. Expression of a *Xenopus* Distal-less homeobox gene involved in forebrain and cranio-facial development. *Mech Dev* 1993;41:121-8.
- bib0570 113. Akimenko MA, Ekker M, Wegner J, et al. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1994;14:3475-86.
- bib0575 114. Kraus P, Lufkin T. Mammalian Dlx homeobox gene control of craniofacial and inner ear morphogenesis. *J Cell Biochem* 1999;Suppl 32-33:133-40.
- bib0580 115. Depew MJ, Simpson CA, Morasso M, Rubenstein JLR. Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *J Anat* 2005;207:501-61.
- bib0585 116. Beverdam A, Merlo GR, Paleari L, et al. Jaw transformation with gain of symmetry after Dlx5/Dlx6 inactivation: mirror of the past? *Genes New York N* 2000 2002;34:221-7.
- bib0590 117. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet TIG* 2003;19:458-66.
- bib0595 118. Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, et al. A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 1999;208:123-33.
- bib0600 119. Li H, Marijanovic I, Kronenberg MS, et al. Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage. *Dev Biol* 2008;316:458-70.
- bib0605 120. Chen X, Li X, Wang W, Lufkin T. Dlx5 and Dlx6: an evolutionary conserved pair of murine homeobox genes expressed in the embryonic skeleton. *Ann N Y Acad Sci* 1996;785:38-47.
- bib0610 121. Bendall AJ, Hu G, Levi G, Abate-Shen C. Dlx5 regulates chondrocyte differentiation at multiple stages. *Int J Dev Biol* 2003;47:335-44.
- bib0615 122. Chin H-J, Fisher MC, Li Y, et al. Studies on the role of Dlx5 in regulation of chondrocyte differentiation during endochondral ossification in the developing mouse limb. *Dev Growth Differ* 2007;49:515-21.
- bib0620 123. Samee N, de Vernejoul M-C, Levi G. Role of DLX regulatory proteins in osteogenesis and chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2007;17:173-86.
- bib0625 124. Zhu H, Bendall AJ. Dlx5 is a cell autonomous regulator of chondrocyte hypertrophy in mice and functionally substitutes for Dlx6 during endochondral ossification. *PLoS One* 2009;4:e8097.
- bib0630 125. Lui JCK, Andrade AC, Forcinito P, et al. Spatial and temporal regulation of gene expression in the mammalian growth plate. *Bone* 2010;46:1380-90.
- bib0635 126. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996;273:663-6.
- bib0640 127. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273:613-22.
- bib0645 128. Zou H, Wieser R, Massagué J, Niswander L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 1997;11:2191-203.
- bib0650 129. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006;97:33-44.
- bib0655 130. Locklin RM, Riggs BL, Hicok KC, et al. Assessment of gene regulation by bone morphogenetic protein 2 in human marrow stromal cells using gene array technology. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2001;16:2192-204.
- bib0660 131. Mehlhorn AT, Niemeier P, Kaschte K, et al. Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif* 2007;40:809-23.
- bib0665 132. Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Lézot F, et al. Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues. *Bone* 2005;37:799-809.
- bib0670 133. Merlo GR, Paleari L, Mantero S, et al. Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genes New York N* 2000 2002;33:97-101.
- bib0675 134. Lézot F, Thomas BL, Blin-Wakkach C, et al. Dlx homeobox gene family expression in osteoclasts. *J Cell Physiol* 2010;223:779-87.
- bib0680 135. Shimamoto T, Nakamura S, Bollekens J, et al. Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and *c-myc* genes and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3245-9.
- bib0685 136. Haga SB, Fu S, Karp JE, et al. BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia* 2000;14:1867-75.
- bib0690 137. Ferrari N, Palmisano GL, Paleari L, et al. DLX genes as targets of ALL-1: DLX 2,3,4 down-regulation in t(4;11) acute lymphoblastic leukemias. *J Leukoc Biol* 2003;74:302-5.
- bib0695 138. Yu M, Yang Y, Niu R-F, et al. [Clinicopathological significance of homeobox gene BP1 mRNA expression in human breast cancer]. *Ai Zheng Aizheng Chin J Cancer* 2004;23:855-9.
- bib0700 139. Campo Dell'Orto M, Banelli B, Giarin E, et al. Down-regulation of DLX3 expression in MLL-AF4 childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation. *Oncol Rep* 2007;18:417-23.
- bib0705 140. Awwad RT, Do K, Stevenson H, et al. Overexpression of BP1, a homeobox gene, is associated with resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 2008;87:195-203.
- bib0710 141. Tan Y, Timakhov RA, Rao M, et al. A novel recurrent chromosomal inversion implicates the homeobox gene Dlx5 in T-cell lymphomas from Lck-Akt2 transgenic mice. *Cancer Res* 2008;68:1296-302.

I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS



- bib0715 142. Xu J, Testa JR. DLX5 (distal-less homeobox 5) promotes tumor cell proliferation by transcriptionally regulating MYC. *J Biol Chem* 2009;284:20593–601.
- bib0720 143. Starkova J, Gadgil S, Qiu YH, et al. Up-regulation of homeodomain genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 signaling. *Haematologica* 2011;96:820–8.
- bib0725 144. Fu SW, Schwartz A, Stevenson H, et al. Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2003;5:R82–87.
- bib0730 145. Neufing PJ, Kalionis B, Horsfall DJ, et al. Expression and localization of homeodomain proteins DLX4/HB9 in normal and malignant human breast tissues. *Anticancer Res* 2003;23:1479–88.
- bib0735 146. Cavalli LR, Man Y-G, Schwartz AM, et al. Amplification of the BP1 homeobox gene in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;187:19–24.
- bib0740 147. Man Y-G, Schwartz A, Levine PH, et al. BP1, a putative signature marker for inflammatory breast cancer and tumor aggressiveness. *Cancer Biomarkers Sect Dis Markers* 2009;5:9–17.
- bib0745 148. Song Y, Dang C, Fu Y, et al. Genome-wide analysis of BP1 transcriptional targets in breast cancer cell line Hs578T. *Int J Biol Sci* 2009;5:1–12.
- bib0750 149. Morini M, Astigiano S, Gitton Y, et al. Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *BMC Cancer* 2010;10:649.
- bib0755 150. Zhang L, Yang M, Gan L, et al. DLX4 upregulates TWIST and enhances tumor migration, invasion and metastasis. *Int J Biol Sci* 2012;8:1178–87.
- bib0760 151. Xian Y, Dang C, Yan C, et al. [Clinicopathological significance of homeobox BP1 mRNA expression in lung cancer tissue]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006;26:1173–5.
- bib0765 152. Tomida S, Yanagisawa K, Koshikawa K, et al. Identification of a metastasis signature and the DLX4 homeobox protein as a regulator of metastasis by combined transcriptome approach. *Oncogene* 2007;26:4600–8.
- bib0770 153. Kato T, Sato N, Takano A, et al. Activation of placenta-specific transcription factor distal-less homeobox 5 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14:2363–70.
- bib0775 154. Cantile M, Kisslinger A, Cindolo L, et al. cAMP induced modifications of HOX D gene expression in prostate cells allow the identification of a chromosomal area involved in vivo with neuroendocrine differentiation of human advanced prostate cancers. *J Cell Physiol* 2005;205:202–10.
- bib0780 155. Schwartz AM, Man Y-G, Rezaei MK, et al. BP1, a homeoprotein, is significantly expressed in prostate adenocarcinoma and is concordant with prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol Off J United States Can Acad Pathol Inc* 2009;22:1–6.
- bib0785 156. Hollington P, Neufing P, Kalionis B, et al. Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues. *Anticancer Res* 2004;24:955–62.
- bib0790 157. Dodds AP, Cox SA, Suggs CA, et al. Characterization and mRNA expression in an unusual odontogenic lesion in a patient with trichodonto-osseous syndrome. *Histol Histopathol* 2003;18:849–54.
- bib0795 158. Ruhin-Poncet B, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, et al. Msx and dlx homeogene expression in epithelial odontogenic tumors. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2009;57:69–78.
- bib0800 159. Yan Z-H, Bao Z-S, Yan W, et al. Upregulation of DLX2 confers a poor prognosis in glioblastoma patients by inducing a proliferative phenotype. *Curr Mol Med* 2013;13:438–45.
- bib0805 160. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, et al. Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J Pathol* 2006;210:441–9.
- bib0810 161. Roberson MS, Meeremann S, Morasso MI, et al. A role for the homeobox protein Distal-less 3 in the activation of the glycoprotein hormone alpha subunit gene in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:10016–24.
- bib0815 162. Peng L, Huang Y, Jin F, Jiang S-W, Payne AH. Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the Type I human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2004;18:2049–60.
- bib0820 163. Sun Y, Lu X, Yin L, Zhao F, Feng Y. Inhibition of DLX4 promotes apoptosis in choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 2006;27:375–83.
- bib0825 164. Hara F, Samuel S, Liu J, et al. A homeobox gene related to *Drosophila* distal-less promotes ovarian tumorigenicity by inducing expression of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol* 2007;170:1594–606.
- bib0830 165. Tan Y, Cheung M, Pei J, et al. Upregulation of DLX5 promotes ovarian cancer cell proliferation by enhancing IRS-2-AKT signaling. *Cancer Res* 2010;70:9197–206.
- bib0835 166. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, et al. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer J Int Cancer* 2005;116:407–14.
- bib0840 167. Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:7939–47.
- bib0845 168. Timakhov RA, Tan Y, Rao M, et al. Recurrent chromosomal rearrangements implicate oncogenes contributing to T-cell lymphomagenesis in Lck-MyrAkt2 transgenic mice. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:786–94.
- bib0850 169. Park K, Kim K, Rho SB, et al. Homeobox Msx1 interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 2005;65:749–57.
- bib0855 170. Morasso MI, Radoja N. Dlx genes, p63, and ectodermal dysplasias. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* 2005;75:163–71.
- bib0860 171. Takahashi C, Akiyama N, Kitayama H, et al. Possible involvement of MSX-2 homeoprotein in v-ras-induced transformation. *Leukemia* 1997;11 Suppl 3:340–3.
- bib0865 172. Stevenson HS, Fu SW, Pinzone JJ, et al. BP1 transcriptionally activates bcl-2 and inhibits TNFalpha-induced cell death in MCF7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR* 2007;9:R60.
- bib0870 173. Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 2002;67:705–12.
- bib0875 174. Sasaki A, Hinck L, Watanabe K. RumMAGE-D the members: structure and function of a new adaptor family of MAGE-D proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 2005;25:181–98.
- bib0880 175. Shen W-G, Xue Q-Y, Wu Y-D, et al. Melanoma-associated antigen family protein-D1 regulation of tumor cell migration, adhesion to endothelium, and actin structures reorganization in response to hypoxic stress. *Cell Commun Adhes* 2007;14:21–31.

### 3. MARKERS OF BONE CANCER (CELLS, GENES AND PROTEINS)

- bib0885 176. Shimada K, Ikeda K, Ito K. Traf2 interacts with Smad4 and regulates BMP signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:775-9.
- bib0890 177. Ohta H, Aoyagi K, Fukaya M, et al. Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers. *Br J Cancer* 2009;100:389-98.
- bib0895 178. Willert J, Epping M, Pollack JR, et al. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol* 2002;2:8.
- bib0900 179. Revet I, Huizenga G, Koster J, et al. MSX1 induces the Wnt pathway antagonist genes DKK1, DKK2, DKK3, and SFRP1 in neuroblastoma cells, but does not block Wnt3 and Wnt5A signalling to DVL3. *Cancer Lett* 2010;289:195-207.
- bib0905 180. Lee H-L, Yi T, Woo KM, et al. Msx2 mediates the inhibitory action of TNF-alpha on osteoblast differentiation. *Exp Mol Med* 2010;42:437-45.
- bib0910 181. Song Y-C, Fu S-D, Wen X-P, et al. [Expression and Significance of BP1 Gene and Cyclin D1 Gene in Breast Cancer]. *Ai Zheng Aizheng Chin J Cancer* 2007;26:709-14.
- bib0915 182. Di Bari MG, Ginsburg E, Plant J, et al. Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1. *J Cell Physiol* 2009;219:659-66.
- bib0920 183. Hamada S, Satoh K, Hirota M, et al. Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol* 2007;213:768-74.
- bib0925 184. Van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone* 2011;48:37-43.
- bib0930 185. Baum B, Settleman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:294-308.
- bib0935 186. Lee SY, Jeon HM, Kim CH, et al. Homeobox gene Dlx-2 is implicated in metabolic stress-induced necrosis. *Mol Cancer* 2011;10:113.

I. BASIC ASPECTS OF BONE CANCERS







## Bone resorption: an actor of dental and periodontal development?

Andrea Gama<sup>1,2†</sup>, Benjamin Navet<sup>3,4†</sup>, Jorge William Vargas<sup>3,4,5</sup>, Beatriz Castaneda<sup>1,5</sup> and Frédéric Lézot<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-1138, Equipe 5, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, <sup>2</sup> Odontologic Center of District Federal Military Police, Brasilia, Brazil, <sup>3</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-957, Equipe Ligue Nationale Contre le Cancer, Nantes, France, <sup>4</sup> Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>5</sup> Department of Basic Studies, Faculty of Odontology, University of Antioquia, Medellín, Colombia

Dental and periodontal tissue development is a complex process involving various cell-types. A finely orchestrated network of communications between these cells is implicated. During early development, communications between cells from the oral epithelium and the underlying mesenchyme govern the dental morphogenesis with successive bud, cap and bell stages. Later, interactions between epithelial and mesenchymal cells occur during dental root elongation. Root elongation and tooth eruption require resorption of surrounding alveolar bone to occur. For years, it was postulated that signaling molecules secreted by dental and periodontal cells control bone resorbing osteoclast precursor recruitment and differentiation. Reverse signaling originating from bone cells (osteoclasts and osteoblasts) toward dental cells was not suspected. Dental defects reported in osteopetrosis were associated with mechanical stress secondary to defective bone resorption. In the last decade, consequences of bone resorption over-activation on dental and periodontal tissue formation have been analyzed with transgenic animals (*RANK<sup>Tg</sup>* and *Opg<sup>-/-</sup>* mice). Results suggest the existence of signals originating from osteoclasts toward dental and periodontal cells. Meanwhile, experiments consisting in transitory inhibition of bone resorption during root elongation, achieved with bone resorption inhibitors having different mechanisms of action (bisphosphonates and RANKL blocking antibodies), have evidenced dental and periodontal defects that support the presence of signals originating bone cells toward dental cells. The aim of the present manuscript is to present the data we have collected in the last years that support the hypothesis of a role of bone resorption in dental and periodontal development.

**Keywords:** bone resorption, RANKL, Zoledronic acid, tooth

### INTRODUCTION

Early tooth development, more precisely initiation and morphogenesis, has been extensively studied in the last decades. Factors implicated in the cross-talk between epithelial and mesenchymal cells have been identified (for review Mitsiadis and Graf, 2009). Regarding later stages of tooth development, more precisely dental and periodontal histogenesis, the differentiation processes of mineralized tissue forming cells (namely amelogenesis, dentinogenesis and cementogenesis)

### OPEN ACCESS

**Edited by:**

Thimos Mitsiadis,  
University of Zurich, Switzerland

**Reviewed by:**

Gianpaolo Papaccio,  
Second University of Naples, Italy  
Jean-Christophe Farges,  
University Lyon 1, France  
Harald Osmundsen,  
University of Oslo, Norway

**\*Correspondence:**

Frédéric Lézot  
frederic.lezot@univ-nantes.fr

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work.

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Craniofacial Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 31 July 2015

**Accepted:** 21 October 2015

**Published:** 05 November 2015

**Citation:**

Gama A, Navet B, Vargas JW,  
Castaneda B and Lézot F (2015) Bone  
resorption: an actor of dental and  
periodontal development?  
Front. Physiol. 6:319.  
doi: 10.3389/fphys.2015.00319

have also been widely studied (Foster et al., 2007; Babajko et al., 2014; Bleicher, 2014). Pathologies associated with dysfunctions of these processes are nowadays well characterized as amelogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta (Cobourne and Sharpe, 2013). Dental and periodontal histogenesis corresponds to an important volumetric growth of these tissues, more precisely regarding root formation. Consequently, the surrounding alveolar bone has to be remodeled simultaneously to enable normal tooth development and a dental functional achievement through the eruption process. Bone remodeling requires differentiation and activity of bone resorbing cells from hematopoietic origin called osteoclasts. Osteoclastogenesis is a well-characterized process with three consecutive steps corresponding to precursors recruitment, their fusion into mature polynucleated osteoclasts and finally the activation of these mature osteoclasts (Lézot et al., 2010). The two major signaling factors implicated in these differentiation steps are presented in **Figure 1**.

Signals coming from dental and periodontal tissues were shown to stimulate the alveolar bone remodeling (Wise, 2009). Indeed, these tissues secrete factors stimulating osteoclastogenesis (Wise, 2009). The absence of alveolar bone formation in the case of dental agenesis (**Figure 2A**) supported the assertion that dental and periodontal tissues are central coordinator elements in the development of the dento-alveolar bone complex. Moreover, the apparently normal development of the crown region observed in osteopetrotic mouse models (**Figure 2B**), despite the altered bone resorption, suggests that crown mineralized tissue formation is independent of bone resorption.

In this context it was not surprising that potential reverse signals from bone cells toward dental and periodontal tissues

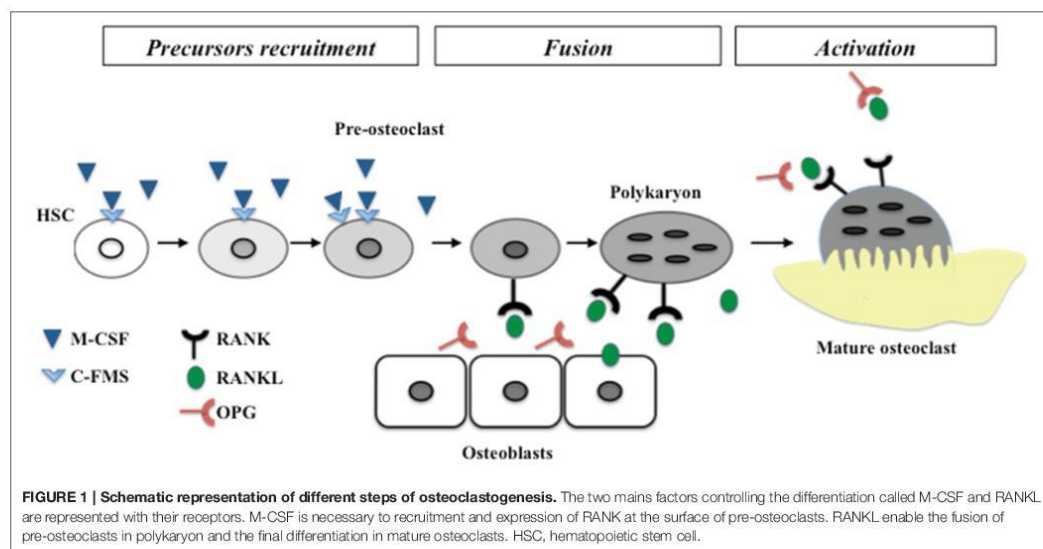
have been rarely considered. Recently, the analysis of dental and periodontal development in mouse models of hyper-resorption ( $RANK^{Tg}$  and  $Opg^{-/-}$ ) has changed the vision of the dento-alveolar bone complex development (Castaneda et al., 2011, 2013). Bone resorption was for the first time shown to be an active element of the dental and periodontal tissues development. This active implication was supported by results of studies comprising transitory inhibition of bone resorption during dental and periodontal tissue histogenesis, achieved with bisphosphonate or RANKL blocking antibody (Lézot et al., 2014, 2015). In these studies dental and periodontal tissue defects were associated and proportional to the induced delay of tooth eruption.

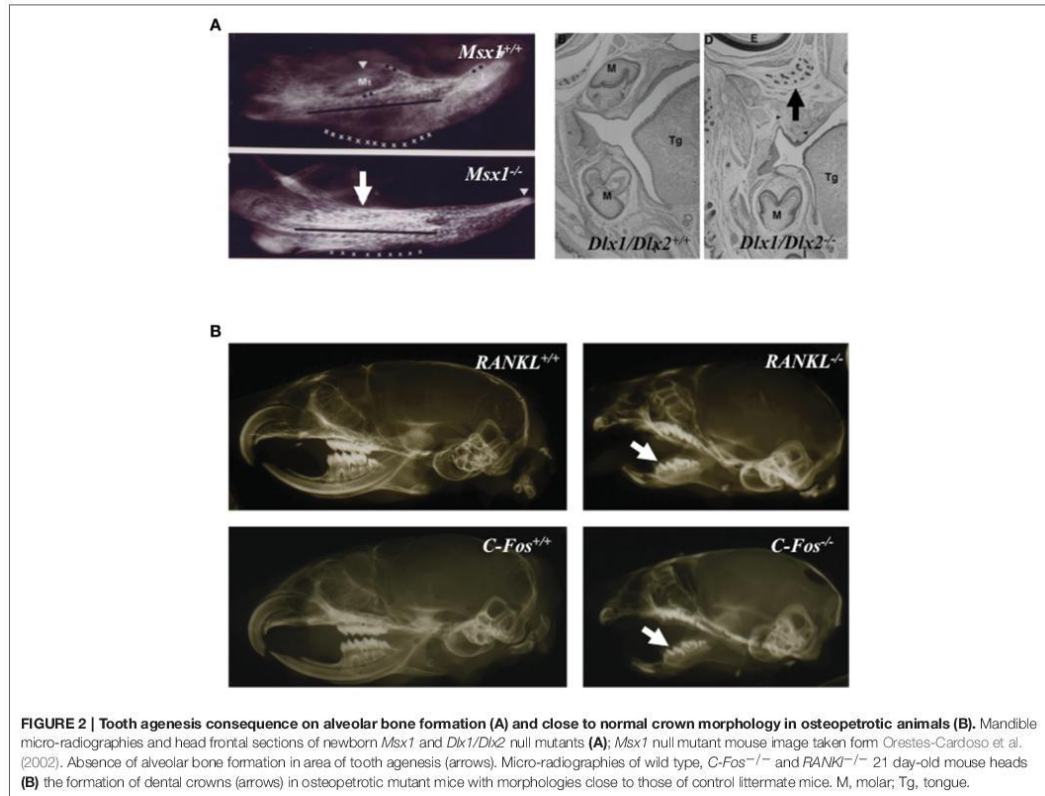
Here we present a hypothetical model of tooth root and periodontal development based on our own results as well as on previously reported by other findings.

## CURRENT STATUS CONCERNING TOOTH ROOT AND PERIODONTAL FORMATION: FACTS AND HYPOTHESES

### Consequences of RANK Over-expression in the Monocyte-macrophage Lineage ( $RANK^{Tg}$ Mouse) on Dental and Periodontal Development

In order to analyze the consequences of RANK over-expression on dental and periodontal tissue growth, a transgenic mouse-line overexpressing RANK in the osteoclast precursors ( $RANK^{Tg}$ ; Duheron et al., 2011) was used. The dental and periodontal phenotype of  $RANK^{Tg}$  mouse was analyzed comparatively to





littermate from birth to 1 month (Castaneda et al., 2011). Results show a significant increase in the osteoclast number around the tooth at all ages. This led to an earlier tooth eruption and an accelerated tooth root elongation (Figure 3). The final root length is not affected (Figure 4) but an important reduction of the root diameter is observed no matter what the genetic background (wild-type or *Msx2* null mutant) considered (Castaneda et al., 2011, 2013).

Interestingly, the complex phenotype of *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse combining amelogenesis imperfecta, root dysmorphia (defects in Hertwig epithelial root sheaths (HERS) and epithelial rests of Malassez), mild-osteopetrosis (with *RANK1* expression severely decreased in the dental epithelium and alveolar bone), and dentinogenesis imperfecta (Aïoub et al., 2007; Molla et al., 2010; Berdal et al., 2011) was partly rescued by RANK over-expression (Castaneda et al., 2013). Indeed, RANK over-expression resulted in significant recovery of all molar eruption and root elongation processes (Figure 4). However, the roots remained shorter than in wild-type mice and no improvement of the crown morphology was observed (Figure 4).

These results show that root length is genetically determined while root thickness is environmentally controlled, specifically by the bone resorption ability.

The complete analysis of the *RANK*<sup>Tg</sup> mouse dento-alveolar bone complex phenotype has so enabled to demonstrate that bone resorption is an important element of dental and periodontal tissue development (Castaneda et al., 2011, 2013). RANK over-expression induces an early tooth eruption and root elongation with, as a final consequence, a reduction of the root diameter. This accelerated tooth root elongation corresponds to an increase of HERS cells and adjacent follicular sac mesenchyme cells proliferation (Castaneda et al., 2011). The final root lengths of the RANK transgenic and wild type mice are similar suggesting that the interactions between epithelial and mesenchyme cells are correct but accelerated (Castaneda et al., 2011). The *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse present many defects of the root formation (Aïoub et al., 2007) including an important reduction of the length as shown in Figure 5. The fact that, in the *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse the RANK over-activation has no repercussion on the final root length validates that root length is genetically determined. Meanwhile, the root diameter appears to be micro-environmentally controlled, more



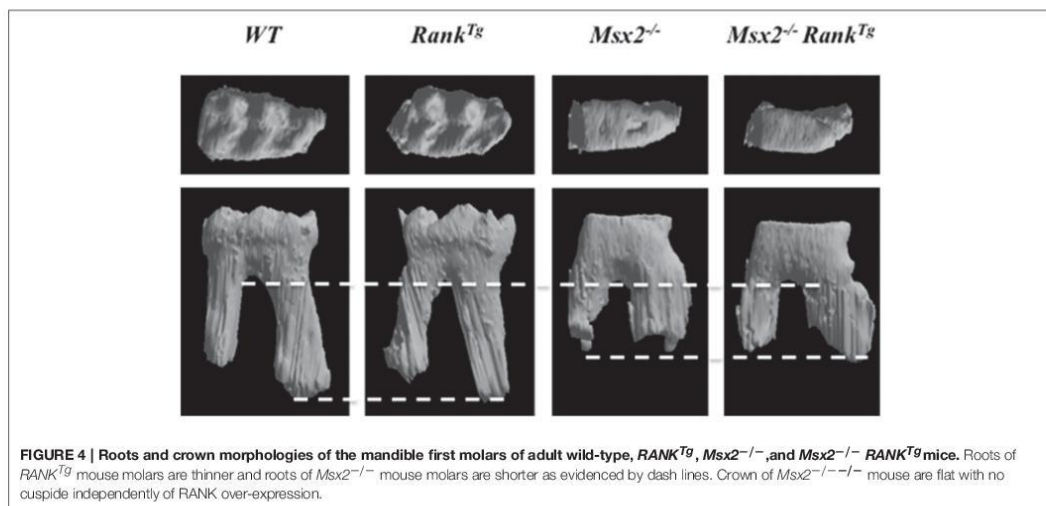
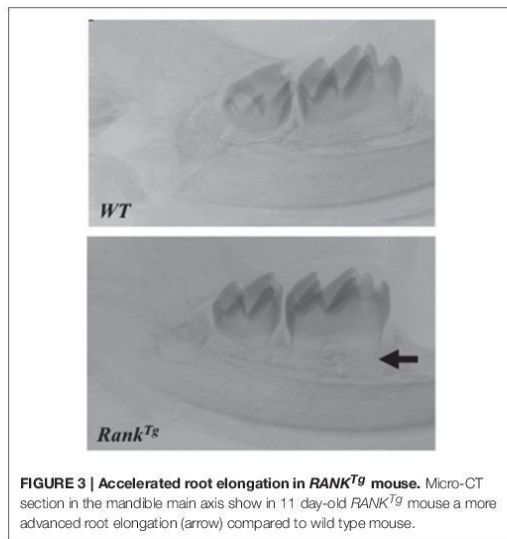
specifically by the bone resorption capability (Castaneda et al., 2011, 2013). Finally the reverse relationship between bone resorption level and the root diameter established by these studies (Castaneda et al., 2011) could explain part of the root defects seen in diseases with perturbations of the osteoclast function. Concerning the root resorption observed in these diseases, the question of a relationship between root thinness and the prevalence of root resorption is raised. Interestingly, such thin root resorptions are observed in the *Opg*<sup>-/-</sup> mouse (Koide et al., 2013) in the context of a progressive loss of the alveolar bone.

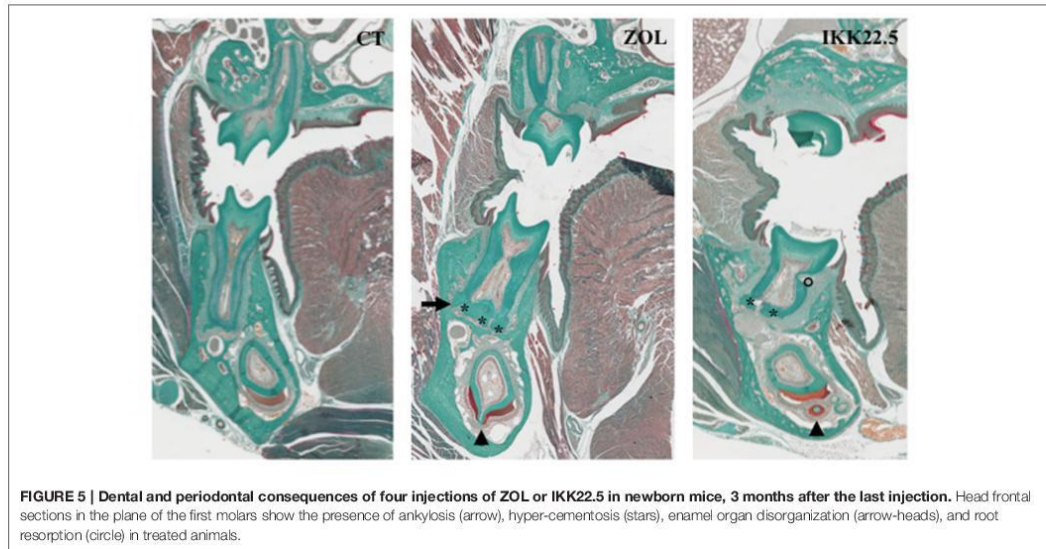
In humans, *RANK* gene gains of function mutations have been found in three seemingly distinctive disorders (the Familial Expansile Osteolysis, the Expansile Skeletal Hyperphosphatasia and the Early-onset Paget Disease of Bone). These mutations increase the *RANK* signal peptide length and alter its normal cleavage, what is believed to cause a NF- $\kappa$ B pathway over-activation (Whyte and Hughes, 2002; Nakatsuka et al., 2003). Such over-activation of the *RANK*-signaling pathway causes a hyper-osteoclastic activity that increases the bone turnover. A notable observation in these patients is an early tooth loss associated in some case with an idiopathic external resorption localized at either apical or cervical levels (Mitchell et al., 1990; Hughes et al., 1994; Whyte, 2006). This convergence of phenotype between human patients and *RANK*<sup>Tg</sup> mice qualified the *RANK*<sup>Tg</sup> mouse as a model of these three different pathologies and confirmed the importance of bone resorption for dental and periodontal tissue development.

### Consequences of Transitory Inhibition of Bone Resorption Using Zoledronic Acid or a RANKL Blocking Antibody on Dental and Periodontal Development

In order to analyze the consequences of transitory inhibitions of bone resorption on dental and periodontal tissue growth, a powerful pharmacologic inhibitor of bone resorption from the bisphosphonate family was injected (four injections in total every 2 days) in newborn or 1 week-old mice. The impact on dental and periodontal tissues was analyzed at the end of treatment, 1 and 3 months after the last injection. Zoledronic acid (ZOL), a third generation bisphosphonate, was chosen for experiments and C57BL/6J and CD1 mice used.

The different molars were not similarly affected by the treatment. A relationship appears between severity of dental and periodontal defects and each molar developmental period





**FIGURE 5 | Dental and periodontal consequences of four injections of ZOL or IKK22.5 in newborn mice, 3 months after the last injection.** Head frontal sections in the plane of the first molars show the presence of ankylosis (arrow), hyper-cementosis (stars), enamel organ disorganization (arrow-heads), and root resorption (circle) in treated animals.

encompassed by the treatment. Indeed, when injections were performed in newborn pups, the first molar was the most affected and the third molar the least affected (Lézot et al., 2014, 2015). The C57BL/6J mice appear to be more sensitive to ZOL than the CD1 mice who need more elevated doses to obtain similar effects (Lézot et al., 2015). In addition to delayed eruption, the main observed defects of dental and periodontal tissues were abnormal amelogenesis with disorganized ameloblasts, root ankylosis, hypercementosis and with time presence of root resorption (Figure 5; Lézot et al., 2014). These results evidence that transitory inhibition of bone resorption with ZOL irreversibly impact the histogenesis of dental and periodontal tissues with long-term consequences that remain to be evaluated.

Similar experiments were performed with another powerful inhibitor of bone resorption, a RANKL blocking antibody named IKK22.5.

Experimental results evidenced that while C57BL/6J mice had several teeth included, CD1 mouse had only the upper first molars included confirming the difference of sensitivity to bone resorption inhibitors between these two mouse strains (Lézot et al., 2015). Regarding the dental and periodontal phenotype of non-included molars of CD1 mouse, similar defects to those induced by ZOL injections were observed (Figure 5). Interestingly, after the end of treatment with the IK22.5 antibody, a shorter period is necessary to observe neo-osteoclasts presence on the alveolar bone surface than observed after ZOL treatment (Lézot et al., 2015) signaling a more stable inhibition with ZOL than with IKK22.5.

These results demonstrate that transitory use of two different pharmacological bone resorption inhibitors during root

elongation induces dental and periodontal defects. This supports our hypothesis of the existence of signaling from bone cells toward dental cells. These powerful pharmacological inhibitors were developed for the treatment of pathologies characterized by excessive bone resorption such as juvenile Paget's disease, osteoporosis, primary or metastatic bone tumors and familial expansile osteolysis (Silverman, 2011; Zwolak and Dudek, 2013; Tella and Gallagher, 2014). In pediatric patients, a RANKL-blocking antibody (Denosumab) is currently under clinical evaluation for osteogenesis imperfecta (phase 2 clinical trial NCT01799798) and for Giant Cell Tumor of Bone (phase 2 clinical trial NCT00680992) with promising preliminary reports in both cases (Semler et al., 2012; Chawla et al., 2013; Karras et al., 2013; Demirsoy et al., 2014; Federman et al., 2014). Bisphosphonates are currently used for the treatment of osteogenesis imperfecta (Barros et al., 2012; Bishop et al., 2013; Ward and Rauch, 2013; Sousa et al., 2014) and juvenile Paget's disease (Demir et al., 2000; Cundy et al., 2004; Polyzos et al., 2010; Saki et al., 2013). In addition, they are under evaluation for treatment of primary bone tumors (Goldsby et al., 2013; phase 3 Clinical trials NCT00987636, NCT00742924, and NCT004470223) and Fibrous Dysplasia of Bone (phase 2 clinical trial NCT00445575). Concerning all these young patients, dental and periodontal tissue developmental defects may occur as a consequence of the bone resorption inhibition. Preclinical studies and clinical observations have already demonstrated that bisphosphonates, in particular alendronate and ZOL, delay or inhibit tooth eruption causing several dental abnormalities (Grier and Wise, 1998; Bradaschia-Correa et al., 2007; Kamoun-Goldrat et al., 2008; Hiraga et al., 2010) and may, as in the juvenile Paget's disease of bone, exert an inhibitory effect on bone mineralization



(Polyzos et al., 2011). Such inhibition of mineralization has been observed for various bisphosphonate in *in vitro* tests using calvaria osteoblast culture (Widler et al., 2002).

## CONCLUSION

The data presented in this review are unambiguous concerning the role of bone resorption on the development of dental and periodontal tissues and supports the hypothesis of a direct implication of osteoclasts in dental and periodontal tissue formation. Further studies will be necessary to decipher, at the molecular level, signals originating from bone cells (presumably osteoclasts) toward dental and periodontal cells. These signals could be directly secreted by bone cells or released from the bone matrix during the resorption.

## REFERENCES

- Aioub, M., Lézet, F., Molla, M., Castaneda, B., Robert, B., Goubin, G., et al. (2007). *Msx2*<sup>-/-</sup> transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone* 41, 851–859. doi: 10.1016/j.bone.2007.07.023
- Babajko, S., de La Dure-Molla, M., Jeeon, K., and Berdal, A. (2014). *MSX2* in ameloblast cell fate and activity. *Front. Physiol.* 5:510. doi: 10.3389/fphys.2014.00510
- Barros, E. R., Saraiva, G. L., de Oliveira, T. P., and Lazaretti-Castro, M. (2012). Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 25, 485–491. doi: 10.1515/jpem-2012-0016
- Berdal, A., Castaneda, B., Aioub, M., Néfussi, J. R., Mueller, C., Descroix, V., et al. (2011). Osteoclasts in the dental microenvironment: a delicate balance controls dental histogenesis. *Cells Tissues Organs* 194, 238–243. doi: 10.1159/000324787
- Bishop, N., Adami, S., Ahmed, S. F., Antón, J., Arundel, P., Burren, C. P., et al. (2013). Risedronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 382, 1424–1432. doi: 10.1016/j.lancet.2013.12.012
- Bleicher, F. (2014). Odontoblast physiology. *Exp. Cell Res.* 325, 65–71. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.012
- Bradashia-Correa, V., Massa, L. F., and Arana-Chavez, V. E. (2007). Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res.* 330, 475–485. doi: 10.1007/s00441-007-0499-y
- Castaneda, B., Simon, Y., Ferbus, D., Robert, B., Chesneau, J., Mueller, C., et al. (2013). Role of RANKL (TNFSF11)-dependent osteopetrosis in the dental phenotype of *Msx2* null mutant mice. *PLoS ONE* 8:e80054. doi: 10.1371/journal.pone.0080054
- Castaneda, B., Simon, Y., Jacques, J., Hess, E., Choi, Y.-W., Blin-Wakkach, C., et al. (2011). Bone resorption control of tooth eruption and root morphogenesis: involvement of the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). *J. Cell. Physiol.* 226, 74–85. doi: 10.1002/jcp.22305
- Chawla, S., Henshaw, R., Seeger, L., Choy, E., Blay, J.-Y., Ferrari, S., et al. (2013). Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 14, 901–908. doi: 10.1016/S1473-2045(13)70277-8
- Cobourne, M. T., and Sharpe, P. T. (2013). Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 183–212. doi: 10.1002/wdev.66
- Cundy, T., Wheaton, L., and King, A. (2004). Treatment of idiopathic hyperphosphatasia with intensive bisphosphonate therapy. *J. Bone Miner. Res.* 19, 703–711. doi: 10.1359/jbmr.040127
- Demir, E., Bereket, A., Ozkan, B., and Topçu, M. (2000). Effect of alendronate treatment on the clinical picture and bone turnover markers in chronic

## FUNDING

The presented projects have received the financial support of the French Association for Cancer Research (ARC, Project # ECL;2010R00778), the “ligue contre le cancer” Association, the Liddy Shriver Sarcoma Initiative (grant) and the French National Cancer Institute (Funding INCa-6001).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank G. Hamery and P. Monmousseau from the Therapeutic Experimental Unit (Nantes, France) for their technical assistance. We thank Aguamemnon Gregoriadis, Yongwon Choi and Christopher Mueller for sharing their *C-Fos*, *RANKI*, and *RANK* mouse models, respectively. Meadhbh Brennan is thanked for kindly editing the manuscript.

- idiopathic hyperphosphatasia. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13, 217–221. doi: 10.1515/JPEM.2000.13.2.217
- Demirsoy, U., Karadogan, M., Selek, O., Anik, Y., Aksu, G., Müezzinoğlu, B., et al. (2014). Golden bullet-denosumab: early rapid response of metastatic giant cell tumor of the bone. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 36, 156–158. doi: 10.1097/MPH.0000000000000034
- Duheron, V., Hess, E., Duval, M., Decossas, M., Castaneda, B., Klöpffer, J. E., et al. (2011). Receptor activator of NF-kappaB (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5342–5347. doi: 10.1073/pnas.1013054108
- Federman, N., Brien, E. W., Narasimhan, V., Dry, S. M., Sodhi, M., and Chawla, S. P. (2014). Giant cell tumor of bone in childhood: clinical aspects and novel therapeutic targets. *Paediatr. Drugs* 16, 21–28. doi: 10.1007/s40272-013-0051-3
- Foster, B. L., Popowics, T. E., Fong, H. K., and Somerman, M. J. (2007). Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.* 78, 47–126. doi: 10.1016/S0070-2153(06)78003-6
- Goldsby, R. E., Fan, T. M., Villaluna, D., Wagner, L. M., Isakoff, M. S., Meyer, J., et al. (2013). Feasibility and dose discovery analysis of zoledronic acid with concurrent chemotherapy in the treatment of newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Eur. J. Cancer* 49, 2384–2391. doi: 10.1016/j.ejca.2013.03.018
- Grier, R. L., and Wise, G. E. (1998). Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J. Dent. Res.* 77, 8–15. doi: 10.1177/00220345980770011201
- Hiraga, T., Ninomiya, T., Hosoya, A., and Nakamura, H. (2010). Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. *Calcif. Tissue Int.* 86, 502–510. doi: 10.1007/s00223-010-9366-z
- Hughes, A. E., Shearman, A. M., Weber, J. L., Barr, R. J., Wallace, R. G., Osterberg, P. H., et al. (1994). Genetic linkage of familial expansile osteolysis to chromosome 18q. *Hum. Mol. Genet.* 3, 359–361. doi: 10.1093/hmg/3.2.359
- Kamoun-Goldrat, A., Ginisty, D., and Le Merrer, M. (2008). Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur. J. Oral Sci.* 116, 195–198. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00529.x
- Karras, N. A., Polgreen, L. E., Ogilvie, C., Manivel, J. C., Skubitz, K. M., and Lipsitz, E. (2013). Denosumab treatment of metastatic giant-cell tumor of bone in a 10-year-old girl. *J. Clin. Oncol.* 31, e200–e202. doi: 10.1200/jco.2012.46.4255
- Koide, M., Kobayashi, Y., Ninomiya, T., Nakamura, M., Yasuda, H., Arai, Y., et al. (2013). Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154, 773–782. doi: 10.1210/en.2012-1928
- Lézet, F., Chesneau, J., Battaglia, S., Brion, R., Castaneda, B., Farges, J.-C., et al. (2014). Preclinical evidence of potential craniofacial adverse effect of zoledronic acid in pediatric patients with bone malignancies. *Bone* 68, 146–152. doi: 10.1016/j.bone.2014.08.018
- Lézet, F., Chesneau, J., Navet, B., Gobin, B., Amiaud, J., Choi, Y., et al. (2015). Skeletal consequences of RANKL-blocking antibody (IK22-5) injections during

- growth: mouse strain disparities and synergic effect with zoledronic acid. *Bone* 73, 51–59. doi: 10.1016/j.bone.2014.12.011
- Lézet, F., Thomas, B. L., Blin-Wakkach, C., Castaneda, B., Bolanos, A., Hotton, D., et al. (2010). Dlx homeobox gene family expression in osteoclasts. *J. Cell. Physiol.* 223, 779–787. doi: 10.1002/jcp.22095
- Mitchell, C. A., Kennedy, J. G., and Wallace, R. G. (1990). Dental abnormalities associated with familial expansile osteolysis: a clinical and radiographic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 70, 301–307. doi: 10.1016/0030-4220(90)90145-1
- Mitsiadis, T. A., and Graf, D. (2009). Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87, 199–211. doi: 10.1002/bdrc.20160
- Molla, M., Descroix, V., Aioub, M., Simon, S., Castañeda, B., Hotton, D., et al. (2010). Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in *Msx2* mutant mice. *Am. J. Pathol.* 177, 2516–2526. doi: 10.2353/ajpath.2010.091224
- Nakatsuka, K., Nishizawa, Y., and Ralston, S. H. (2003). Phenotypic characterization of early onset Paget's disease of bone caused by a 27-bp duplication in the *TNFRSF11A* gene. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1381–1385. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.8.1381
- Orestes-Cardoso, S., Nefussi, J. R., Lezot, F., Oboeuf, M., Pereira, M., Mesbah, M., et al. (2002). *Msx1* is a regulator of bone formation during development and postnatal growth: *in vivo* investigations in a transgenic mouse model. *Connect. Tissue Res.* 43, 153–160. doi: 10.1080/03008200290000547
- Polyzos, S. A., Anastasilakis, A. D., Litsas, I., Efstathiadou, Z., Kita, M., Arsos, G., et al. (2010). Profound hypocalcemia following effective response to zoledronic acid treatment in a patient with juvenile Paget's disease. *J. Bone Miner. Metab.* 28, 706–712. doi: 10.1007/s00774-010-0198-8
- Polyzos, S. A., Anastasilakis, A. D., Makras, P., and Terpos, E. (2011). Paget's disease of bone and calcium homeostasis: focus on bisphosphonate treatment. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetis* 119, 519–524. doi: 10.1055/s-0031-1284365
- Saki, F., Karamizadeh, Z., Nasirabadi, S., Mumm, S., McAlister, W. H., and Whyte, M. P. (2013). Juvenile paget's disease in an Iranian kindred with vitamin D deficiency and novel homozygous *TNFRSF11B* mutation. *J. Bone Miner. Res.* 28, 1501–1508. doi: 10.1002/jbmr.1868
- Semler, O., Netzer, C., Hoyer-Kuhn, H., Becker, J., Eysel, P., and Schoenau, E. (2012). First use of the RANKL antibody denosumab in osteogenesis imperfecta type VI. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 12, 183–188.
- Silverman, S. L. (2011). Bisphosphonate use in conditions other than osteoporosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1218, 33–37. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05769.x
- Sousa, T., Bompadre, V., and White, K. K. (2014). Musculoskeletal functional outcomes in children with osteogenesis imperfecta: associations with disease severity and pamidronate therapy. *J. Pediatr. Orthop.* 34, 118–122. doi: 10.1097/BPO.0b013e3182a006a0
- Tella, S. H., and Gallagher, J. C. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142, 155–170. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
- Ward, L. M., and Rauch, F. (2013). Oral bisphosphonates for paediatric osteogenesis imperfecta? *Lancet* 382, 1388–1389. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61531-7
- Whyte, M. P. (2006). Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1068, 143–164. doi: 10.1196/annals.1346.016
- Whyte, M. P., and Hughes, A. E. (2002). Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in *TNFRSF11A* encoding RANK and is allelic to familial expansile osteolysis. *J. Bone Miner. Res.* 17, 26–29. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.1.26
- Widler, L., Jaeggi, K. A., Glatt, M., Müller, K., Bachmann, R., Bisping, M., et al. (2002). Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J. Med. Chem.* 45, 3721–3738. doi: 10.1021/jm020819j
- Wise, G. E. (2009). Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod. Craniofac. Res.* 12, 67–73. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01439.x
- Zwolak, P., and Dudek, A. Z. (2013). Antineoplastic activity of zoledronic acid and denosumab. *Anticancer Res.* 33, 2981–2988.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Gama, Navet, Vargas, Castaneda and Lézet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.







Original Full Length Article

## Skeletal consequences of RANKL-blocking antibody (IK22-5) injections during growth: Mouse strain disparities and synergic effect with zoledronic acid<sup>☆</sup>



Frédéric Lézot<sup>a,b,\*</sup>, Julie Chesneau<sup>a,b</sup>, Benjamin Navet<sup>a,b</sup>, Bérengère Gobin<sup>a,b</sup>, Jérôme Amiaud<sup>a,b</sup>, YongWon Choi<sup>c</sup>, Hideo Yagita<sup>d</sup>, Beatriz Castaneda<sup>e,f</sup>, Ariane Berdal<sup>e</sup>, Christopher G. Mueller<sup>g</sup>, Françoise Rédini<sup>a,b</sup>, Dominique Heymann<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> INSERM, UMR-957, Equipe Ligue Nationale Contre le Cancer 2012, Nantes F-44035, France

<sup>b</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, Nantes F-44035, France

<sup>c</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA

<sup>d</sup> Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

<sup>e</sup> INSERM, UMR-1138, Equipe 5, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris F-75006 France

<sup>f</sup> Department of Basic Studies, Faculty of Odontology, University of Antioquia, Medellín AA 1226, Colombia

<sup>g</sup> CNRS, UPR-9021, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), Laboratoire Immunologie et Chimie Thérapeutiques, Université de Strasbourg, Strasbourg F-67084, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 September 2014

Revised 6 December 2014

Accepted 13 December 2014

Available online 20 December 2014

Edited by: David Burr

#### Keywords:

Bone resorption

RANKL

Zoledronic acid

Skeleton growth

Side effect

### ABSTRACT

High doses of bone resorption inhibitors are currently under evaluation in pediatric oncology. Previous works have evidenced transient arrest in long bone and skull bone growth and tooth eruption blockage when mice were treated with zoledronic acid (ZOL). The question of potential similar effects with a RANKL-blocking antibody (IK22.5) was raised. Sensitivity disparities in these inhibitors between mouse strains and synergic effects of zoledronic acid and a RANKL-blocking antibody were subsidiary questions. In order to answer these questions, newborn C57BL/6J and CD1 mice were injected every two or three days (4 injections in total so 7 or 10 days of treatment length) with high doses of a RANKL-blocking antibody. The consequences on the tibia, craniofacial bones and teeth were analyzed by  $\mu$ CT and histology at the end of the treatment and one, two and three months later. The results obtained showed that RANKL-blocking antibody injections induced a transient arrest of tibia and skull bone growth and an irreversible blockage of tooth eruption in C57BL/6J mice. In CD1 mice, tooth eruption defects were also present but only at much higher doses. Similar mouse strain differences were obtained with zoledronic acid. Finally, a synergic effect of the two inhibitors was evidenced. In conclusion as previously observed for bisphosphonates (ZOL), a RANKL-blocking antibody induced a transient arrest in long bone and skull bone growth and a blockage of tooth eruption with however disparities between mouse strains with regard to this last effect. A synergic effect of both bone resorption inhibitors was also demonstrated.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Powerful inhibitors of the bone resorption such as bisphosphonates and the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL; TNFSF11) blocking antibodies were developed for the treatment of pathologies characterized by excessive bone resorption such as osteoporosis, juvenile Paget's disease, familial expansile osteolysis and primary or metastatic bone tumors [1–3]. In adult patients, these inhibitors have

shown their efficiency and are nowadays widely used [4]. Side effects such as jaw osteonecrosis have been reported [5] and protocols amended (odontological check-up and care prior to treatment) to deal with. In pediatric patients, bisphosphonates are currently in use for osteogenesis imperfecta [6–9] and juvenile Paget's disease [10–13] treatments and under evaluation concerning Fibrous Dysplasia of Bone (phase 2 clinical trial NCT00445575) and bone primary tumors [14] (phase 3 Clinical trials NCT00987636, NCT00742924 and NCT004470223). A RANKL-blocking antibody (Denosumab) is also currently under clinical evaluation for osteogenesis imperfecta (phase 2 clinical trial NCT01799798) and for Giant Cell Tumor of Bone (phase 2 clinical trial NCT00680992) with promising preliminary reports in both cases [15–19]. Case studies have also reported beneficial effects for Denosumab in pediatric patients suffering from juvenile Paget's disease [20], aneurysmal bone cysts [21] and fibrous dysplasia [22].

<sup>☆</sup> Disclosure statement: None of the authors have any disclosures to make in regard to the work under consideration for publication.

\* Corresponding author at: INSERM UMR957, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex 1, France. Fax: +33 240 412 860.

E-mail address: [frederic.lezot@univ-nantes.fr](mailto:frederic.lezot@univ-nantes.fr) (F. Lézot).

Experimental data obtained in mice with zoledronic acid (ZOL), one of the most efficient bisphosphonates, showed that onco-pediatric doses induced a transient arrest in bone growth [23] and a severe seizure in tooth eruption [24]. To date, the potentiality of a similar effect of a RANKL-blocking antibody on skeleton growth has never been evaluated. The aim of the present work was thus to investigate the impact of such a blocking antibody developed in mouse (IK22-5) on skeleton growth. The strategy was to analyze the consequences of IK22-5 injections on mice following a protocol similar to the one previously used to evaluate ZOL impact on appendicular and craniofacial skeleton growth [24]. In this protocol newborn mice were injected in order for the treatment to encompass stages of craniofacial skeleton development similar to those of pediatric patients treated for osteosarcoma and Ewing sarcoma (6 to 15 years-old). In addition, the impacts of the different cumulative doses and injection frequencies were evaluated. The question of the existence of different susceptibility to the treatment between mouse strains (C57BL/6 versus CD1) was also raised. Finally, bisphosphonates (ZOL) and the anti-RANKL antibody inhibit bone resorption by means of different mechanisms. More precisely, bisphosphonates appear to be internalized selectively by bone-resorbing osteoclasts inhibiting their activity and function via the inhibition of the protein prenylation [25]; the anti-RANKL antibody inhibits the activation of RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B; TNFRSF1A) which is a crucial step in osteoclastogenesis [26]. The question of the potentiality of a synergic effect between IK22-5 and ZOL was so raised.

## Materials and methods

### Animals and drug administration

Pregnant C57BL/6J and CD1 mice (14 days of gestation) were purchased at Janvier Laboratories breeding (Le Genest Saint Isle, France). The mice were housed in pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit at the Faculty of Medicine (Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA-PdL-06, accepted protocol number 00165.01) and under the

supervision of authorized investigators. Newborn mice were used for the experiments. After weaning, the mice were routinely fed a liquid diet. Two protocols (Fig. 1) were developed that differ only by the interval between two injections.

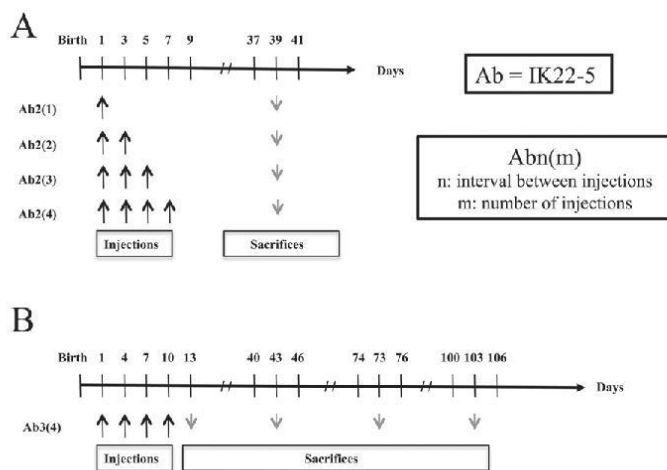
First protocol: at birth, newborn mice (from naive mothers) were randomized into groups (at least 6 pups per group) that received subcutaneous injections (from 1 to 4) of IK22-5 antibody (25  $\mu$ g in PBS for the first and second injections then 50  $\mu$ g) or PBS alone (controls) every 2 days beginning at day 1 after birth. The animals were sacrificed 1 month after the last injection.

Second protocol: at birth, newborn mice (from naive mothers) were randomized into groups (at least 6 pups per group) that received four subcutaneous injections of IK22-5 antibody (25  $\mu$ g in PBS for the first and second injections then 50  $\mu$ g) or PBS alone (controls) or ZOL (50  $\mu$ g/kg in PBS) every 3 days beginning at day 1 after birth. The animals were sacrificed either at days 13 (end of treatment), 43, 73 or 103 (respectively 1, 2 and 3 months after the last injection).

*Rankl*<sup>-/-</sup> mouse used for comparison were previously generated by Y. Choi [27]. Genotyping was ensured by PCR using the following primers 5' RANKL: CCA AGT AGT GGA TTC TAA ATC CTG, 3' RANKL: CCA ACC TGT GGA CTT ACG ATT AAA G and 3' insert: ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC.

### Micro-CT analysis

Analyses of the bone microarchitecture were performed using a SkyScan 1076 *in vivo* micro-CT scanner (SkyScan, Kontich, Belgium). Tests were performed after sacrifice on the tibias and heads for each treatment group. All the tibias and heads were scanned using the same parameters (pixel size 18  $\mu$ m, 50 kV, 0.5-mm Al filter, 10 min of scanning). The reconstructions were analyzed using NRecon software and CTan software (SkyScan). For the long bones, the volumes of interest (VOI) were determined at 15%, 30% and 50% of the trabecular bone (tibias). The specific bone volume was quantified as the relative bone volume/total volume measured for each VOI. A one-way ANOVA test followed by a Dunnett post-test was performed to evidence statistical significant differences in VOI between groups



**Fig. 1.** Chronograph of the two protocols used. A: Chronograph of the protocol used to determine the minimal number of IK22-5 antibody injections sufficient to induce growth delay in newborn mice due to severe inhibition of bone resorption. Newborn mice were treated from day 1 with injections every two days. The impact of 1 to 4 injections was analyzed at day 39 corresponding to 1 month after the end of the longer treatment. IK22-5 was called Ab for “antibody” and the number of injections “m” was added between brackets. The interval between injections (n = 2 in this protocol) was added before the brackets. B: Chronograph of the protocol used to analyze the importance of the interval between injections through comparison with the first protocol, and also to evaluate the synergic effect of IK22-5 and ZOL. Four injections were performed every 3 days and the mice were sacrificed either at the end of treatment (day 13) or 1, 2 or 3 months later.

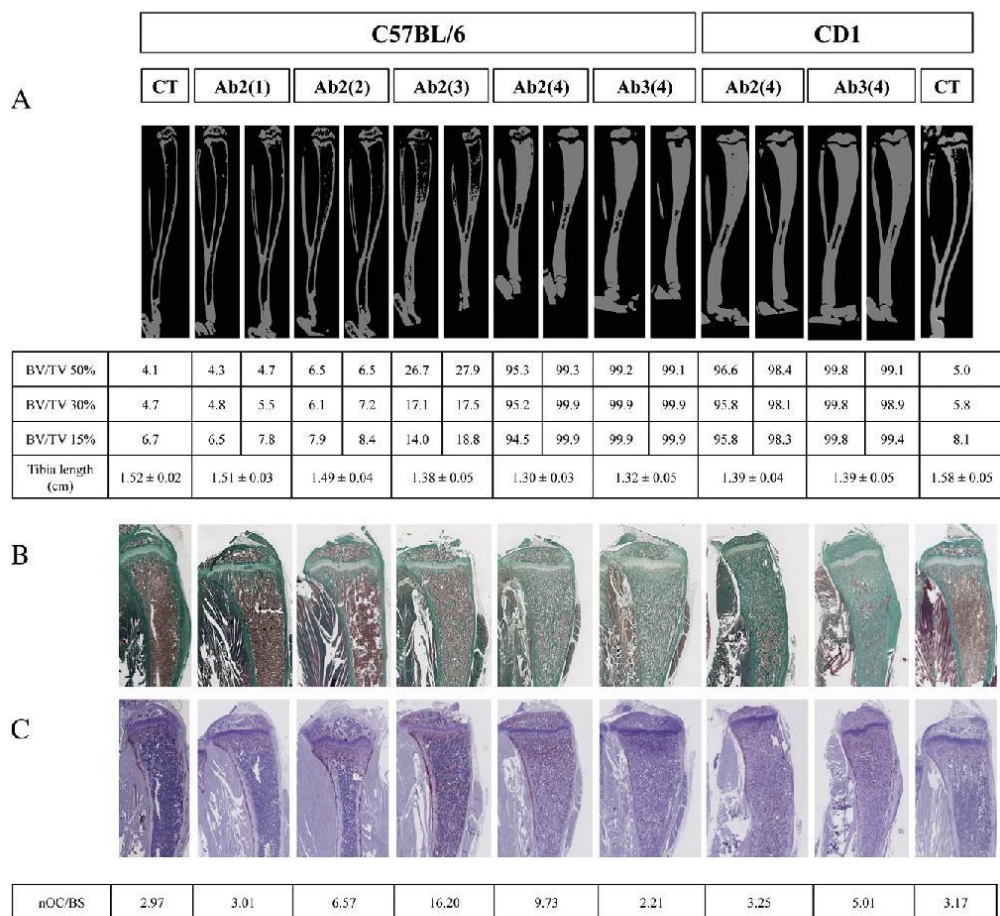


(Supplemental Tables). 3D visualizations of the tibiae and heads were made using ANT software (SkyScan). Length of tibia was measured along the main axis using 3D visualization and statistic analyses performed as for VOI.

**Histology**

The tibiae and heads were collected from euthanized mice from IK22-5-treated, control and ZOL-treated groups and were fixed in 4% buffered paraformaldehyde. The tibiae and heads were decalcified in 4.13% EDTA/0.2% paraformaldehyde pH 7.4 over 4 days in KOS sw10 (Milestone, Sorisole, Italy). The specimens were dehydrated and embedded in paraffin. Then 3-µm-thick sagittal sections stained with

Masson's trichrome were observed using a DMRXA microscope (Leica, Nussloch, Germany). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was performed on the tibia and head sections to identify multinucleated osteoclast-like cells after 90 min-incubation in 1 mg/mL of Naphthol AS-TR phosphate, 60 mmol/L N, N dimethylformamide, 100 mmol/L sodium tartrate, and 1 mg/mL Fast red TR salt solution (all from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and counterstained with hematoxylin. In order to obtain numerical values, TRAP positive osteoclasts were numbered and normalized to mm of bone surface (nOC/BS) using Image-J software. Regarding tooth eruption, a tooth was considered as none erupted (included) when the totality of the crown appears, on histological sections, under the line that link tops of the alveolar bone crests.



**Fig. 2.** Effects of IK22-5 treatments on tibia growth in male mice, importance of the interval between injections and the mouse's genetic background (C57BL/6 versus CD1) analyzed at day 39 by micro-CT (A), Masson trichrome histological staining (B) and TRAP histo-enzymology (C). Micro-CT analyses of male mouse tibiae showed a decrease in tibia length in C57BL/6 mice receiving at least 3 injections every two days (A). Measurements of BV/TV at different positions (15, 30, and 50%) along the tibia's main axis evidenced a significant increase in bone density in C57BL/6 mice receiving 4 injections every two days or every three days (A). Similar impacts were observed with CD1 mice (A). Histological sections made it possible to visualize graded bone density in relationship with number of injections (B). Bone density was elevated and bone marrow space highly reduced in animals receiving 4 injections. However, no difference was visible concerning the growth plate thickness. TRAP histo-enzymology revealed that, one month after the last injection, a significant number of positive cells covered bone surfaces of the tibia of C57BL/6 mice that had received 3 or 4 injections every two days (C). In contrast, rare osteoclasts were present if injections were performed every three days (C). In CD1 mice receiving 4 injections, whatever the injection frequency, the number of TRAP positive cells was moderately increased (C).

## Results

### RANKL blockade by the IK22-5 antibody affects C57BL/6J newborn's growth

To analyze the impact of RANKL inhibition by the IK22-5 antibody on skeleton growth, newborn C57BL/6J mice were treated every 2 days from day 1 after birth with IK22-5 RANKL blocking antibody (Fig. 1A). Differential impacts of graded numbers of injections (1 to 4) were analyzed at day 39 (Fig. 1A). Micro-CT analyses of the tibias revealed a growth delay in long bone elongation in mice that had received 3 and 4 injections (Fig. 2A). Tibia length was significantly reduced ( $p < 0.001$ ) in these mice comparatively to control (Fig. 2A). This phenomenon reflected the induced osteopetrosis that could be quantified as a significant augmentation in the specific bone volume compared to the untreated animals (CT). The specific bone volume calculated either for 15, 30 or 50% of the total length gradually increased from 2 to 4 injections with, for instance, at 50% respectively values of  $6.5 \pm 0.5$ ,  $26.3 \pm 1.2$  and  $97.3 \pm 2.2\%$  while the value for CT was  $4.1 \pm 0.2\%$  (Fig. 2A; Supplemental Table A). Interestingly, the fact that the mice were sacrificed long after the last injection (30 days) made it possible to demonstrate that the impact observed was stable. However, similar analyses performed 3 months after the last injection showed total recovery of specific tibia bone volumes (Supplemental Table A). Analyses of longitudinal sections of the tibias showed an increased density in trabecular bone in C57BL/6J mice receiving 3 and 4 injections (Ab2(3) and Ab2(4) in Fig. 2B). Interestingly, no enlargement of the growth plate hypertrophic zone was observed on the sections, suggesting that the recovery was already initiated. This was confirmed by the number of TRAP-positive cells present on the bone surface visible on sections from mice receiving 3 and 4 injections (Fig. 2C) that was elevated compared to the controls ( $16.20$  and  $9.73$  osteoclasts/mm versus  $2.97$  in CT).

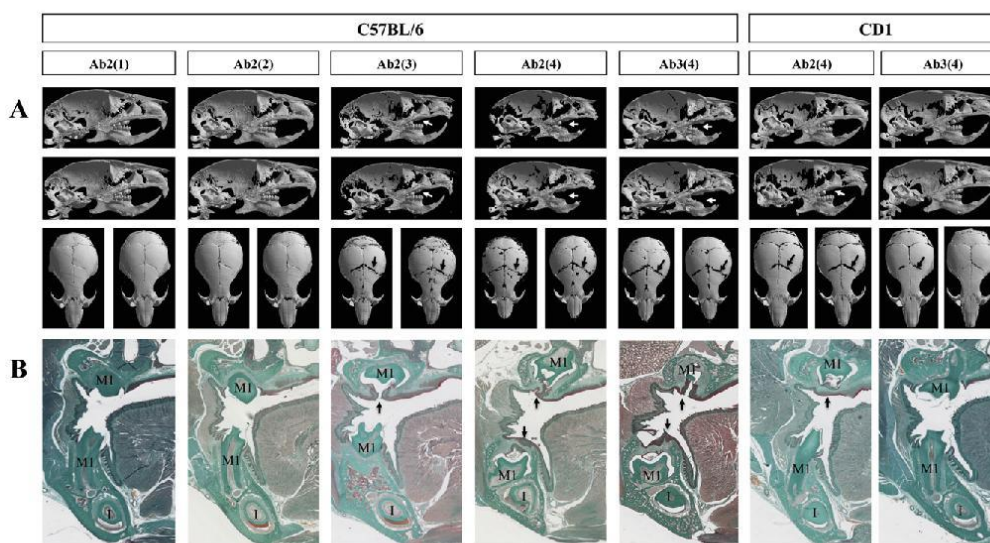
Micro-CT analyses of the C57BL/6J mouse heads (Fig. 3A) showed a delay in suture closure/mineralization (black arrows) and the blockage

of tooth eruption (white arrows) in mice that received more than 2 injections. Such craniofacial defects were observed in *Rankl*<sup>-/-</sup> mouse and reinforce the data obtained with the antibody (Fig. S1A). Interestingly, while only the upper first molar was included for C57BL/6J mice that received 3 injections, most if not all teeth were included for the animals that received 4 injections (Fig. 3A). Analyses of head frontal sections on the plane of the first molars confirmed at the histology level the inclusion (alveolar bone crests still over the tooth crown) of upper molar and both upper and lower molars respectively for the mice treated with 3 and 4 injections (black arrows in Fig. 3B). TRAP staining performed on adjacent sections showed limited staining around the teeth included, indicating their definitive inclusion (Fig. S2A).

### Injection frequency of the IK22-5 antibody and the newborns' growth

In order to determine the importance of IK22-5 injection frequency, a second protocol of 4 injections every three days was developed (Fig. 1B) and applied to C57BL/6J and CD1 mice. Micro-CT analyses of tibias showed that both protocols had a similar impact on specific bone volume and the tibia length (Fig. 2A), regardless of the strain of mouse (Supplemental Table B for statistical data). Analyses of tibia longitudinal sections confirmed the absence of difference between the two protocols (Fig. 2B). However, the TRAP staining showed the presence of differences concerning osteoclast number between the two protocols one month after the end of treatment, more specifically in the C57BL/6J mice (Fig. 2C). Indeed, in the longest protocol (Ab3(4)) the osteoclast number was still low in the C57BL/6J mice ( $2.21$  osteoclasts/mm) indicating an as yet unrecovered bone resorption in this protocol covering the longest period of time.

Micro-CT analyses of the heads made it possible to see that in a given mouse strain the two protocols induced the same defects (Fig. 3A). Tooth eruption (white arrows) and suture closure (black arrows) were similarly affected (Fig. 3A). However differences regarding the



**Fig. 3.** Effects of IK22-5 treatments on craniofacial growth in male mice, importance of the interval between injections and the mouse's genetic background (C57BL/6J versus CD1) analyzed at day 39 by micro-CT (A), Masson trichrome histological staining (B) and TRAP histo-enzymology (C). Micro-CT analyses showed that delays in suture closure (mineralization) were present (black arrows) in C57BL/6J mice receiving at least 3 injections (A). The first upper molar's eruption defect was evidenced in C57BL/6J mice that received 3 injections while most teeth eruption was affected in mice that received 4 injections (white arrows). Increasing the interval between injections has no repercussion on suture closure and teeth eruption in C57BL/6J mouse. In CD1 mouse, whatever the interval between injections, suture closure delays were present (black arrows) and most or all the teeth had erupted (A). A unique case with upper first molar inclusion (white arrow) was observed in CD1 mice (A). Histological frontal sections of heads (B) in the plane of the first molar (M1) confirmed the teeth inclusions (black arrows). Deformities in the mandible incisor (I) were present in the C57BL/6J mice treated 4 times (B).



tooth eruption defect and suture closure were observed between the C57BL/6J and CD1 mice. Data corresponding to animals sacrificed just after the last injection for Ab3(4) protocol are presented in Fig. 5.

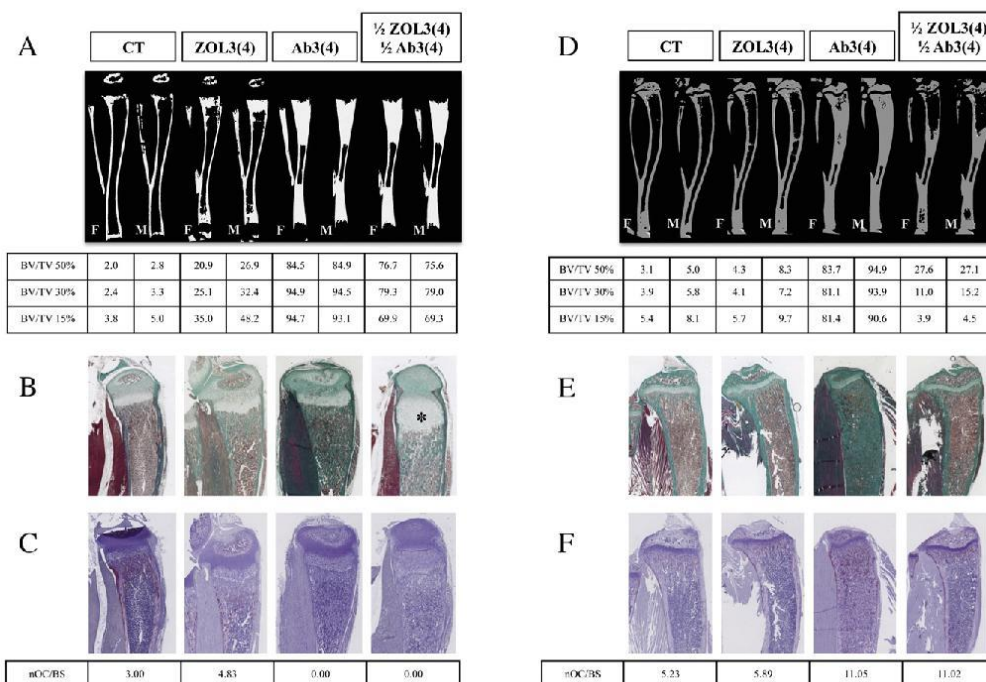
*Tooth eruption was affected differentially by IK22-5 antibody injections in C57BL/6J and CD1 mice*

Micro-CT analyses of the heads made it possible to see that tooth eruption consequences were different depending on the mouse strain considered (Fig. 3A). While all C57BL/6J mice effectively had several teeth included (white arrows) one month after the last of for injection of IK22-5, only one CD1 mouse (shown here) had its upper first molars included (white arrow). Analyses of head frontal sections made it possible to see that the first molars were all included (black arrows) in the C57BL/6J mice, but not in the case of the CD1 mice one month after the last injection (Figs. 3B; S1B). Interestingly, the use of a double dose of IK22-5 in the CD1 mouse genetic background induced a definitive inclusion of the first upper molars and a more severe but still transient delay in suture closure (Fig. S1B). This supports the hypothesis that sensitivity to the IK22-5 treatment is dependent of the mouse strains.

*Synergic effect of IK22-5 and zoledronic acid*

In order to establish the potential synergic action of the IK22-5 blocking antibody and ZOL, the skeletal impacts of combined half doses of IK22-5 and ZOL were compared to the impacts of full doses of each inhibitor at the end of the treatments and 1, 2 or 3 months later in the CD1 mouse genetic background (that was less affected by IK22-5 treatment) using the second protocol (Fig. 1B).

Micro-CT analyses of the tibias showed at the end of the treatment (Fig. 4A and Supplemental Table C for statistical data) an increase in the specific bone volume similar to the one observed with full doses of IK22-5 (for instance BV/TV at 50% are 76.1 ± 0.6 versus 84.7 ± 0.3) but significantly higher than that induced by ZOL injections alone (BV/TV at 50% are 23.9 ± 3.1). Analyses of tibia longitudinal sections (Fig. 4B) confirmed the micro-CT observations and made it possible to observe an important increase in the growth plate hypertrophic chondrocyte zone (black star) only with the combination of IK22-5 and ZOL. TRAP staining on adjacent sections revealed the presence of TRAP-positive cells in the tibia of the ZOL treated-mice while no staining was present in tibia sections of the mice treated with IK22-5 alone or in combination with ZOL (Fig. 4C). Measurements of the number of



**Fig. 4.** Effects of combined IK22-5 and ZOL treatments on tibia growth in CD1 mice (male and female) analyzed at days 13 (A–C) and 43 (D–F) by micro-CT (A and D), Masson trichrome histological staining (B and E) and TRAP histo-enzymology (C and F). At the end of the treatment (day 13), a similar decrease in tibia length was observed in mice receiving 4 injections of ZOL, IK22-5 or both at half doses (A). Furthermore, a significant increase in bone density was evidenced for each treatment by BV/TV measurements. A higher impact was observed for IK22-5 compared to ZOL and the combination of IK22-5 and ZOL had an effect similar to that of IK22-5 alone. Histological sections confirmed the increase in bone density in the treated mice (B) and made it possible to visualize significant enlargement of the tibia growth plate's hypertrophic chondrocyte zone in double-treated mice (star in (B)). Moderate enlargements of this zone were also observed after IK22-5 or ZOL treatments. TRAP histo-enzymology showed at the end of the treatments (C) a moderately increased number of positive cells on the sections of ZOL-treated mice compare to control (4.84 versus 3.00 osteoclasts/mm) while no positive cells were visible on the tibia sections of IK22-5 and IK22-5 + ZOL treated mice. One month after the end of treatments (day 43), micro-CT analyses showed that tibia length was still reduced in the treated animals compared to the controls (D). In addition, bone were less dense in ZOL- and IK22-5 + ZOL-treated mice than at the end of the treatments, but remained superior to control bone densities. In contrast, bone density was unchanged in the IK22-5-treated mice. Histological sections of the tibias confirmed the presence of elevated bone densities in IK22-5- and IK22-5 + ZOL-treated mice (E) while the bone density of ZOL-treated mice was slightly higher than that of the control mice. No difference was observed concerning the growth plate's hypertrophic chondrocyte zone thickness. TRAP histo-enzymology evidenced the presence of a significantly increased number of positive cells in the tibia of IK22-5- and IK22-5 + ZOL-treated mice comparatively to control (11.05 and 11.02 versus 5.23 osteoclasts/mm) while this number was similar to control in ZOL-treated mice (F). M: male; F: female.

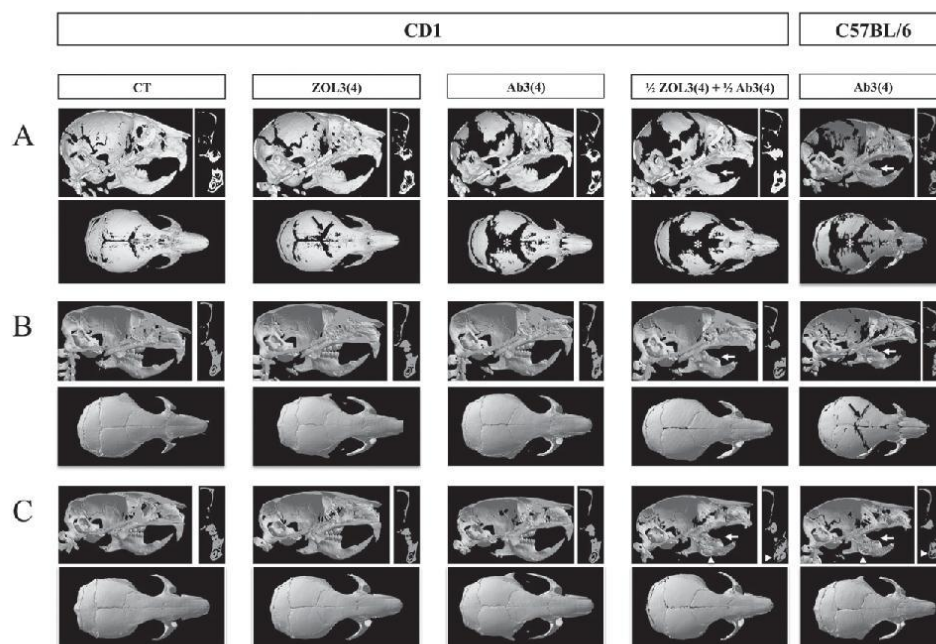
TRAP positive osteoclasts by mm of bone surface (nOC/BS) confirmed these observations. One month after the end of the treatments, micro-CT analyses showed a clear decrease in the tibia-specific bone volumes compared to data obtained at the end of the treatments for the mice injected with ZOL alone or with IK22-5 (for instance BV/TV at 50% decreased respectively from  $23.9 \pm 3.1$  to  $6.3 \pm 2.0$  for ZOL; Fig. 4D and Supplemental Table C). In contrast, the tibia-specific bone volume was unchanged in the mice treated with IK22-5 alone (Fig. 4D and Supplemental Table C). Histological sections of the tibias (Fig. 4E) supported the micro-CT observations. In addition, the size of the growth plate hypertrophic zone was similar to that of the controls in all mice. Concerning the TRAP staining performed on adjacent sections, numerous positive cells were present in the tibia of IK22-5 and IK22.5 + ZOL treated-mice (Fig. 4F) signing the ongoing return toward normal bone density. Measurements of the number of TRAP positive osteoclasts by mm of bone surface (nOC/BS) confirmed these observations. Such recovery was validated by the micro-CT analyses of the tibias performed 2 and 3 months after the end of the treatments (Fig. S3 and Supplemental Table C). Interestingly, *in fine* it appeared that recovery requires more time for mice receiving ZOL injections alone or associated with IK22-5.

Micro-CT analyses of CD1 mouse heads showed delays in suture closure at the end of the treatments (Fig. 5A), moderate for ZOL-treated mice (black-arrow) compared to IK22-5-treated mice (white stars). Heads of IK22-5-treated C57BL/6J mice were presented for comparison. With regard to tooth eruption, a blockage was observed for all the teeth exclusively in CD1 mice treated with the combination of IK22-5 and ZOL (arrow in Fig. 5A). One and three months after the end of the treatments

(Figs. 5B–C), no remnant signs of suture closure delay were visible, whereas most if not all the teeth of CD1 mice treated with the IK22-5 and ZOL combination were definitively included (white arrows in Figs. 5B–C). Moreover, a destruction of the mandible basal bone (white arrows-heads in Fig. 5C) was observed. TRAP staining performed on frontal sections of the heads (Fig. S2B) made it possible to confirm the inclusion of all the teeth one month after the treatment with the IK22-5 and ZOL combination (black-arrows), and linked basal bone resorption (black arrow-head) to the formation of a tumor-like structure (TL) in place of the peculiar continuously-growing incisor. Interestingly, similar effects for the IK22-5 and ZOL combination on skeleton growth were observed on the C57BL/6J mouse genetic background with only two injections (Fig. S4), re-enforcing the previous demonstration of the existence of susceptibility differences between mouse strains.

### Discussion

Bone resorption inhibition has shown its benefits in the therapeutic management of different pediatric pathologies with local or generalized bone erosion [1–3]. The doses of inhibitors used vary according to the pathology considered. For instance, cumulative doses of ZOL used in clinical trials for primary bone tumors are 5 to 10 times higher than those used for osteogenesis imperfecta (500–750 versus 75–100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{year}$ ). Despite the therapeutic value of using high onco-pediatric doses of bone resorption inhibitors, the question of the side effects of such doses on skeleton growth needs to be studied. Our previous studies in C57BL/6J mice showed that ZOL induced a transient arrest in long bone growth [23], delayed skull suture mineralization and irreversibly



**Fig. 5.** Effects of combined IK22-5 and ZOL treatments on craniofacial growth in male mice analyzed with micro-CT at the end of treatment (day 13 (A)) and 1 and 3 months after the end of treatments (days 43 (B) and 103 (C) respectively). In CD1 mice, at the end of the treatments (A), a delay in suture closure (mineralization) was observed whatever the treatment but appeared to be less significant in the mice treated with ZOL alone (black arrow) than in those treated with IK22-5 alone or combined with ZOL (white star). Regarding tooth eruption, a significant delay was observed in mice treated with the combination of IK22-5 and ZOL (white arrow). One and 3 months after the end of the treatments, whatever the treatment considered, the suture appeared to be closed similarly to the controls ((B) and (C)). In contrast to the suture, the eruption defect induced by the combination treatment appeared to be irreversible (white arrows in (B) and (C)). Furthermore, deformations of the mandible basal bone were observed (arrow-heads in (C)) as clearly visible on micro-CT scan frontal sections (upper right image) performed in the first molar plane. Micro-CT of C57BL/6J mouse heads treated with IK22-5 alone every three days were shown for comparison.



blocked tooth eruption [24]. In onco-pediatric patients a similar effect on long bone was observed [23] and the analysis of potential tooth eruption defects is still ongoing. Another study performed with OPG-Fc has also demonstrated that long treatment with high doses induced an osteopetrosis-like phenotype that was reversed after the treatment cessation [28]. However, this treatment was initiated at 15 days, forbidding the analyses of the effects on craniofacial skeleton growth more precisely tooth eruption and suture mineralization.

In the present study, similar side effects were evaluated for another inhibitor of bone resorption, a RANKL-blocking antibody. Our data obtained in C57BL/6J mice demonstrated side effects similar to those previously observed with ZOL. Concerning the long bones, the RANKL-blocking antibody showed a more important effect than ZOL as attested by the higher increase in specific bone volume. However, after the end of the treatment, the recovery was more rapid. The impact on skull suture mineralization was also more important but recovery was rapid after the end of the treatment. Interestingly, a delay in suture mineralization was also evident in the *Rankl*<sup>-/-</sup> mice in agreement with the previously demonstrated implication of the RANKL/RANK signaling in skull growth [29]. Regarding tooth eruption, a complete and definitive arrest was observed following four injections of the RANKL-blocking antibody. This observation confirmed that RANKL/RANK signaling is crucial for tooth eruption as previously demonstrated with transgenic mice over-expressing RANK [30,31], and established that tooth eruption arrest is the main irreversible skeletal side effect when bone resorption inhibitors are used at high doses, as currently recommended in onco-pediatric protocols. An explanation to this irreversible effect is that tooth eruption occurred during a strict developmental window of time and that after this period eruption is blocked [30,31].

In order to evaluate the consequences of the frequency of anti-RANKL antibody injections on these side effects, a second protocol was developed with injections every three days instead of every two days. Decreasing injection frequency while maintaining the same number of injections corresponded to a decrease in the cumulative dose ( $\mu$ /day) but an increase in treatment length ( $\times 1.5$ ). No difference was observed between the two protocols concerning the induced osteopetrosis-like phenotype, suggesting that at such high doses the inhibition is optimal and stable for more than three days. Further studies will be needed to determine the stability of the inhibition induced by high doses of RANKL-blocking antibody, bearing in mind that TRAP staining showed significant differences in C57BL/6J mice (Fig. 2C).

In order to determine if the occurrence of side effects secondary to bone resorption inhibition induced by high doses of a RANKL-blocking antibody may differ from one mouse strain to another, the two protocols were also applied to CD1 mice for comparative purposes. The results showed that CD1 and C57BL/6J mice long bones and sutures were similarly affected by the treatment whereas tooth eruption that was irreversibly affected in C57BL/6J mice occurred quite normally in CD1 mice. However, CD1 mice were sensitive to the treatment as evidenced by the blockage of tooth eruption observed after injections of double doses of RANKL-blocking antibody. This shows the existence of varied susceptibility to bone resorption inhibition depending on mouse strains when considering tooth eruption. Interestingly, such susceptibility variations were observed for the RANKL-blocking antibody but also for ZOL as the ZOL-treated CD1 mice had normal tooth eruption (Fig. 5) compared to the totally blocked tooth eruption in C57BL/6J [24]. Further studies will be needed to decipher the origin of such sensitivity variations between mouse strains.

The RANKL-blocking antibody and zoledronic acid (bisphosphonates) have different mechanisms of action concerning bone resorption inhibition. Bisphosphonates act on osteoclast activity [32], while the antibody totally inhibits osteoclastogenesis [33]. The question of a synergic effect between both treatments was raised. Using our protocol on the less sensitive mouse strain (CD1) concerning tooth eruption blockage, the impact of combined half doses of both resorption inhibitors was analyzed. The

results validate the existence of a synergic effect between the two bone resorption inhibitors. Moreover the stability of the bone resorption inhibition appears to be different between these two inhibitors, the ZOL effect being maintained longer after the end of treatment as seen on CD1 mouse tibia (Fig. S3). These data suggest that a combination of the two inhibitors may be useful in pediatric oncology, making it possible to reduce the doses of each inhibitor and the frequency of the injections. Each of these inhibitors has advantages and disadvantages regarding its use in onco-pediatric protocol. ZOL main advantage is its combine effect on osteoclast and tumor cells. Its disadvantages are the high stability of the inhibition that could perturb the patient growth and the induced accumulation of TRAP positive cells at the bone surface [24]. IK22-5 main advantages are the efficiency of the resorption inhibition, its rapid reversion and the absence of TRAP positive cells on bone surface. Its main disadvantage is the absence of direct anti-tumor effect. Combining these two inhibitors might enable to take advantages of both inhibitors while erasing disadvantages as suggested by our experiments. Further studies will be needed to determine the appropriate protocol to avoid side effects while maintaining sufficient bone resorption inhibition. Interestingly, decreasing the dose of ZOL may reduce the overcoming of resistance to this agent reported for osteosarcoma and Ewing sarcoma cells [34–36] but conversely it may reduce its known direct effect on tumor cells [37–45], including the reversion of resistances to other therapeutic factors [46–51]. Regarding the RANKL-blocking antibody, while RANK expression was reported in certain tumor cells, including osteosarcoma cells [52–56] with a suspected implication of the RANKL–RANK axis in the control of these cells' proliferation, no resistance to the RANKL-blocking antibody has been reported so far. Reducing the doses used may nevertheless be of interest. It will make it possible to prevent potentially harmful effects that may occur as a result of the invalidation of functions of RANKL other than the bone resorption control, such as central thermoregulation control [57–59], neurite growth [60], lymph node organization and function [26,27,61–64], epidermal immunity and homeostasis [65–68] and autoimmunity [69,70].

## Conclusion

To conclude, injections of high onco-pediatric doses of a RANKL-blocking antibody had consequences on skeletal growth that were similar to ZOL injections. Long bone growth and skull suture mineralization were transiently arrested and tooth eruption definitively impaired. However mouse strain disparities concerning this last side effect exist for both inhibitors. The mechanical explanation of such disparities remains to be elucidated. Finally, the existence of a synergic effect between both inhibitors was shown, with as a perspective the possibility of reducing the doses used for these inhibitors and consequently the incidence of side effects.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.011>.

## Acknowledgments

The authors wish to thank G. Hamery, and P. Monmousseau from the Therapeutic Experimental Unit (Nantes, France) for their technical assistance. The project received financial support from the French Association for Cancer Research (ARC, Project # ECL2010R00778), the Liddy Shriver Sarcoma Initiative (grant) and the French National Cancer Institute (Funding INCa-6001).

### Authors' roles:

Study design: FL, FR and DH.  
 Study conduct: FL, JC, BN and BG.  
 Data collection: FL, JC, BN and BG.  
 Data analysis: FL, BC, JA, AB, FR and DH.  
 Data interpretation: FL, YWC, HY, BC, CM, FR and DH.  
 Manuscript drafting: FL, FR and DH.  
 Revising the manuscript's content: FL, YWC, HY, CM, FR and DH.



Approving the final version of the manuscript: FL, JC, BN, BG, JA, YWC, HY, BC, CM, FR and DH  
FL takes responsibility for the integrity of the data analysis.

## References

- Silverman SL. Bisphosphonate use in conditions other than osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1218:33–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05769.x>
- Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.008>
- Zwolak P, Dudek AZ. Antineoplastic activity of zoledronic acid and denosumab. *Anticancer Res* 2013;33:2981–8.
- Eriksen EF, Halse J, Moen MH. New developments in the treatment of osteoporosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013;92:620–36. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0412.2012.01473.x>
- Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:90–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2011.181>
- Barros ER, Saraiva GL, de Oliveira TP, Lazaretti-Castro M. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:485–91.
- Bishop N, Adams S, Ahmed SF, Antón J, Arundel P, Burren CP, et al. Risedronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013;382:1424–32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61091-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61091-0)
- Ward LM, Rauch F. Oral bisphosphonates for paediatric osteogenesis imperfecta? *Lancet* 2013;382:1388–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61531-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61531-7)
- Sousa T, Bompadre V, White KK. Musculoskeletal functional outcomes in children with osteogenesis imperfecta: associations with disease severity and pamidronate therapy. *J Pediatr Orthop* 2014;34:118–22. <http://dx.doi.org/10.1097/BPO.0b013e3182a006a0>
- Demir E, Bereket A, Ozkan B, Topçu M. Effect of alendronate treatment on the clinical picture and bone turnover markers in chronic idiopathic hyperphosphatasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:217–21.
- Cundy T, Wheaton L, King A. Treatment of idiopathic hyperphosphatasia with intensive bisphosphonate therapy. *J Bone Miner Res* 2004;19:703–11. <http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.040127>
- Polyzos SA, Anastasilakis AD, Litsas I, Efsthadiou Z, Kita M, Arsovs G, et al. Profound hypocalcaemia following effective response to zoledronic acid treatment in a patient with juvenile Paget's disease. *J Bone Miner Res* 2010;25:706–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s00774-010-0198-8>
- Saki F, Karamzadeh Z, Nasirabadi S, Mumm S, McAlister WH, Whyte MP. Juvenile paget's disease in an Iranian kindred with vitamin D deficiency and novel homozygous TNFSF11B mutation. *J Bone Miner Res* 2013;28:1501–8. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1868>
- Goldsbey RE, Fan TM, Villaluna D, Wagner IM, Isakoff MS, Meyer J, et al. Feasibility and dose discovery analysis of zoledronic acid with concurrent chemotherapy in the treatment of newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Eur J Cancer* 2013;49:2384–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.03.018>
- Semler O, Netzer C, Höyer-Kuhn H, Becker J, Eysel P, Schoenau E. First use of the RANKL antibody denosumab in osteogenesis imperfecta type VI. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2012;12:183–8.
- Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay J-Y, Ferrari S, et al. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14:901–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70277-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70277-8)
- Demirsoy U, Karadogan M, Selek O, Anik Y, Aksu G, Müezzinoğlu B, et al. Golden bullet-denosumab: early rapid response of metastatic giant cell tumor of the bone. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1097/MPH.0000000000000034>
- Federman N, Brien EW, Narasimhan V, Dry SM, Sodhi M, Chawla SP. Giant cell tumor of bone in childhood: clinical aspects and novel therapeutic targets. *Paediatr Drugs* 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s40272-013-0051-3>
- Karras NA, Polgreen LE, Ogilvie C, Manivel JC, Skubitz KM, Lipsitz E. Denosumab treatment of metastatic giant-cell tumor of bone in a 10-year-old girl. *J Clin Oncol* 2013;31:e200–2. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.46.4255>
- Grasemann C, Schindeln MM, Hövel M, Schweiger B, Bergmann C, Herrmann R, et al. Effects of RANKL-antibody (denosumab) treatment on bone turnover markers in a girl with juvenile Paget's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3121–6. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-1143>
- Lange T, Stehling C, Fröhlich B, Klingenhöfer M, Kunkel P, Schneppenheim R, et al. Denosumab: a potential new and innovative treatment option for aneurysmal bone cysts. *Eur Spine J* 2013;22:1417–22. <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-013-2715-7>
- Boyce AM, Chong WH, Yao J, Gafni RI, Kelly MH, Chamberlain CE, et al. Denosumab treatment for fibrous dysplasia. *J Bone Miner Res* 2012;27:1462–70. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1603>
- Battaglia S, Dumoucel S, Chesneau J, Heymann M-F, Picarda G, Gouin F, et al. Impact of oncopediatric dosing regimen of zoledronic acid on bone growth: preclinical studies and case report of an osteosarcoma pediatric patient. *J Bone Miner Res* 2011;26:2439–51. <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.453>
- Lézot F, Chesneau J, Battaglia S, Brion R, Castañeda B, Farges J-C, et al. Preclinical evidence of potential craniofacial adverse effect of zoledronic acid in pediatric patients with bone malignancies. *Bone* 2014;68:146–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.018>
- Russell RGG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:367–401. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1346.041>
- Dougall WC, Glaccum M, Charrin K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412–24.
- Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 2000;192:1467–78.
- Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, DiCarlo E, Verdelis K, et al. High- and low-dose OPG-Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res* 2012;72:495–501. <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2012.118>
- Lee JC, Spiguel L, Shenaj DS, Zhong M, Wietholt C, He T-C, et al. Role of RANKL-RANKL-OPG axis in cranial suture homeostasis. *J Craniofac Surg* 2011;22:699–705. <http://dx.doi.org/10.1097/SCS.0b013e3182077fbd>
- Castañeda B, Simon Y, Jacques J, Hess E, Choi Y-W, Blin-Wakkach C, et al. Bone resorption control of tooth eruption and root morphogenesis: involvement of the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). *J Cell Physiol* 2011;226:74–85. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22305>
- Castañeda B, Simon Y, Ferbus D, Robert B, Chesneau J, Mueller C, et al. Role of RANKL (TNFSF11)-dependent osteopetrosis in the dental phenotype of Mx2 null mutant mice. *PLoS One* 2013;8:e80054. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080054>
- Russell RGG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011;49:2–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.022>
- Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V, Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract* 2012;66:1139–46. <http://dx.doi.org/10.1111/j.ijcp.12022>
- Ory B, Moriceau G, Trichet V, Blanchard F, Berreuer M, Rédini F, et al. Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J Cell Mol Med* 2008;12:928–41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00141.x>
- O'Day K, Gorlick R. Novel therapeutic agents for osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:511–23. <http://dx.doi.org/10.1586/era.09.7>
- Mori T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Mochizuki K, Satomi K. Inhibition of heat-shock protein 27 expression eliminates drug resistance of osteosarcoma to zoledronic acid. *Anticancer Res* 2010;30:3565–71.
- Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, Coipeau P, Charrin C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;37:74–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2005.02.020>
- Zhou Z, Guan H, Duan X, Kleinerman ES. Zoledronic acid inhibits primary bone tumor growth in Ewing sarcoma. *Cancer* 2005;104:1713–20. <http://dx.doi.org/10.1002/ncr.21383>
- Kubista B, Trieb S, Sevela F, Toma C, Arrich F, Hefter P, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 2006;24:1145–52. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.20129>
- Iguchi T, Miyakawa Y, Saito K, Nakabayashi C, Nakanishi M, Saya H, et al. Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:285–91.
- Labrinidis A, Hay S, Liapis V, Ponomarev V, Findlay DM, Evdokiou A. Zoledronic acid inhibits both the osteolytic and osteoblastic components of osteosarcoma lesions in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2009;15:3451–61. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1616>
- Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureaux F, Corradini N, et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010;70:7610–9. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4272>
- Siddiqui T, Marsh R de W, Allegria C, Whittaker D, Scarborough M, Gibbs P, et al. Effective salvage treatment of recurrent Ewing sarcoma utilizing chemotherapy and zoledronic acid. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010;8:489–504.
- Açil Y, Müller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wilfang J, et al. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40:e229–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2011.10.024>
- Chang J, Wang W, Zhang H, Hu Y, Yin Z. Bisphosphonates regulate cell proliferation, apoptosis and pro-osteoclastic expression in MG-63 human osteosarcoma cells. *Oncol Lett* 2012;4:299–304. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2012.723>
- Benassi MS, Ciecchi A, Ponticelli F, Pazzaglia L, Gambieri G, Zanella L, et al. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. *Cancer Lett* 2007;250:194–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.10.004>
- Moriceau G, Ory B, Mitrofan I, Riganti C, Blanchard F, Brion R, et al. Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res* 2010;70:10329–39. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0578>
- Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep* 2010;24:233–9.
- Ryu K, Murata H, Koto K, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Res* 2010;30:2713–20.
- Li Z, Peng H, Xu Q, Ye Z. Sensitization of human osteosarcoma cells to Vy9V $\delta$ 2 T-cell-mediated cytotoxicity by zoledronate. *J Orthop Res* 2012;30:824–30. <http://dx.doi.org/10.1002/jor.21579>
- Dos Santos MP, de Farias CB, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL. In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: a paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma. *Oncol Rep* 2014;31:955–68. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2013.2907>



- [52] Wittrant Y, Lamoureux F, Mori K, Riet A, Kamijo A, Heymann D, et al. RANKL directly induces bone morphogenetic protein-2 expression in RANK-expressing POS-1 osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2006;28:261–9.
- [53] Mori K, Ando K, Heymann D, Rétini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? *Histol Histopathol* 2009;24:235–42.
- [54] Mori K, Le Goff B, Berreur M, Riet A, Moreau A, Blanchard F, et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 2007;211:555–62. <http://dx.doi.org/10.1002.path.2140>.
- [55] Mori K, Berreur M, Blanchard F, Chevalier C, Guisle-Marsollier I, Masson M, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2007;18:1365–71.
- [56] Elias LSA, Costa RF, Carvalho MA, Batista AC, Silva TA, Leles CR, et al. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:624–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.06.014>.
- [57] Hanada R, Hanada T, Penninger JM. Physiology and pathophysiology of the RANKL/RANK system. *Biol Chem* 2010;391:1365–70. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2010.149>.
- [58] Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med* 2011;89:647–56. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0749-z>.
- [59] Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 2009;462:505–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08596>.
- [60] Gutierrez H, Kisiswa L, O'Keefe GW, Smithen MJ, Wyatt S, Davies AM. Regulation of neurite growth by tumour necrosis superfamily member RANKL. *Open Biol* 2013;3:120150. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120150>.
- [61] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315–23. <http://dx.doi.org/10.1038/16852>.
- [62] Hess E, Duheron V, Decossas M, Lézot F, Bédal A, Chea S, et al. RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation. *J Immunol* 2012;188:1245–54. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101513>.
- [63] Mueller CG, Hess E. Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. *Front Immunol* 2012;3:261. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00261>.
- [64] Sugiyama M, Nakato G, Jinnohara T, Akiba H, Okumura K, Ohno H, et al. Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development. *Int Immunol* 2012;24:369–78. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxs002>.
- [65] Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 2006;12:1372–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1518>.
- [66] Yamaguchi T, Sakaguchi S. Skin controls immune regulators. *Nat Med* 2006;12:1358–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1206-1358>.
- [67] Barbaroux J-BO, Belet M, Brisken C, Mueller CG, Groves RW. Epidermal receptor activator of NF-kappaB ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation. *J Immunol* 2008;181:1103–8.
- [68] Duheron V, Hess E, Duval M, Decossas M, Castaneda B, Klöpffer JE, et al. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5342–7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1013054108>.
- [69] Leibbrandt A, Penninger JM. Novel functions of RANK(L) signaling in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2010;658:77–94. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9_9).
- [70] Akiyama T, Shinzawa M, Akiyama N. RANKL–RANK interaction in immune regulatory systems. *World J Orthop* 2012;3:142–50. <http://dx.doi.org/10.5312/wjo.v3i9.142>.



# Thèse de Doctorat

Benjamin NAVET

Homéogènes *Dlx*, signalisation RANK/RANKL et ostéosarcomes

*Dlx* homeobox genes, RANK/RANKL signaling and osteosarcomas

## Résumé

L'ostéosarcome (OS), plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes, se caractérise par une croissance ostéoïde parfois associée à une ostéolyse. Malgré les avancées thérapeutiques, le taux de survie reste faible (30 % à 5 ans si métastases ou chimiorésistances). De nouvelles approches thérapeutiques ciblant la cellule tumorale et son environnement sont nécessaires.

Les travaux présentés se sont intéressés aux potentiels facteurs pro-tumoraux que sont les gènes *Dlx* et à une signalisation clé de l'environnement osseux (RANKL/RANK) susceptible d'influer l'agressivité tumorale. L'OS étant une tumeur ostéoblastique, la famille *Dlx* a été choisie, car impliquée dans l'ostéoblastogénèse, et la signalisation RANKL/RANK, car voie cardinale du couplage entre ostéoblastes et ostéoclastes. De plus un lien entre *Dlx* et signalisation RANK était suspecté.

Les gènes *Dlx1*, *Dlx4* et *Rank* non-exprimés dans l'ostéoblaste sain le sont dans les lignées d'OS. Des modulations d'expression des *Dlx* et de *Rank* ont été réalisées afin d'en évaluer l'impact sur les cellules tumorales. L'implication de la signalisation RANK/RANKL dans le microenvironnement tumoral a été analysée. La perturbation du remodelage est en faveur de la tumeur en participant à l'établissement d'un cercle vicieux entre la tumeur et l'environnement.

Les travaux ont établi l'implication des *Dlx*, surtout *Dlx4* pour lequel un nouveau transcrite codant a été caractérisé. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires. Concernant la signalisation RANK/RANKL, il s'avère qu'au-delà du cercle vicieux, important au stade d'initiation tumorale, l'expression de RANK par la tumeur s'avère être un facteur pro-métastatique.

**Ostéosarcomes, homéogènes *Dlx*, signalisation RANK/RANKL, dissémination métastatique**

## Abstract

Osteosarcoma (OS), the most common malignant primary bone tumor, is characterized by an osteoid formation occasionally associated with osteolysis. Despite therapeutic advances, the 5-years survival rate remains low (30% in case of metastasis or drug-resistance). New therapeutic approaches targeting the tumor cell and its environment are needed.

Presented studies focused on potential pro-tumor factors namely *Dlx* genes and a key signaling pathway of the bone environment (RANKL / RANK) that may influence tumor aggressiveness. The OS is an osteoblastic tumor and *Dlx* family was chosen due to its involvement in osteoblastogenesis. RANKL / RANK pathway was selected as it constitutes a main element in the coupling between osteoblasts and osteoclasts. A link between *Dlx* genes and RANK signaling was suspected.

*Dlx1*, *Dlx4* and *Rank* genes are not normally expressed in osteoblasts but are present in the OS cell lines. *Dlx* and *Rank* expression modulations were realized to assess the impact on tumor cells. RANK / RANKL signaling involvement in the tumor microenvironment was analyzed. Disruption of remodeling is in favor of the tumor taking part in the establishment of a vicious circle between tumor and environment.

This work established the involvement of *Dlx*, especially *DLX4* to which a new coding transcript has been characterized. However, additional studies are needed. Regarding the RANK / RANKL signaling, it turns out that beyond the vicious circle, leading to tumor initiation stage, the RANK expression by the tumor proves to be pro-metastatic elements.

**Ostéosarcoma, *Dlx* homeobox genes, RANK/RANKL signaling, metastatic spread**