N°d'ordre NNT : 2017LYSE1271

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° accréditation
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Soutenue publiquement 05/12/2017, par :
Morgane MONCHANIN

Effets de la combinaison de la doxorubicine et de l'interférence avec la NTN1 sur la progression tumorale et l'infiltrat immunitaire de l'ostéosarcome

Devant le jury composé de :

				Président du jury
Pr. PENEL	Nicolas	Oncologue médical	Centre Oscar Lambret	Rapporteur
Mme REDINI	Françoise	DR1	UMR S 1238	Rapporteur
Pr. BLAY	Jean Yves	Directeur CLB	Centre Léon Bérard	Examinateur
Mme BOUVIER	Corinne	Anatomopathologiste	Aphm hôpital La Timone	Examinateur
M. MEHLEN	Patrick	DR1	CRCL	Examinateur
Mme DUTOUR	Aurélie	Cadre biologiste	Centre Léon Bérard	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je souhaiterais remercier Mme F. Redini et Pr. N. Penel pour leur rôle précieux de rapporteurs dans le cadre de mes travaux de thèse. Merci à Mme C. Bouvier, Pr. J. Y Blay et M. P. Mehlen de participer à mon jury de thèse.

Merci à Mme I. Ray Coquard et M. F. Chibon pour les échanges constructifs que nous avons eus pendant mes deux comités de suivi de thèse.

Je souhaiterais remercier Pr. J.Y Blay de m'avoir accueillie, d'avoir suivi ce projet et d'y avoir apporté de nombreux conseils.

Merci à Agnès Bernet et à tous les membres de Netris Pharma pour leur disponibilité.

Au final, cette thèse aura été rythmée par il était une fois aux pays des sarcomes, une princesse surveillée par une fée dragon libellule...

Merci Aurélie! C'est avec toi qu'ont commencé mes premiers pas en tant qu'étudiante en biologie et à l'époque je ne savais même pas que derrière le bureau et le radiateur (même en juin) se cachait une future directrice de thèse. Merci pour le soutien, la confiance que tu m'as accordée, les échanges, le couronnement surprise et les mails plein de licornes et de sucreries. Et merci d'avoir résister aux envies de chipolatas, j'ai de la cire pour faire briller tes écailles!

Merci aux plus belles du monde et aux plus méchantes (sauf avec moi). Axelle, Chantal, Charlotte et Christine : partager votre bureau durant les 18 premiers mois de ma thèse a été très instructif en terme scientifique bien sûr mais également pour tout le reste.

Zeuzeu, esclave du chevalier François, aujourd'hui reine des « O » avec chondro, ostéo, immuno et macro! Avec François vous m'avez fait comprendre que même si on ne parlait pas la même langue (le québécois et l'alsacien), l'immunologie ne mordait pas.

Qui? Ah oui John! Même avec une menace forte : les vols de primers (ça ne rigole pas). Tu as mis peu de temps à instaurer ce que j'ai mis 25 ans à éviter : Momo!

Tala et Ana, j'ai découvert avec vous que la thèse ce n'était pas que le labo mais aussi de l'amour, de l'amitié et des voyages. Entre les soirées "vernis & masques de beauté" à refaire le monde, à la fin on l'a quand même bien parcouru!

Margaux, petit esclave première et dernière du nom : je crois qu'entre les zèbres, les caïmans, les léopards et les licornes on a fait la manip vivo la plus exotique du monde. Paul, on aurait pu développer un nouveau modèle d'ostéosarcome : l'ostéosarcome de champignons! Plus sérieusement, merci à tous les deux de vous être investis dans mon projet de thèse. Travailler en binôme avec vous a été l'une des plus belles expériences de ma thèse.

Marion, tu as veillé à ce que je garde une vie saine pendant ces 3 années de thèse. C'était toujours avec grand plaisir que je prenais mes chaussons pour venir grimper.

Merci à toute l'équipe Sarcomes, il faut quand même réfléchir à l'acronyme Unicorn team! Marie, Fannoche, Nanass, Maryem, Alejandro, Karam et à tous les stagiaires qui ont fait un petit passage par chez nous. Vous avez rythmé mon quotidien pendant 3 ans.

Anne Line, il y a quelqu'un qui m'a dit que ... toutes ces soirées blind test à 3 étoiles et tout le reste. Bombasswag ;)

Cyrielle, à tous ces échanges par sms et ces quelques 5h de train pour monter là-haut dans le froid chez vous.

Merci à Sandrine, Anne Cath, Eva, Olivier, Mathilde, Cynthia qui ont partagé cette aventure professionnelle et personnelle depuis 3 ans.

Ju et Damien vous me faites le plus beau cadeau de fin de thèse! Marcelle <3

Merci à ma famille qui a entendu parler d'ostéosarcome et de nétrine un bon nombre de fois.

Et surtout un grand merci à mes parents pour leur soutien à chaque instant depuis toujours. Merci!

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 4

I- L'OSTEOSARCOME 4

1. EPIDEMIOLOGIE DE L'OSTEOSARCOME 4
2. CLASSIFICATION DE LA TUMEUR 6
   a. Localisation 6
   b. Classification histologique des ostéosarcomes 6
   c. Grade histologique de l'ostéosarcome 7
3. DIAGNOSTIC ET EVOLUTION DE L'OSTEOSARCOME 8
   a. Diagnostic de l'ostéosarcome 8
   Imagerie médicale 8
   Analyse anatomopathologique 10
   b. Rechute locale et métastatique de l'ostéosarcome 10
   Rechute locale de l'ostéosarcome 10
   Evolution métastatique 10
4. ENVIRONNEMENT TUMORAL DE L'OSTEOSARCOME 11
   a. Environnement osseux et ostéosarcome 11
   Le remodelage osseux physiologique 11
   Remodelage osseux modifié par l'ostéosarcome 12
   Implication de la voie RANK / RANKL dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome 13
   b. Environnement immunitaire de l'ostéosarcome 14
   L'ostéosarcome, tumeur infiltrée par les macrophages 15
   Perte de l'immunogénécité de l'ostéosarcome 15
   Production de cellules et de facteurs immunosuppresseurs dans l'environnement de l'ostéosarcome 16
   Perturbation des check point immunitaire par l'ostéosarcome 16
   c. Rôle de l'angiogenèse dans l'ostéosarcome 17
5. ALTERATIONS MOLECULAIRES DE L'OSTEOSARCOME 19
   a. Prédispositions moléculaires à l'ostéosarcome 20
   Perte d'hétérozygotie de Rb 20
   Mutation germinale de P53 : syndrome de Li Fraumeni 20
   b. Principales voies de signalisation altérées dans l'ostéosarcome 22
   Chimiorésistance, pompes à efflux et récepteurs membranaires 22
   La radiorésistance de l'ostéosarcome 23
   Echappement à l'apoptose et à la mort cellulaire 24
   Altérations du cycle cellulaire 27
   c. Marqueurs moléculaires pronostics dans l'ostéosarcome 34

II- TRAITEMENTS DE L'OSTEOSARCOME 34

1. LA CHIRURGIE DE L'OSTEOSARCOME 35
   a. Résection de la tumeur primaire 35
   b. Métastasectomie 36
2. LES CHIMIOTHERAPIES DE L'OSTEOSARCOME 36
3. LA RADIOTHERAPIE DE L'OSTEOSARCOME 39
4. NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES POUR L'OSTEOSARCOME 39
   a. Chimiorésistance 40
   b. Ciblage des voies de signalisation mutées de l'ostéosarcome 40
   c. Ciblage de l'angiogenèse tumorale 43

d. Environnement osseux ... 44
L'acide zolédronique ... 44
Ciblage de la voie du TGF-β ... 44
Inhibition de RANKL ... 45
e. Immunothérapies ... 45
5. COMBINAISONS THERAPEUTIQUES A BASE DE CHIMIOTHERAPIE ... 49
a. Les traitements combinés actuels ... 49
b. La nétrine 1 (NTN1) : un facteur de survie à cibler dans la tumorigenèse ... 51
La Nétrine 1 et ses récepteurs ... 51
Implication de la NTN1 dans l'angiogenèse ... 53
NTN1 et recrutement des effecteurs de l'immunité ... 54
Induction de l'apoptose médiée par la NTN1 ... 54
c. Combinaison de l'Ac aNTN1 et de la chimiothérapie ... 58

RATIONNEL DE L'ETUDE ... 61

MATERIELS ET METHODES ... 63

I- LIGNEES ET MODELES CELLULAIRES ... 63

1. LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE ... 63
2. MODELE DE MIGRATION CELLULAIRE ... 63

II- MODELE DE POLARISATION DE MACROPHAGES *IN VITRO* ... 66

III- MODELISATION *IN VIVO* : EFFET ANTI-TUMORAL DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 ... 68

1. MODELE D'OSTEOSARCOME DE RAT ... 69
a. Suivi de l'évolution tumorale ... 69
b. Mise à mort des animaux et récupération des échantillons ... 69
2. CINETIQUE D'EXPRESSION DE LA NTN1 DANS L'OSTEOSARCOME PROGRESSIF ... 70
3. EFFET DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 SUR L'OSTEOSARCOME PROGRESSIF ... 71
4. EFFET DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 SUR LA RECIDIVE D'OSTEOSARCOME ... 72

IV- ANALYSES MOLECULAIRES ... 73

1. EXTRACTION ET DOSAGE ET DES ACIDES NUCLEIQUES ... 73
2. PCR QUANTITATIVE ... 75
a. Rétro-transcription ... 75
b. PCR quantitative ... 76

V- IMMUNOHISTOCHIMIE ... 78

RESULTATS ... 82

I- NTN1, CIBLE THERAPEUTIQUE POUR L'OSTEOSARCOME ... 83

1. NTN1: PROFIL D'EXPRESSION ET VALEUR PRONOSTIQUE POUR LES SARCOMES DES TISSUS MOUS ... 84
2. NTN1: CIBLE THERAPEUTIQUE POUR L'OSTEOSARCOME ... 88
Récapitulatif des résultats – Axe I ... 92

II- EFFETS ANTI-TUMORAL ET ANTI-METASTATIQUE DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 : MODELE D'OSTEOSARCOME DE RAT ... 94

1. EXPRESSION DE LA NTN1 DANS LE MODELE D'OSTEOSARCOME DE RAT ... 94
2. EFFETS ANTI-TUMORAL ET ANTI-METASTATIQUE DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 SUR L'OSTEOSARCOME PROGRESSIF ... 95
a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit progression l'ostéosarcome primaire ... 95
b. La combinaison Dox + Ac aNTN1 réduit la dissémination métastatique de l'ostéosarcome ... 100
3. LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 RETARDE LA RECHUTE DE L'OSTEOSARCOME ... 103
Récapitulatif des résultats – Axe II ... 105

III- MECANISMES D'ACTION DE L'AC ANTN1 SUR L'OSTEOSARCOME ET SON ENVIRONNEMENT 107

1. AC ANTN1 DIMINUE LA MIGRATION DES CELLULES D'OSTEOSARCOME 107
2. AC ANTN1 DIMINUE LA DENSITE VASCULAIRE DE L'OSTEOSARCOME 110
   a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 diminue la densité vasculaire de l'ostéosarcome progressif 110
   b. La combinaison Dox + Ac aNTN1 diminue la densité vasculaire de la rechute d'ostéosarcome 111
3. AC ANTN1 ET MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DE L'OSTEOSARCOME 113
   a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 et infiltrat lymphocytaire de l'ostéosarcome 113
   Infiltrat lymphocytaire péri-tumoral 113
   Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral 114
   b. La combinsaison Dox + Ac aNTN1 modifie le recrutement des macrophages M2 117
   Infiltration péri-tumorale des macrophages $CD163^+$ 117
   Infiltration intra-tumorale des macrophages $CD163^+$ 118
   c. Effet de l'Ac aNTN1 sur la polarisation des macrophages 121
   Obtentions des macrophages M1 et M2 après polarisation avec l'IFNγ et le TGF-β 121
   Capacité de l'aNTN1 à polariser in vitro les macrophages M1 en M2 123
   Récapitulatif des résultats – Axe III 124

DISCUSSION 127

I- NTN1, CIBLE THERAPEUTIQUE POUR L'OSTEOSARCOME 127

II- EFFETS ANTI-TUMORAL ET ANTI-METASTATIQUE DE LA COMBINAISON DOX + AC ANTN1 : MODELE D'OSTEOSARCOME DE RAT 129

III- MECANISMES D'ACTION DE L'AC ANTN1 SUR L'OSTEOSARCOME ET SON ENVIRONNEMENT 133

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 138

ANNEXES 140

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 185

Liste des figures

Figure 1 : Localisation préférentielle des ostéosarcomes et survie à 5 ans en fonction de cette localisation 5
Figure 2 : Détection de l'ostéosarcome primaire et de ses métastases par imagerie médicale 9
Figure 3 : Cycle du remodelage osseux 12
Figure 4 : Remodelage osseux détourné par l'ostéosarcome 13
Figure 5 : Communication/interactions entre les cellules osseuses et les effecteurs de l'immunité 14
Figure 6 : Angiogenèse tumorale 18
Figure 7 : Voie de signalisation de P53 21
Figure 8 : Caractéristiques acquises par les cellules transformées indispensables au développement du cancer 22
Figure 9 : Voie de signalisation Wnt / β caténine 27
Figure 10 : Implication de la voie Wnt / β Caténine dans l'homéostasie osseuse 28
Figure 11 : Voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR 30
Figure 12 : Implication de YAP / TAZ dans la différenciation ostéoblastique 33
Figure 13 : Membres de la famille des récepteurs à dépendance 52
Figure 14 : Voie de signalisation des récepteurs à dépendance 55
Figure 15 : Voies de signalisation positive induite par DCC et UNC5B 56
Figure 16 : Voies de signalisation négative induite par DCC et UNC5B 57
Figure 17 : Stratégie de combinaison de la NTN1 à la chimiothérapie pour réinduire la mort cellulaire 59
Figure 18 : Principe des tests de migration sur l'appareil de xCelligence 64
Figure 19 : Profil de migration des cellules MNNG/HOS en fonction du gradient de SVF 65
Figure 20 : Modèle de polarisation des macrophages 68
Figure 21 : Cinétique d'expression de la NTN1 au cours de la progression de l'ostéosarcome de rat 71
Figure 22 : Schéma expérimental modèle d'ostéosarcome progressif 72
Figure 23 : Schéma expérimental modèle de récidive tumorale 73
Figure 24 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les GIST 85
Figure 25 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les SGC 87
Figure 26 : Expression relative de la NTN1 dans des sarcomes musculosquelettiques 89
Figure 27 : Expression relative de la NTN1 dans une cohorte de 22 ostéosarcomes primaires 90
Figure 28 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes 91
Figure 29 : Expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes primaires augmente en réponse à la chimiothérapie 92
Figure 30 : Expression de la NTN1 et des RD dans l'ostéosarcome rat 94
Figure 31 : Evolution de l'ostéosarcome progressif en réponse Ac aNTN1 seul ou en combinaison avec Dox 97
Figure 32 : Réponse aux traitements suivie par IRM 98
Figure 33 : Effets des traitements sur progression tumorale par rapport à la Dox 99
Figure 34 : Courbes de survie des animaux porteurs d'ostéosarcome en fonction des traitements 100
Figure 35 : Ac aNTN1 et dissémination métastatique de l'ostéosarcome progressif 102
Figure 36 : Evolution de l'ostéosarcome en rechute en fonction des traitements 104
Figure 37 : Courbes de survie des animaux porteurs d'ostéosarcome en fonction des traitements 105
Figure 38 : Effet de l'Ac aNTN1 sur la migration des cellules d'ostéosarcome 108
Figure 39 : Effet de l'Ac aNTN1 combiné à la Dox sur la lignée MNNG/HOS 109
Figure 40 : Vascularisation de l'ostéosarcome progressif en réponse aux traitements 111
Figure 41 : Vascularisation de la rechute d'ostéosarcome en réponse aux traitements 112
Figure 42 : Infiltrat lymphocytaire péri-tumoral en réponse à la combinaison Dox + Ac aNTN1 114
Figure 43 : Infiltrat lymphocytaire $CD3^+$ intra-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1 115
Figure 44 : Infiltrat lymphocytaire $CD8^+$ intra-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1 116

Figure 45 : Infiltrat macrophagique CD163$^+$ péri-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1 ____ *118*
Figure 46 : Infiltrat macrophagique CD163$^+$ intramoral de l'ostéosarcome progressif en réponse à la combinaison de Dox +Ac aNTN1 ____ *119*
Figure 47 : Infiltrat macrophagique CD163$^+$ intramoral de la récidive de l'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1 ____ *120*
Figure 48 : Polarisation des macrophages par traitement à l'IFNγ et au TGF-β. ____ *122*
Figure 49 : Expression des marqueurs CD86 et CD163 dans la population de macrophages totale et M1 en réponse à l'Ac aNTN1 ____ *124*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Grade de Broders 8
Tableau 2 : propriétés des chimiothérapies utilisées pour le traitement de l'ostéosarcome 37
Tableau 3 : Grade de HUVOS 38
Tableau 4 : Principaux essais cliniques menés au cours des 10 dernières années ciblant l'ostéosarcome et son microenvironnement à base de chimiothérapies et de nouveaux agents 48
Tableau 5 : Concentration de la chimiothérapie et des anticorps pour les modèles cellulaires 63
Tableau 6 : Conditions d'induction et d'inhibition de la migration des MNNG/HOS 66
Tableau 7 : Anticorps spécifiques utilisés pour caractériser les macrophages totaux M1 et M2 67
Tableau 8 : Groupes de traitement 71
Tableau 9 : Groupes de traitement récidive 72
Tableau 10 : Composition des cohortes de sarcomes humains 74
Tableau 11 : Volumes réactionnels nécessaire à la RT 75
Tableau 12 : Cycles nécessaires à la RT 75
Tableau 13 : Cycles de PCRq 76
Tableau 14 : Amorces pour les gènes de ménage, la NTN1 et ses récepteurs homme et rat 77
Tableau 15 : Etapes de déparaffinage des lames 78
Tableau 16 : Démasquage Antigénique 78
Tableau 17 : Anticorps primaires utilisé pour identifier l'infiltrat immunitaires et les vaisseaux 79
Tableau 18 : Anticorps secondaires utilisés 79
Tableau 19 : Composition de la solution de révélation 80
Tableau 20 : Valeur pronostique de la NTN1 sur la récidive locale et métastatique des STS 86
Tableau 21 : Expression des marqueurs CD86 et CD163 dans la population de macrophages totale et M1 en réponse à l'Ac aNTN1 123

Abréviations

A

Ac aNTN1 : Anticorps anti nétrine 1
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xl: B-cell lymphoma extra large
BMP : Bone morphogenic proteins

C

CAM : Chorioallantoic Membrane
CD : Cluster of differentiation
CDKN2 : Inhibiteur de kinase dépendant des cyclines 2A
CLB : Centre Léon Bérard
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CRCL : Centre de Recherches en Cancérologie de Lyon
CT : Computerized tomography
CTL : Lymphocytes cytotoxiques
CTLA-4 : Protéine 4 Associée au lymphocyte cytotoxique

D

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine
DCC : Deleted in colorectal carcinoma
DHFR : Dihydrofolate réductase
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
dNTP : désoxynucléotides triphosphates

E

EDN1 : Endotheline 1
EDTA : Ethylène diamine tétraacétate

F

FACS : Fluorescence-activated cell sorting
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
Fz : Frizzled

G

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate désHydrogénase
GIST : Gastro intestinal stromal tumor
Gy : Gray

H

HDMTX : High-dose methotrexate
HIF-1α : Hypoxia inducible factor 1α
HRP : Horseradish peroxidase

I

IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IGF-1 : Insulin-like growth factor 1
IGF-1R : Insulin-like growth factor 1 receptor
IL : Interleukin
IP : Intra-péritonéal
IRM : Imagerie par raisonnance magnétique
IV : Intraveineuse

L

Ltreg : Lymphocytes T régulateurs

M

M1 : Macrophage 1
M2 : Macrophage 2
MAP : High-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCAM : Melanoma cell adhesion molecule
M-CSF : Macrophage monocyte-colony stimulating factor
MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
MDR1 : Multi drug resistance 1
MICA : MHC class I chain-related molecule A
MMP : Matrix metalloproteinases
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

N

NK : Natural killer
NTN1 : Nétrine 1

O

OPG : Ostéoprotégrine

P

PBS : Phosphate buffer saline
PD-1 : Programme death 1
PDGF : Platelet-derived growth factor
PD-L1 : Ligand de programme death 1
PGEB : Plateforme de gestion des échantillons biologiques
P-gp : Glycoprotéine P
PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

R

RANK : Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL : RANK Ligand
Rb : Retinoblastoma susceptibility tumor-suppressor
RD : Récepteur à dépendance
RNA-Seq : RNA sequencing
RPLP0 : Large ribosomal protein
RTK : récepteurs tyrosine kinases
RT-qPCR : Transcription reverse - amplification en chaîne par polymérase quantitative

S

SCG : Sarcome génomique complexe
siRNA : Small interfering RNA
STS : Sarcomes des tissus mous
SVF : Sérum de veau fœtal

T

TAM : Macrophages associés à la tumeur
TAZ : Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TCF : T-cell factor
TGFβ : Transforming growth factor β
TRAP : Tartrate resistant acidic phosphatase

V

VEGF : Vascular endothelial growth factors

W

WNT : Wingless-type MMTV integration site family

Y

YAP : Yes-associated protein

Z

ZOL : Acide zolédronique

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'ostéosarcome est une tumeur rare affectant principalement les adolescents et les jeunes adultes. Première tumeur osseuse en termes d'incidence, l'ostéosarcome se développe majoritairement dans les os longs. Aujourd'hui le traitement de l'ostéosarcome non métastatique comprend une résection monobloc de la tumeur primaire associée à une polychimiothérapie pré et post-opératoire. L'introduction et l'optimisation des régimes de chimiothérapies ainsi que les avancées techniques de la chirurgie, ont amélioré à la fois la qualité de vie des patients (morbidité diminuée, séquelles moindres) et également amélioré le pronostic de la maladie. Le taux de survie globale à 5 ans des patients atteints d'ostéosarcome non métastatique atteint 60 à 70 %. Toutefois en cas de rechute locale et/ou métastatique ce taux de survie n'est plus que de 20 à 30 %. Pour ces patients en particulier il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'avancée dans la compréhension des mécanismes de tumorigenèse, l'acquisition de connaissances moléculaires des voies de signalisations dérégulées dans l'ostéosarcome, la caractérisation des interactions entre l'ostéosarcome et son environnement ont mis en évidence le rôle primordial de l'environnement osseux, mais aussi immunitaire dans la progression de l'ostéosarcome. Des thérapies innovantes ciblant les acteurs du remodelage osseux et de l'inflammation sont développés. La dissémination métastatique est également ciblée par de nouveaux agents thérapeutiques. Pour cela ces nouvelles approches anti-cancéreuses visent des voies de signalisations altérées dans l'ostéosarcome.

Cependant l'ostéosarcome reste une tumeur agressive pour laquelle les chimiothérapies représentent le principal traitement efficace. L'acquisition de mécanismes de résistance aux traitements rend la prise en charge de l'ostéosarcome difficile. Aujourd'hui, les études précliniques combinent les chimiothérapies à des molécules innovantes ciblant l'environnement osseux telles que le zolédronate ou modulant l'environnement immunitaire de l'ostéosarcome (mifamurtide) dans le but d'améliorer l'efficacité des agents cytotoxiques sans augmenter leur toxicité.

C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse ont été initiés. L'objectif principal de ce projet a été de tester la validité d'une combinaison de chimiothérapie conventionnelle et d'un

anticorps prévenant l'interaction de la nétrine (NTN1) avec ses récepteurs à dépendance et rétablissant ainsi l'apoptose. Pour ce faire nous avons disposé d'un modèle d'ostéosarcome de rat établi chez des animaux immunocompétents. Nous avons également étudié les possibles mécanismes d'action de cette combinaison sur les cellules d'ostéosarcome et sur l'infiltrat immunitaire de la tumeur.

Afin de replacer ce projet dans son contexte de développements thérapeutiques de l'ostéosarcome nous allons dans la partie bibliographique présenter l'ostéosarcome, son traitement actuel et les enjeux thérapeutiques qu'il représente. Nous aborderons ensuite les altérations moléculaires de cette tumeur ainsi que les interactions de la tumeur avec l'environnement osseux et immunitaire. Puis nous mentionnerons certaines approches thérapeutiques développées pour le traitement de l'ostéosarcome en terminant par les combinaisons visant à améliorer les effets de la chimiothérapie par adjonction d'une thérapie ciblée telle que l'anticorps anti NTN1 visant à rétablir l'apoptose cellulaire.

Après avoir décrit les modèles et les techniques utilisés lors de la réalisation de ces travaux nous exposeront les résultats obtenus selon trois axes :

- Le premier axe a analysé la valeur pronostique du niveau d'expression de la nétrine 1 (NTN1) dans l'ostéosarcome, et a permis de valider la NTN1 comme cible thérapeutique.

- Le second axe a consisté en l'évaluation de l'efficacité antitumorale et antimétastatique de la combinaison Doxorubicine et Ac aNTN1 dans un modèle d'ostéosarcome de rat immunocompétent.

- Au cours du troisième axe, nous avons établi certains des mécanismes d'action de la combinaison Doxorubicine et Ac aNTN1 sur le microenvironnement de l'ostéosarcome.

Au terme de la discussion de ces résultats, nous conclurons sur les possibles applications cliniques de cette nouvelle approche thérapeutique combinant la chimiothérapie et l'Ac aNTN1.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction bibliographique

Dans cette partie nous allons présenter l'étiologie de l'ostéosarcome, ses caractéristiques histologiques et moléculaires ainsi que sa prise en charge actuelle. Nous aborderons aussi les écueils auxquels les traitements actuels et en développement doivent faire face. Ceux-ci sont entre autres liés à la grande complexité génomique de l'ostéosarcome (instabilité chromosomique, altérations moléculaires) et aux mécanismes de résistance qu'il met en place. Nous ferons un état des lieux des nouvelles approches thérapeutiques ciblant des voies de signalisations ou caractéristiques moléculaires et environnementales de l'ostéosarcome. Pour finir, nous aborderons la stratégie thérapeutique visant à renforcer l'effet de la chimiothérapie par adjonction d'un agent en ciblant une autre voie de signalisation dérégulée dans la tumeur telle que l'induction de l'apoptose.

I- L'ostéosarcome

Les sarcomes sont des tumeurs rares représentant moins de 1 % de tous les cancers ; cependant cette pathologie est plus fréquente chez les enfants et les adolescents puisqu'il représente 6 à 7 % des cancers des moins de 18 ans [1]. Les sarcomes se développent à partir des tissus de soutien de l'organisme comme les muscles, le tissus adipeux, le cartilage ou l'os et sont divisés en deux groupes : les sarcomes des tissus mous et les sarcomes osseux. Ce projet de thèse s'est intéressé au sarcome osseux le plus fréquent : l'ostéosarcome.

1. Epidémiologie de l'ostéosarcome

Bien qu'étant le plus fréquent des sarcomes osseux, l'ostéosarcome représente seulement 0.2 % des cancers diagnostiqués. L'âge moyen au diagnostic de l'ostéosarcome est de 17 ans, cette tumeur ayant deux pics de survenue: un pic de diagnostic chez l'adulte de plus de 40 ans et un autre pic chez l'enfant. Dans cette population il représente le 3ème cancer des adolescents après les lymphomes et les tumeurs du système nerveux central. Son

incidence est de 1 à 4,7 par million d'habitants et par an dans les pays occidentaux, ce qui représente, en France, 150 à 200 nouveaux cas diagnostiqués par an [2–4].

La forme pédiatrique de la tumeur est la plus fréquente (60 à 75 % des cas d'ostéosarcomes) et affecte une majorité de garçons (entre 3,5 et 5,4 garçons par million contre 2,7 à 4,0 filles par million) [3–5]. L'ostéosarcome de l'adulte est sensiblement différent du pédiatrique. En effet, si l'ostéosarcome pédiatrique est une tumeur primaire, celui développé chez l'adulte survient en général dans un contexte génétique particulier comme la maladie de Paget [6] et peut apparaitre secondairement à une autre tumeur ou sur un territoire précédemment irradié. Durant ce travail de thèse nous nous sommes intéressés exclusivement aux ostéosarcomes pédiatriques.

Qu'il soit adulte ou pédiatrique, la majorité des ostéosarcomes survient au niveau de la métaphyse des os longs : le fémur distal (40 à 70 % des cas d'ostéosarcomes), le tibia proximal (16 à 25 % des cas) et l'humérus (5 à 15 % des cas) (Figure 1) [7–10]. D'autres localisations comme la mandibule ou l'omoplate sont plus rarement retrouvées.

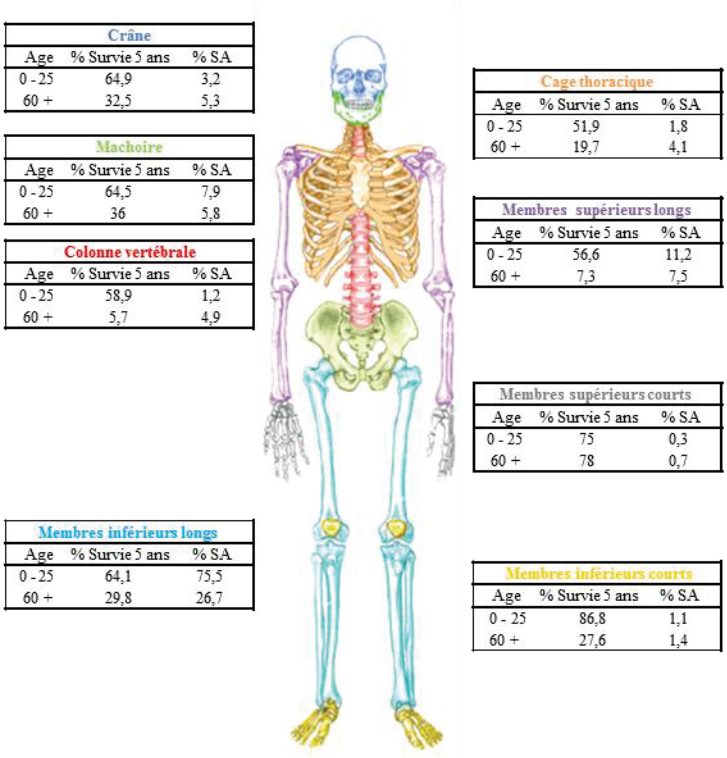


Figure 1 : Localisation préférentielle des ostéosarcomes et survie à 5 ans en fonction de cette localisation

La localisation de l'ostéosarcome, ainsi que la fréquence d'apparition et la survie associées diffèrent en fonction de l'âge des patients. Chaque couleur est associé à un site d'apparition (SA) différent dont la fréquence est également indiquée [11]

L'ostéosarcome est une tumeur complexe tant au niveau histologique que moléculaire. L'ostéosarcome est classé en fonction de différents critères détaillés dans le paragraphe suivant.

2. Classification de la tumeur

La localisation de la tumeur, ses caractéristiques histologiques et son grade sont les trois paramètres pris en compte permettant de définir le sous type et l'agressivité de l'ostéosarcome diagnostiqué. Cette classification permet de stratifier la tumeur et d'adapter le traitement.

a. Localisation

La majorité des ostéosarcomes survient au niveau de la métaphyse des os longs [7–10]. En plus de la localisation de la tumeur au niveau osseux, on distingue les ostéosarcomes centraux ou intra-médullaires et les ostéosarcomes de surface, selon qu'ils surviennent au centre de l'os ou à sa surface. Les premiers sont plus fréquents et représentent 75 % des cas [12] et diffèrent des ostéosarcomes de surfaces en terme d'évolution, de survie et de potentiel métastatique.

Chacune de ces catégories est subdivisée en sous-groupes en fonction du sous-type histologique de la tumeur.

b. Classification histologique des ostéosarcomes

Les ostéosarcomes sont caractérisés par la capacité des cellules tumorales à produire du tissu ostéoïde. On distingue différents sous types d'ostéosarcome en fonction de la proportion de cellules productrices de matrice osseuse [13]. Le sous-type histologique d'ostéosarcome le plus fréquent est l'ostéosarcome conventionnel (75 %) appartenant aux ostéosarcomes intra-médullaires. Il se développe dans la métaphyse des os longs [8,14]. Au sein de l'ostéosarcome conventionnel nous distinguons 3 principaux sous-types :

- l'ostéosarcome ostéoblastique (50 à 80 % des ostéosarcomes conventionnels) : les cellules majoritaires ici sont les ostéoblastes. L'ostéosarcome ostéoblastique produit une importante matrice osseuse donnant une tumeur dense et compacte [8,10,15].

- l'ostéosarcome chondroblastique (5 à 25 % des ostéosarcomes conventionnels) : les cellules majoritaires ici sont les chondrocytes. L'ostéosarcome chondroblastique synthétise une matrice cartilagineuse composée de différentes sortes de cartilage de plus ou moins bonne qualité [8,10,15].

- l'ostéosarcome fibroblastique (7 à 25 % des ostéosarcomes conventionnels) : les cellules majoritaires sont les fibroblastes. L'ostéosarcome fibroblastique ne produit ni de matrice osseuse, ni de matrice cartilagineuse et possède une histologie proche du fibrosarcome [8,10,15].

Cette classification histologique n'a pas de valeur pronostique quant à l'évolution de la tumeur [10]. D'autres variants histologiques d'ostéosarcomes centraux sont décrits comme les ostéosarcomes télangiectatiques, les ostéosarcomes à cellules géantes ou les ostéosarcomes à petites cellules.

Les ostéosarcomes de surface regroupent entre autres l'ostéosarcome périostéal, parostéal et intracortical.

- L'ostéosarcome parostéal représente plus de 75 % [16] des ostéosarcomes de surface et 5 % de la totalité des cas [17,18]. Ces lésions sont généralement de faible grade et présentent un taux de survie à 5 ans de 90 % [19].

- L'ostéosarcome périostéal ne représente que 1 à 2 % des cas diagnostiqués et affecte majoritairement les garçons.

A la localisation et au sous type histologique s'ajoute le grade histologique de la tumeur.

c. Grade histologique de l'ostéosarcome

Le grade histologique de la tumeur (grade de Broders – Tableau 1) est défini par le pourcentage d'anaplasie (soit le pourcentage de cellules tumorales ayant perdu les caractéristiques propres au tissu d'origine) et par l'index mitotique des cellules tumorales.

Grade	Pourcentage de cellules dédifférenciées	Agressivité	Métastases
1	0 - 25	- / +	-
2	25 - 50	+	-/+
3	50 - 75	++	+
4	75 - 100	+++	++

Tableau 1 : Grade de Broders

Le grade histologique de l'ostéosarcome est corrélé avec le pronostic clinique de la tumeur : le risque de métastases à distance est faible pour le grade 1 et 2 (on parle d'ostéosarcome de faible grade) et élevé dans les cas d'ostéosarcome de grade 3 et 4 (ostéosarcome de haut grade) [15,20]. La classification de l'ostéosarcome permet d'adapter au mieux le traitement : les patients diagnostiqués comme ayant un ostéosarcome de haut grade recevront obligatoirement de la chimiothérapie [15,20].

3. Diagnostic et évolution de l'ostéosarcome

a. Diagnostic de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome se traduit par l'apparition d'une masse au niveau d'un os ou d'une articulation dont elle peut gêner les mouvements ; aucun signe clinique particulier n'est associé à cette tumeurentrainant un diagnostic tardif de l'ostéosarcome. Une faible proportion des cas d'ostéosarcomes (5 à 10 %) est diagnostiquée consécutivement à une fracture [21]. Le diagnostic de cette tumeur osseuse résulte d'une expertise pluridisciplinaire faisant intervenir des oncologues médicaux, des radiologues et des anatomopathologistes. Le premier examen réalisé lors du diagnostic de l'ostéosarcome est une radiographie.

Imagerie médicale

Lors de la suspicion d'un ostéosarcome, la première étape consiste à réaliser des radiographies simples de l'os impliqué et de l'articulation adjacente. L'examen est complété

par imagerie par résonance magnétique (IRM). Sur les clichés de radiographie, une destruction de l'architecture de l'os est retrouvée au niveau de la masse tumorale. Un envahissement des tissus mous adjacents présentant des calcifications irrégulières ainsi qu'une rupture corticale peuvent être observés [22] (Figure 2A et 2B). L'IRM permet, pour la première fois, une évaluation détaillée de l'étendue tumorale dans la cavité de la moelle osseuse et dans les tissus mous, ainsi que sa relation avec les structures environnantes telles que les articulations et les nerfs. Le tomodensitométrie (CT) [23] thoracique reste l'imagerie de base pour la détection de métastases pulmonaires (Figure 2C). Cependant, le CT ne peut pas discriminer de façon fiable les petites métastases pulmonaires de petites lésions bénignes [24].

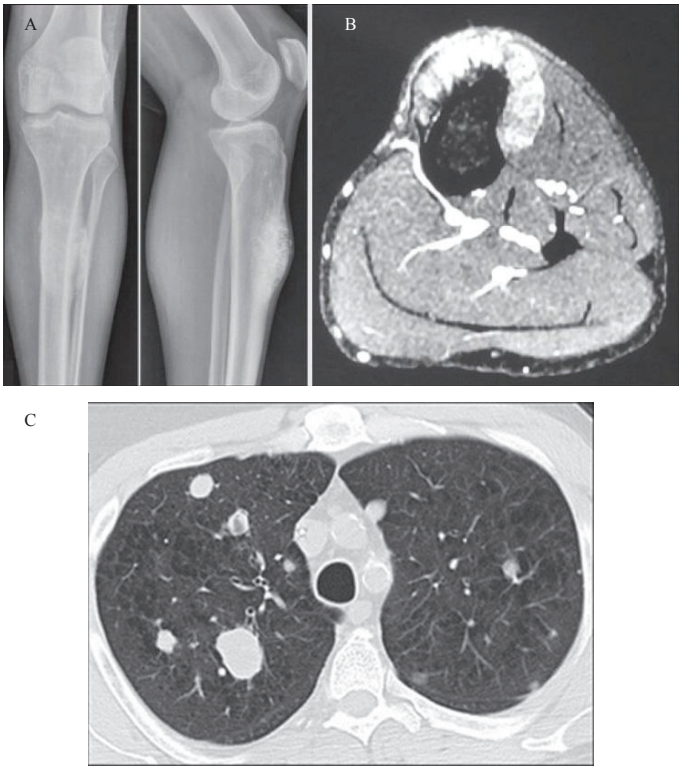


Figure 2 : Détection de l'ostéosarcome primaire et de ses métastases par imagerie médicale
(A) Radiographie d'un ostéosarcome détecté au niveau du tibia (B) IRM de la même région confirmant la localisation de l'ostéosarcome et permet de visualiser ses extensions dans les tissus mous adjacents [25].
(C) tomodensitométrie pulmonaire (axial) détecte des métastases (en blanc) dans le lobe pulmonaire (droit) [26]

Les techniques d'imagerie ne peuvent pas à elles seules assoir le diagnostic d'un ostéosarcome, l'examen anatomopathologique reste nécessaire pour valider le diagnostic de cette tumeur.

Analyse anatomopathologique

L'examen anatomopathologique est réalisé à partir d'une biopsie tumorale et est déterminant pour le diagnostic de la tumeur puisqu'il va permettre de déterminer le sous type et le grade de l'ostéosarcome essentiels pour déterminer alors le schéma thérapeutique à adopter.

b. Rechute locale et métastatique de l'ostéosarcome

Rechute locale de l'ostéosarcome

Malgré une évolution rapide de la tumeur, les traitements actuels (qui seront présentés dans le paragraphe II) permettent d'obtenir un taux de survie à 5 ans de 60 à 70 % [3], une rechute locale est observée chez un tiers des patients porteurs d'un ostéosarcome non métastatique lors du diagnostic [2] et représente aujourd'hui le premier challenge thérapeutique de l'ostéosarcome.

L'évolution métastatique de la tumeur reste le second challenge de la prise en charge de cette tumeur.

Evolution métastatique

L'ostéosarcome métastasie essentiellement par la vascularisation et le site préférentiel des métastases sont les poumons (85 à 90 %), même si des métastases osseuses sont observées dans 5 à 10 % des cas [27]. Chez les patients présentant une tumeur localisée lors du diagnostic, des métastases pulmonaires sont développées dans 30 à 40 % des cas et ce au cours des deux à trois premières années suivant le diagnostic pour 90 % de ces patients [28,29].

Lors du diagnostic, on estime que 80 à 90 % des patients présentent des micrométastases non détectables par les techniques d'imagerie [30,31] et que 15 à 20 % des patients présentent des métastases macroscopiques détectables [32,33]. Cette présence de métastases pulmonaires lors du diagnostic fait chuter le taux de survie à 5 ans pour ces patients pour lesquels il n'est que de 20 % [34]. Chez ces patients une récidive métastatique est observée dans 50 à 60 % des cas [35].

Les paragraphes précédents ont permis de présenter les caractéristiques principales de l'ostéosarcome. De part sa localisation intra ou para osseuse, l'ostéosarcome se retrouve au contact ou à proximité de la moelle osseuse et d'un réseau vasculaire. Un dialogue étroit entre les cellules d'ostéosarcome et l'environnement vasculaire, osseux et immunitaire est mis en place lors du développement tumoral. Le prochain paragraphe va traiter de l'implication de cet environnement dans la progression de l'ostéosarcome

4. Environnement tumoral de l'ostéosarcome

a. Environnement osseux et ostéosarcome

L'os est un environnement complexe dans lequel des types cellulaires différents sont retrouvés. On compte notamment les précurseurs ostoéoclastiques, les ostéoclastes, les précurseurs ostoéoblastiques, les ostéoblastes différenciés, responsables respectivement de la résorption osseuse et synthèse d'os.

Le remodelage osseux physiologique

Dans des conditions physiologiques, l'environnement osseux est caractérisé par un cycle de remodelage osseux comprenant deux phases majeures : celle de la lyse de l'os ancien (ou résorption) suivie par la production d'une nouvelle matrice osseuse. Ce cycle de remodelage osseux est très actif pendant les phases de croissance des enfants et des adolescents, période correspondant au premier pic d'incidence de l'ostéosarcome [31,36]. Au cours du remodelage osseux, les ostéoclastes sont dans un premier temps activés par les ostéoblastes grâce à l'interaction entre RANK Ligand et son récepteur RANK. Activés, les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse par lyse de l'ancienne matrice osseuse. Une fois la résoption osseuse terminée, les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par des cellules macrophagiques pré-ostéoblastiques. L'expression de l'ostépontine puis de l'ostéocalcine dans les précurseurs ostéoblastiques conduit à l'activation des ostéoblastes qui vont alors synthétiser la matrice osseuse minéralise (Figure 3).

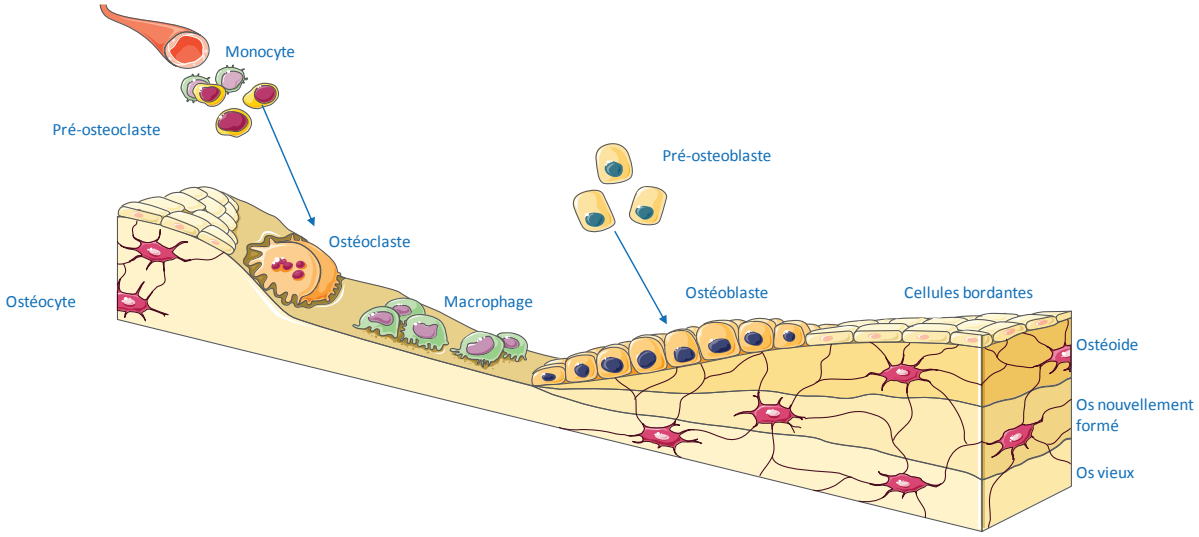


Figure 3 : Cycle du remodelage osseux

Les ostéoclastes sont responsables de la dégradation de la matrice et de la résorption osseuse. La nouvelle matrice osseuse est alors synthétisée par les ostéoblastes [37].

Remodelage osseux modifié par l'ostéosarcome

L'environnement osseux est caractérisé par une matrice osseuse hypoxique et au pH acide refermant un grand nombre de facteurs de croissance (TGF- β, VEGF, IGF-1) pouvant être impliqués dans l'initiation de l'angiogenèse et dans la différentiation des ostéoclastes. Ces caractéristiques de la matrice osseuse vont favoriser la tumorigenèse de l'ostéosarcome. Les conditions hypoxiques et son pH acide, stimulent la production de facteurs pro ostéoblastiques comme le VEGF, le PDGF et EDN1 par les cellules tumorales; elles favorisent également l'angiogenèse (point qui sera abordé dans le prochain paragraphe) et permet le maintien de cellules à l'état de cellules souches [38] pouvant être responsables de l'agressivité tumorale et de la résistance aux traitements [39,40].

L'ostéosarcome se développe dans cet environnement osseux à partir soit des ostéoblastes, soit des ostéoclastes, donnant des ostéosarcomes ostéoblastiques ou ostéoclastiques. L'origine ostéoblastique de la tumeur est caractérisée par une forte synthèse de matrice ostéoïde par des ostéoblastes actifs et en continuelle prolifération maintenue par la libération de facteurs de différenciation présent dans la matrice. La production d'une matrice osseuse désorganisée et immature conduit alors au développement d'un ostéosarcome ; une forte proportion des ostéosarcomes présentent ce sous-type histologique [41].

L'ostéosarcome peut être caractérisé par une forte activité ostéoclastique carastérique du sous-type histologique du même nom. En effet, durant la tumorigenèse les ostéoclastes

peuvent acquérir un fort potentiel ostéolytique. Cette activité lytique est caractérisée par la production de TGF-β ou l'Interleukine 11 (IL11) par les ostéoblastes et par la libération de facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse comme le TGF-β, l'IGF-1 ou les BMP. Ce déséquilibre du remodelage osseux crée un environnement riche en facteurs de croissance et en MMP et devient ainsi propice à la prolifération et l'activation des ostéoblastes producteurs d'une matrice osseuse arnachique ; favorise la dissémination métastatique de la tumeur. L'environnement osseux est alors régulé par un cycle vicieux balancé entre une dégradation puis une synthése accrue de l'os [42–44] (Figure 4).

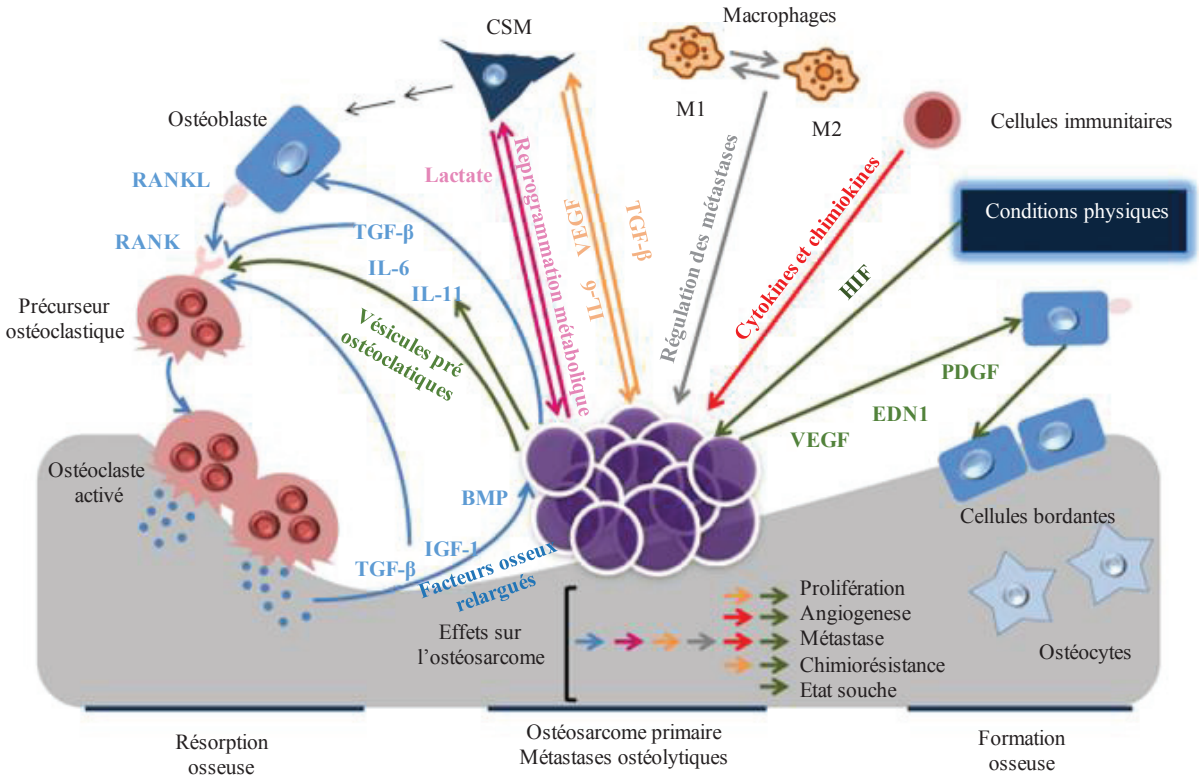


Figure 4 : Remodelage osseux détourné par l'ostéosarcome

Un déséquilibre du remodelage osseux est à l'origine de l'ostéosarcome : les ostéoblastes produisent une importante matrice osseuse immature et les ostéoblastes possèdent une activité lytique accentuée et favorise la dissémination métastatique de la tumeur [45]

Implication de la voie RANK / RANKL dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome

La voie RANK / RANKL / ostéoprotégrine (OPG) est l'une des voies de signalisation impliquées de l'homéostasie osseuse les plus étudiées. RANKL est un acteur de la différention, de l'activation et de la survie des ostéoclastes favorisant l'ostéolyse et la prolifération tumorale. L'OPG agit comme un récepteur leurre et inhibe la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes en empêchant la liaison entre RANK et RANKL [46]. Le ratio RANKL / OPG est significativement augmenté chez les patients souffrant d'ostéolyse

sévère d'origine tumorale ou non, se traduisant par une déficience des tumeurs en OPG [47]. Dans un modèle d'ostéosarcome de rat, le traitement par l'OPG sous forme libre prévient la progression tumorale en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses [48]. Cette stratégie thérapeutique sera développée dans les innovations thérapeutiques.

Un lien étroit existe entre le développement de l'ostéosarcome et l'environnement osseux dans lequel il se trouve. L'infiltrat immunitaire présent dans cet environnement impactera aussi sa tumorigenèse.

b. Environnement immunitaire de l'ostéosarcome

Les ostéosarcomes sont des tumeurs qui se placent dans un contexte particulier avec le système immunitaire : il existe un dialogue entre les cellules osseuses et les cellules du système immunitaire. En effet des voies de signalisation comme RANK-RANKL, des cytokines telles que l'IL-1, IL-6 ou le TGFβ ont des rôles à la fois dans l'homéostasie osseuse et dans la réponse immunitaire (Figure 5).

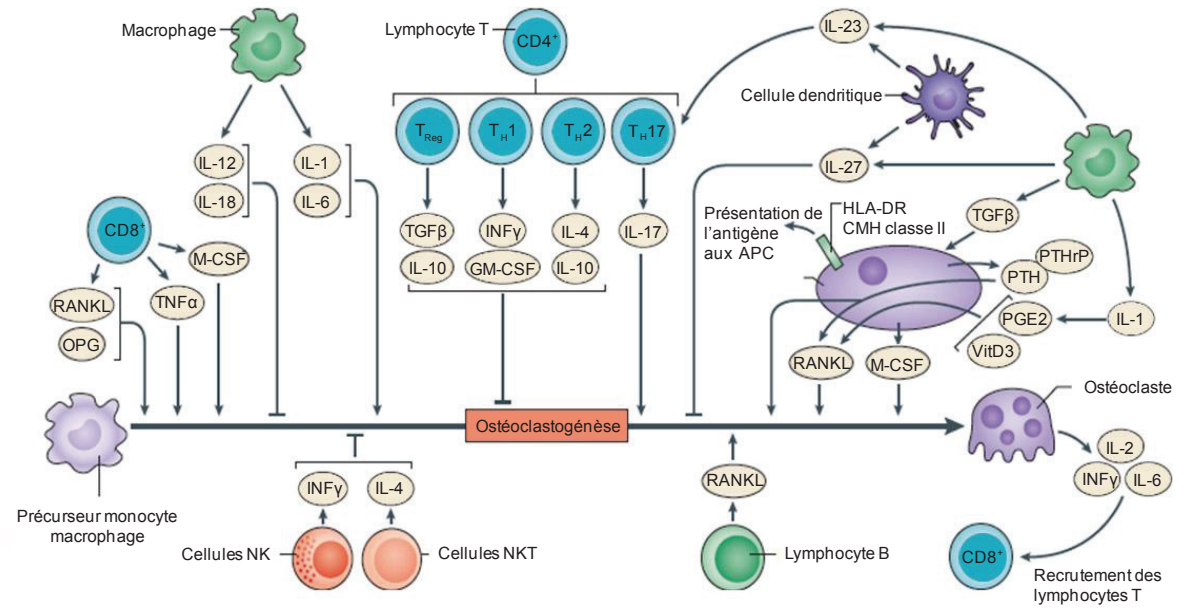


Figure 5 : Communication/interactions entre les cellules osseuses et les effecteurs de l'immunité

Les cellules immunitaires et les cellules osseuses, principalement les ostéoblastes et les ostéoclastes partagent des voies de signalisation leur permettant d'interagir les unes avec les autres [49]

L'ostéosarcome, tumeur infiltrée par les macrophages

L'ostéosarcome est une tumeur très infiltrée par les cellules immunitaires. Parmi les populations infiltrant l'ostéosarcome, sont retrouvés les macrophages. Chez l'homme, les macrophages associés à la tumeur (TAM) représentent une population immunitaire dont le rôle dans la progression tumorale est reconnu dans plusieurs types de cancers comme celui des ovaires [50] ou de la prostate [51] mais aussi dans les sarcomes [52]. Dans l'ostéosarcome, l'expression de marqueurs associés à la présence de macrophages M1 est associée à une agressivité faible de la tumeur et un meilleur devenir sans métastases. Plus récemment, d'autres études montrent elles aussi que l'infiltration de macrophages de type M1 caractérisée ici par $CD68^+$ et NOS^+ est significativement corrélée à un meilleur pronostic métastatique et associée à une plus faible vascularisation (CD146) [53]. Au contraire des travaux mettent en avant une corrélation entre une forte infiltration de macrophages M2 ($CD163^+$) et une forte vascularisation de la tumeur (CD31) [54]. Le rôle des macrophages M2 dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome semble controversé puis qu'une étude récente associe leur présence à un bon prognostic des patients [55]. De nombreuses études ont toutefois montré l'impact des macrophages sur le pronostic de la tumeur, aussi bien dans l'ostéosarcome canin que humain leur ciblage a permis l'amélioration de la survie des patients [56,57].

Il est aujourd'hui admis que durant la tumorigènese les cellules tumorale échappent à la surveillance du système immunitaire par les mécanismes d'immuno-édition [58]. Lors du développement de l'ostéosarcome la création d'un environnement anti-inflammatoire est aussi décrite. Différentes causes peuvent expliquer l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire : i) une faible immunogénécité de la tumeur ; ii) la production de facteurs immunosuppresseurs et la présence de cellules régulatrices; iii) la dérégulation de check points immunitaires

Perte de l'immunogénécité de l'ostéosarcome

Une mauvaise présentation ou une absence de présentation des antigènes tumoraux aux cellules effectrices de l'immunité peut diminuer l'imunogénécité de la tumeur. Cette absence de présentation peut parfois s'expliquer par la modulation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I par certaines cellules tumorales.

Dans l'ostéosarcome, une surexpression de la sécrétion de MHC class I chain-related molecule A (MICA) est observée dans le sérum des patients. Le relargage de cette molécule va interférer avec les récepteurs CMH présents sur les cellules effectrices comme les cellules natural killer (NK) et les lymphocytes T $CD8^+$ activés et bloquer leur cytotoxité contre les cellules cancéreuses [59].

Production de cellules et de facteurs immunosuppresseurs dans l'environnement de l'ostéosarcome

Les cellules tumorales vont créer un environnement anti inflammatoire et pro tumoral par la synthèse de facteurs immunosuppresseurs comme le TGFβ, l'IL10 et l'indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [60,61]. Une forte expression de l'IDO dans les ostéosarcomes est corrélée significativement avec une mauvaise survie globale et une rechute métastatique des patients [62]. L'IDO va inhiber la prolifération des lymphocytes $TCD8^+$ et va favoriser l'apoptose des lymphocytes $TCD4^+$ LT helper.

La présence de lymphocytes T régulateurs (LT Reg) dans la tumeur permet aussi la création d'un environnement pro tumoral. En effet, leur présence dans les ostéosarcomes est aussi associée à une survie globale des patients plus faible ainsi qu'une moins bonne réponse à la chimiothérapie [63].

Perturbation des check point immunitaire par l'ostéosarcome

Les check points immunitaires sont décrits comme inhibant la réponse immunitaire, permettant la tolérance du soi et pour limiter des réponses immunitaires aberrantes dans les conditions physilogiques [64]. Les check points les plus étudiés sont CTLA-4, PD-1 et TIM-3. Les cellules tumorales activent excessivement ces check points immunitaires pour échapper à la surveillance immunitaire et pour diminuer l'activation des lymphocytes T cytotoxiques [65]. Dans l'ostéosarcome, il a été montré que la détection de PD-1 dans le sang des patients est corrélée avec le grade de l'ostéosarcome, et un taux PD-1 circulant plus élevé est détecté dans le sang des patients atteints d'ostéosarcomes métastatiques que de ceux atteints d'ostéosarcomes localisés [66]. Récemment, une étude montre que le taux de TIM-3, inhibiteur du recrutement des lymphocytes TH1, dans le sérum de patients augmente dans le tissu

tumoral par rapport au tissu sain et est corrélé avec le grade de la tumeur. De plus il est associé à un faible pronostic dans la survie sans métastase ($p < 0,05$) [67]. Aujourd'hui ils représentent des cibles thérapeutiques très prometteuses et ont déjà démontré leur efficacité anti-tumorale dans la prise en charge de plusieurs cancers.

Toutes ces communications entre les cellules passent notamment par la circulation sanguine impliquant l'angiogenèse dans la progression tumorale.

c. Rôle de l'angiogenèse dans l'ostéosarcome

L'angiogenèse joue un rôle important dans la croissance et dans la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. En effet, jusqu'à ce que la tumeur atteigne une taille de 1 à 2 mm^3 les apports en oxygène et nutriments aux cellules tumorales sont assurés par diffusion simple [68]. Au-delà, un état d'hypoxie se crée au centre de la tumeur pouvant être à l'origine d'une nécrose, la tumeur met alors en place des mécanismes pro-angiogéniques notamment par la sécrétion de facteurs de croissance. L'angiogenèse normale est caractérisée par la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants sous la stimulation du facteur de croissance VEGF [69,70]. Lors de l'angiogenèse de l'ostéosarcome, la structure des néovaisseaux tumoraux est différente de celle des autres organes puisqu'elle doit s'adapter à la rapide croissance tumorale. Cette rapidité de croissance entraine la mise en place d'un réseau vasculaire chaotique, plus fragile et dont le diamètre des vaisseaux est irrégulier [71] (Figure 6).

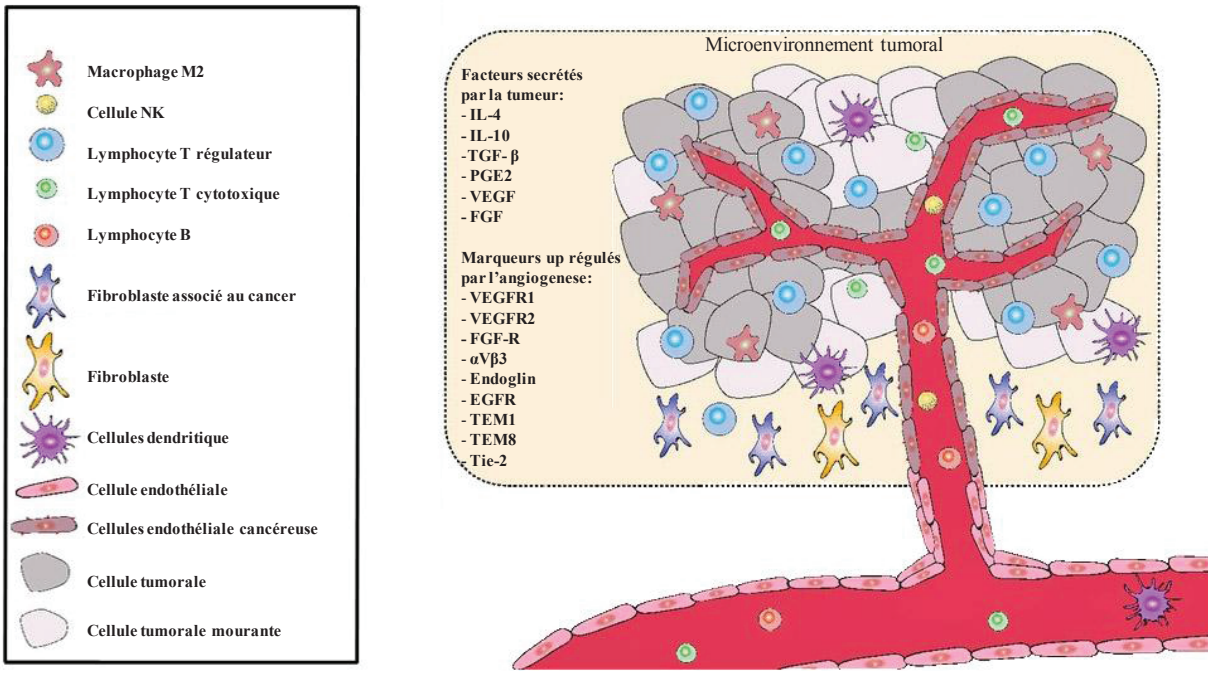


Figure 6 : Angiogenèse tumorale

La tumeur sécrète des facteurs pro angiogéniques et favorise l'apparition d'un réseau vasculaire dense et anarchique au sein de la tumeur [72]

Dans un environnement hypoxique, comme l'environnement osseux, une translocation nucléaire d' hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) permet son interaction avec des promoteurs de gène codant les facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou le PDGF [73]. Les récepteurs au VEGF, VEGF-R1 et VGF-R2, sont exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins alors que VEGF-R3 est exprimé dans les vaisseaux lymphatiques. Plus précisément l'interaction du VEGF avec VEGF-R2 est capable à lui seul d'induire tous les effets biologiques de survie, de prolifération, de migration et d'invasion des cellules endothéliales. L'interaction du VEGF avec le VEGF-R1 est impliqué dans la perméabilité vasculaire [74,75].

L'importance du VEGF dans l'angiogenèse a mené à l'étude de sa valeur pronostique dans l'ostéosarcome. Des travaux montrent que la présence de VEGF dans la région péritumorale d'ostéosarcomes est directement corrélée avec la présence de métastases pulmonaires et une forte densité de micro vaisseaux (MVD) [76]. Cette expression est aussi corrélée avec l'agressivité tumorale : le VEGF est présent en plus forte concentration dans les ostéosarcomes de grade avancé et est associé à une moins bonne réponse à la chimiothérapie et à un mauvais pronostic pour la rechute tumorale ainsi que la survie des patients [77,78]. D'autre part, la sécrétion de VEGF sanguin est plus importante chez les personnes atteintes d'un ostéosarcome que chez les personnes saines ($p < 0.001$) [79].

La fixation du VEGF sur son récepteur induit également la production de matrix metalloproteinases 2 (MMP2) et matrix metalloproteinases 9 (MMP9) ainsi que d'autres protéases facilitant la dégradation de la matrice environnante. La production de ces MMP est impliquée dans le gain des capacités invasives des cellules d'ostéosarcome [80,81]. En effet, les MMP peuvent effectivement dégrader presque tous les composants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale comme le collagène et la laminine [82]. La dégradation de la matrice osseuse est alors favorable à l'envahissement métastatique par les MMP et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules tumorales renforçant leur potentiel invasif [83]. Chez l'homme, l'augmentation de l'activité des MMP2/MMP9 est associée à une faible réponse à la chimiothérapie [84].

L'angiogenèse apparait comme une cible thérapeutique intéressante pour l'ostéosarcome pouvant être touchée à différents niveaux pour limiter la croissance et la dissémination de la tumeur. De multiples essais ont été évalués dans le but de freiner l'angiogenèse, ils seront présentés dans le paragraphe correspondant.

Chacun de ces acteurs représente une cible potentielle pour de nouveaux traitements et sera développer dans la partie sur les nouvelles thérapies développées dans la prise en charge de l'ostéosarcome. L'environnement de l'ostéosarcome est complexe et peut être détourné par les cellules tumorales pour faciliter sa croissance. D'autre part, certains facteurs prédisposant à l'ostéosarcome sont connus et seront présentés dans le paragraphe suivant.

5. Altérations moléculaires de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome est un sarcome à génomique complexe se caractérisant par un caryotype complexe et de nombreuses altérations moléculaires. A l'heure actuelle les drivers génomiques à l'origine de cette tumeur ne sont pas encore bien connus cependant certains d'entre eux sont identifiés et vont être présentés ici.

Certaines altérations génétiques peuvent prédisposer à l'ostéosarcome et certaines mutations sont retrouvées dans quasiment tous les ostéosarcomes. En effet, cette tumeur est caractérisée par un caryotype complexe, la présence de nombreuses variations structurales ainsi que des variations du nombre de chromosomes. Certaines de ses anomalies favorisent et prédisposent à son développement.

a. Prédispositions moléculaires à l'ostéosarcome

Perte d'hétérozygotie de Rb

La protéine du rétinoblastome (Rb) est impliquée dans la progression du cycle cellulaire : la forme active de la protéine se lie au facteur de transcription E2F empêchant alors l'expression de gènes nécessaires à l'entrée des cellules dans la phase S impliquée dans le cycle cellulaire [85,86]. Dans l'ostéosarcome, la perte d'hétérozygotie de Rb induit la suppression d'un point de contrôle du cycle cellulaire résultant en une prolifération accrue des cellules tumorales [87,88]. Les ostéosarcomes présentant une perte d'hétérozygotie de Rb (plus de 60 % des cas) sont d'ailleurs plus agressifs que ceux n'ayant pas perte de Rb [87,89]. Cette perte d'hétérozygotie de Rb est également associée à une survenue plus précoce de l'ostéosarcome [87] et à une diminution du taux de survie à 5 ans. Ce dernier n'est plus que de 20 % pour les patients présentant une perte d'hétérozygotie de Rb alors qu'il est de 70 % pour les autres [87,88].

D'autres anomalies génétiques comme des mutations de P53 sont observées dans les tumeurs d'ostéosarcome.

Mutation germinale de P53 : syndrome de Li Fraumeni

Le syndrome de Li Fraumeni est caractérisé par une mutation germinale non fonctionnelle de P53. La perte de fonction de P53 chez les patients ayant un syndrome de Li Fraumeni peut être causée par une délétion partielle du gène [90] ou des variations structurelles génomiques [91]. Du fait de la perte de fonction de P53, les patients présentant un syndrome de Li Fraumeni ont une plus forte prédisposition à développer des ostéosarcomes [92].

P53 est un facteur de transcription régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme l'apoptose, la sénescence et l'arrêt du cycle cellulaire [93] (Figure 7).

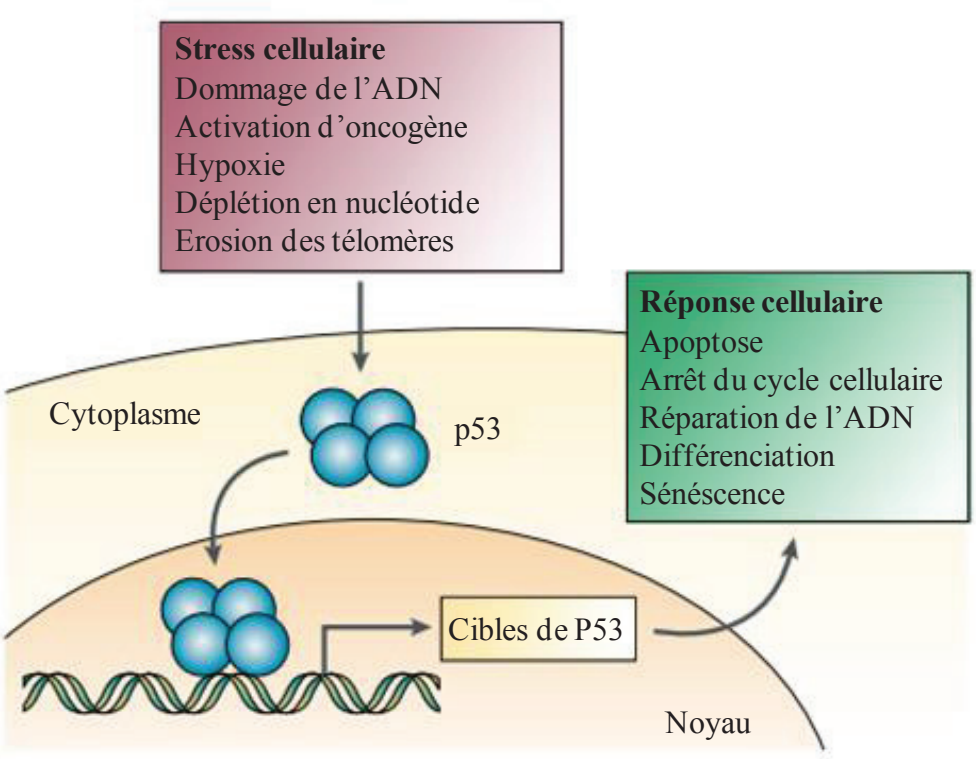


Figure 7 : Voie de signalisation de P53

En réponse au stress cellulaire P53 s'active et entre dans le noyau pour induire la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, le cycle cellulaire ou les réparations à l'ADN [94]

Dans les conditions physiologiques normales, une exposition à des facteurs de stress génotoxiques tels que les rayonnements ionisants ou le stress oxydatif induit une phosphorylation P53 et de son inhibiteur MDM2, diminuant l'interaction entre les deux protéines limitant la dégradation de P53 par le protéasome. L'accumulation de P53 induit alors l'expression de nombreux gènes cibles en aval qui régulent les processus cellulaires critiques, tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. La présence d'une protéine P53 non fonctionnelle favorise la prolifération anarchique des cellules tumorales résultant d'un défaut de contrôle du cycle cellulaire et de l'entrée en apoptose (Figure 7) [95].

Il est important de noter tout de même que le syndrome de Li Fraumeni reste rare mais qu'une perte de fonction de TP53 est retrouvée dans 40 à 60 % des ostéosarcomes [96]. Cette altération de la voie P53 sera présentée dans les paragraphes suivants.

L'ostéosarcome est une tumeur caractérisée par une grande instabilité génomique et une importante complexité génomique [97,98]. Si à l'heure actuelle aucun driver génétique fort de l'ostéosarcome n'a été identifié, de nombreuses voies de signalisation impliquées, la survie

cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse sont dérégulées dans l'ostéosarcome et confèrent un avantage sélectif aux cellules tumorales. Dans les sous parties suivantes nous allons présenter les principales voies dérégulées dans l'ostéosarcome.

b. Principales voies de signalisation altérées dans l'ostéosarcome

La résistance aux traitements est médiée par de nombreux mécanismes dont le transport des médicaments, l'inhibition de l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN, les défauts dans le contrôle du cycle cellulaire entre autres (Figure 8).

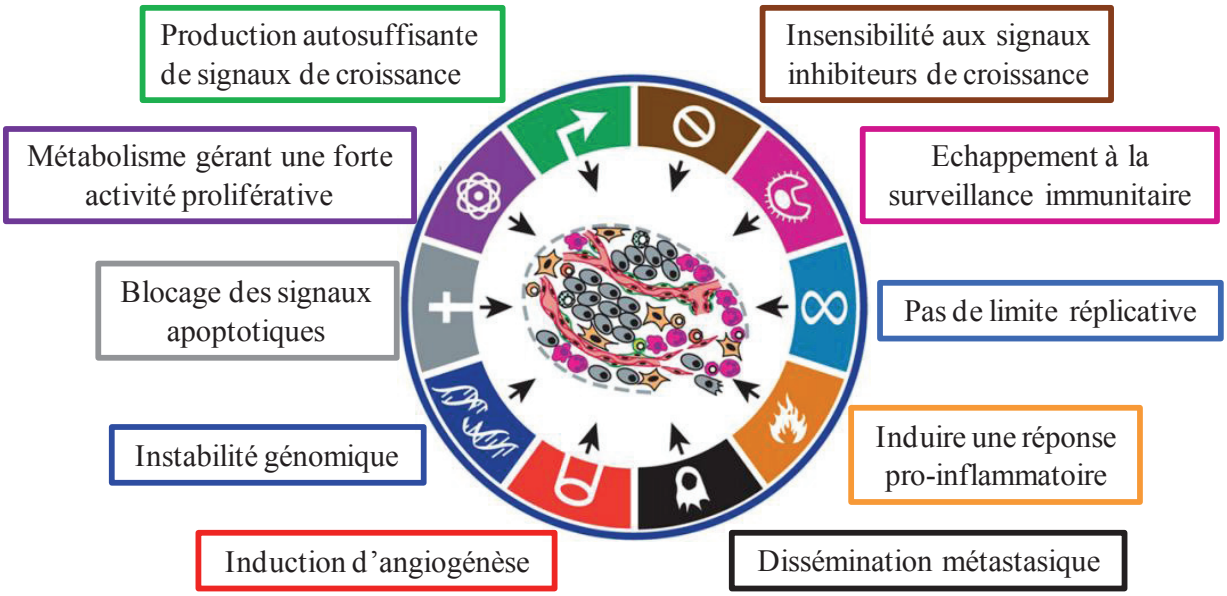


Figure 8 : Caractéristiques acquises par les cellules transformées indispensables au développement du cancer

Les cellules tumorales accumulent des altérations au cours de la transformation. Le développement de la pathologie est ainsi associée à l'acquisition de nouvelles propriétés des cellules tumorales [99].

Chimiorésistance, pompes à efflux et récepteurs membranaires

En réponse aux chimiothérapies, les cellules tumorales mettent en place des mécanismes de résistance pour échapper aux effets cytotoxiques de ces agents. Un des principaux mécanismes d'échappement aux chimiothérapies telles que la doxorubicine ou le méthotrexate est la surexpression des pompes à efflux.

- Surexpression de MDR1

Le gène ABCB1 ou MDR1 code pour une glycoprotéine transmembranaire la P-gp ou Glycoprotéine P qui permet le transport des substrats exogènes et endogènes de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur [100–102]. La surexpression de P-gp est l'un des principaux mécanismes de résistance des cellules d'ostéosarcome [103] dans lequel elle permet l'élimination non spécifique des chimiothérapies comme la doxorubicine hors des cellules tumorales [104]. Des études ont révélé qu'une forte expression de P-gp était corrélée avec la résistance aux chimiothérapies comme la doxorubicine dans les lignées humaines d'ostéosarcome [105–107].

Chez l'homme l'acquisition de la surexpression de la P-gp est due notamment à une amplification et à un gain du nombre de copies du gène MDR1 [108]. Il a été montré qu'une surexpression de P-gp est un facteur pronostique défavorable pour la survie et la réponse aux traitements des patients [109]. Cette voie de signalisation apparait alors comme un acteur majeur de la tumorigenèse de l'ostéosarcome et une cible potentielle dans la prise en charge des patients notamment par le ciblage des Aurora Kinase.

- Sous expression de DHFR

Le méthotrexate (MTX) est administré à fortes doses pour le traitement des ostéosarcomes pédiatriques. Le méthotrexate pénètre dans la cellule par une voie de transport des folates réduits [110,111]. Une fois accumulé dans la cellule, le MTX interagit avec la dihydrofolate réductase (DHFR) une enzyme qui convertit le dihydrofolate en tétrahydrofolate, qui est essentiel pour la synthèse de l'ADN *de novo* [112,113]. L'administration du MTX va donc inhiber la synthèse de l'ADN. Dans l'ostéosarcome une diminution de l'expression de la DHFR et de ses partenaires est retrouvée et est associée à une plus forte chimiorésistance de la tumeur [114,115]. De nouveaux agents ont été développés pour contourner la mise en place de cette chimiorésistance, nous les détaillerons dans le paragraphe sur les nouvelles approches thérapeutiques.

La radiorésistance de l'ostéosarcome

Même si l'ostéosarcome est considéré comme une tumeur résistante aux radiations, la radiothérapie peut être utilisée dans certains cas [116]. Si les mécanismes d'action à l'origine de

la radiorésistance de l'ostéosarcome sont encore à s'éclaircir ; sa nature hypoxique est un facteur favorisant la résistance aux radiations. [117,118]. L'importance de l'hypoxie et de la présence de HIF dans l'agressivité tumorale est retrouvée chez les patients : une forte expression de HIF est associé à une survie globale et sans métastase plus faible que pour des patients qui n'exprime pas ou très peu la protéine [119,120].

En plus de leur résistance aux thérapies, les cellules tumorales sont caractérisées également par leur capacité à échapper à l'apoptose. Des mutations sur plusieurs voies et effecteurs de ces voies sont rencontrées dans l'ostéosarcome et présentées maintenant.

Echappement à l'apoptose et à la mort cellulaire

La résistance aux traitements conventionnels passe par la capacité des cellules tumorales à inhiber les signaux de mort cellulaire. Des mutations de P53, des amplifications de MDM2 ou des dérégulations de plusieurs partenaires apoptotiques ou effecteurs de différentes voies apoptose sont observées dans les ostéosarcomes.

- MDM2 et P53

Dans les conditions physiologiques de non stress, P53 est présente en faible quantité dans la cellule grâce à la boucle de répression induite par MDM2. La protéine MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) est une ubiquitine ligase responsable de la régulation négative de P53 lors de la liaison directe entre les deux protéines. MDM2 va ubiquitiner P53, cette modification permet ainsi la sortie du noyau vers le cytoplasme de P53 et entraine sa dégradation par le protéasome [121]. L'interaction entre les deux protéines est très forte. Lors d'un stress cellulaire, MDM2 va être phosphorylée, déstabilisant sa liaison à P53 qui sera de nouveau active et pourra alors induire des réparations à l'ADN, l'arrêt du cycle ou l'entrée en apoptose de la cellule [95]. L'expression de chacune de ces protéines est altérée dans l'ostéosarcome et l'interaction entre les deux protéines représentent une cible thérapeutique prometteuse.

Une augmentation de la forme mutée non fonctionnelle de P53 est observée dans les tumeurs humaines. De nombreuses études mettent en avant la mauvaise valeur pronostique de la surexpression de cette forme tronquée de P53 : les patients exprimant fortement P53 mutée

ou non fonctionnelle possèdent une survie à 3 ans plus faible que les patients présentant la protéine fonctionnelle [122,123].

L'analyse par FISH d'une cohorte d'ostéosarcomes humains met en avant une amplification de MDM2 dans 4 % des cas et surtout un gain de nombre de copies de MDM2 dans 59 % des cas étudiés [124]. Dans certains cas l'amplification du nombre de copies MDM2 est liée à une inactivation de p53 (18 %) [125].

L'activation de la puissante fonction suppresseur de tumeur P53 en bloquant l'interaction MDM2-p53 à l'aide d'inhibiteurs de petites molécules MDM2 est intensément poursuivie en tant que nouvelle stratégie thérapeutique contre l'ostéosarcome. Différents agents thérapeutiques ont été développés pour le ciblage de l'interaction entre MDM2 et P53 [123,126].

- Apoptose

L'apoptose est une voie de signalisation fortement dérégulée dans les cancers et apparait comme l'un des marqueurs de la tumorigenèse [99].

Les cellules tumorales mettent en place différentes stratégies pour contourner l'apoptose. La stratégie la plus fréquemment retrouvée est la perte de la fonction suppresseur de tumeur P53, qui élimine ce capteur de dommages critiques du circuit induisant l'apoptose. Il est aussi possible pour les cellules tumorales d'échapper à cette mort cellulaire en augmentant l'expression des régulateurs antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl), en régulant négativement les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) acteurs de la voie intrinsèque de l'apoptose [99].

La voie apoptotique intrinsèque consiste à l'engagement des caspases via la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries. Elle est régulée par les protéines de la famille B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) de manière complexe par un réseau d'interactions entre les membres pro et anti- apoptotiques, en réponse à des dommages à l'ADN sévères ou un stress cellulaire [127].

Dans cette partie nous allons détailler certaines de ces altérations retrouvées dans l'ostéosarcome.

- Famille Bcl-2

La famille des protéines Bcl-2 regroupe des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xl et des protéines pro-apoptotiques comme Bak, Bax et Bad [128,129]. En réponse à divers stress cellulaires, une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe entraine le relargage vers le cytosol cellulaire de différentes molécules régulatrices dont le cytochrome C. Bax, Bak sont nécessaires pour la permabilisation de la membrane, puisqu'ils forment des pores dans la membrane mitochondriale et permettent ainsi le relargage des molécules régulatrices mitochondriales comme le cytochrome C. Ce processus est régulé négativement par les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, qui se lient aux protéines de type Bax / Bak et les neutralisent [130,131]. L'une des propriétés structurelles de ces protéines pro-apoptotiques est la présence d'un domaine BH3 leur permettant d'interagir dans un contexte physiologique normal avec les protéines anti-apototiques régulant négativement l'apoptose. Du fait du rôle central du domaine BH3 dans l'activation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl2, des molécules appelées les BH3 mimétiques ont été développées. Les BH3 mimétiques sont une nouvelle classe thérapeutique de petites molécules à domaine BH3. Elles se lient alors au domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques avec une forte affinité afin d'empêcher leur liaison aux protréines pro-apoptotiques et de restaurer ainsi l'apoptose [132,133].

Dans l'ostéosarcome, des analyses immunohistochimiques ont montré qu'une expression membranaire et / ou cytoplasmique de Bcl-2 est observée dans 25 % des cas étudiés et sa surpression est associée à une survie à 3 ans plus faible [134]. La surexpression de Bcl-xl, une autre protéine anti-apoptotique de la même famille, est aussi associée à une survie diminuée chez ces patients ($p=0.039$) [135]. Les membres de cette famille représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour la prise en charge de l'ostéosarcome.

L'un des autres marqueurs caractéristiques des cellules tumorales est leur forte activité proliférative [99].

En plus d'échapper à l'apoptose, les cellules d'ostéosarcome détournent la machinerie du cycle cellulaire pour favoriser leur prolifération et entrainer la croissance tumorale. De nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régulation du cycle cellulaire peuvent être mutées dans l'ostéosarcome, nous allons dans les sous-parties suivantes en présenter quelques unes.

Altérations du cycle cellulaire

- Wnt / β-caténine

La voie de signalisation de Wnt / β-caténine est essentielle pour le développement embryonnaire et la mise en place de la polarité dorso-ventrale du tube neural [136]. Chez l'adulte, cette voie contrôle la prolifération cellulaire et se retrouve impliquée dans la tumorigenèse. L'interaction de Wnt au complexe formé par la protéine transmembranaire Frizzled liée au récepteur LRP5/6 permet la transduction d'un signal inhibant la dégradation de la β-caténine. Celle-ci s'accumule alors dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau. Dans sa localisation nucléaire, la β-caténine interagit avec des facteurs de transcription tel que le TCF activant des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme c-myc ou la cycline D1. En absence de Wnt, la β-caténine est dégradée par le protéasome et n'agit plus comme agent co transcriptionnel [137]. La prolifération et la migration cellulaire sont alors inhibées (Figure 9).

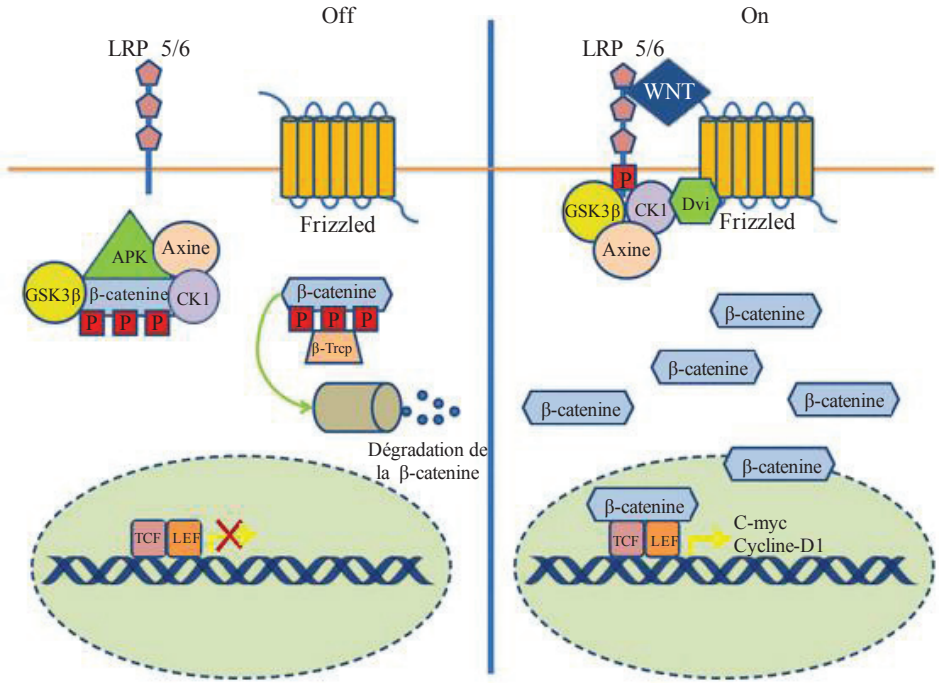


Figure 9 : Voie de signalisation Wnt / β caténine

Lorsque Wnt est absent la β-caténine est phosphorylée et dégradée par le protéasome. La fixation de Wnt sur Fz et LRP5 permet la stabilisation de la β-caténine qui est alors transloquée dans le noyau et permet la transcription de gènes tels que c-myc[138]

Plus récemment, des études ont mis en évidence le rôle de la β-caténine dans l'homéostasie osseuse [139]. La β-caténine intervient à différentes étapes de la différenciation des ostéoblastes [140]. Dans les stades précoces de la différenciation, une inactivation de la β-caténine dans les précurseurs mésenchymateux ou dans les ostéoblastes immatures bloque leur différenciation et conduit à une déficience en ostéoblastes matures [141–144] (Figure 10). Une grande proportion d'ostéosarcome (75 %) présente une surexpression ou une mutation Wnt, se traduisant par une stimulation de la prolifération cellulaire. La surexpression de Wnt10b dans les ostéosarcomes est associée à un mauvais pronostic dans la survie à 5 ans des patients. De plus, des analyses moléculaires (PCRq) et protéiques (immunohistochimie) ont permis de montrer que l'expression LRP5 dans les tumeurs était de mauvais pronostic pour les patients atteints d'ostéosarcome. L'expression élevée de LRP5 est corrélée avec un risque de dissémination métastatique accru [145].

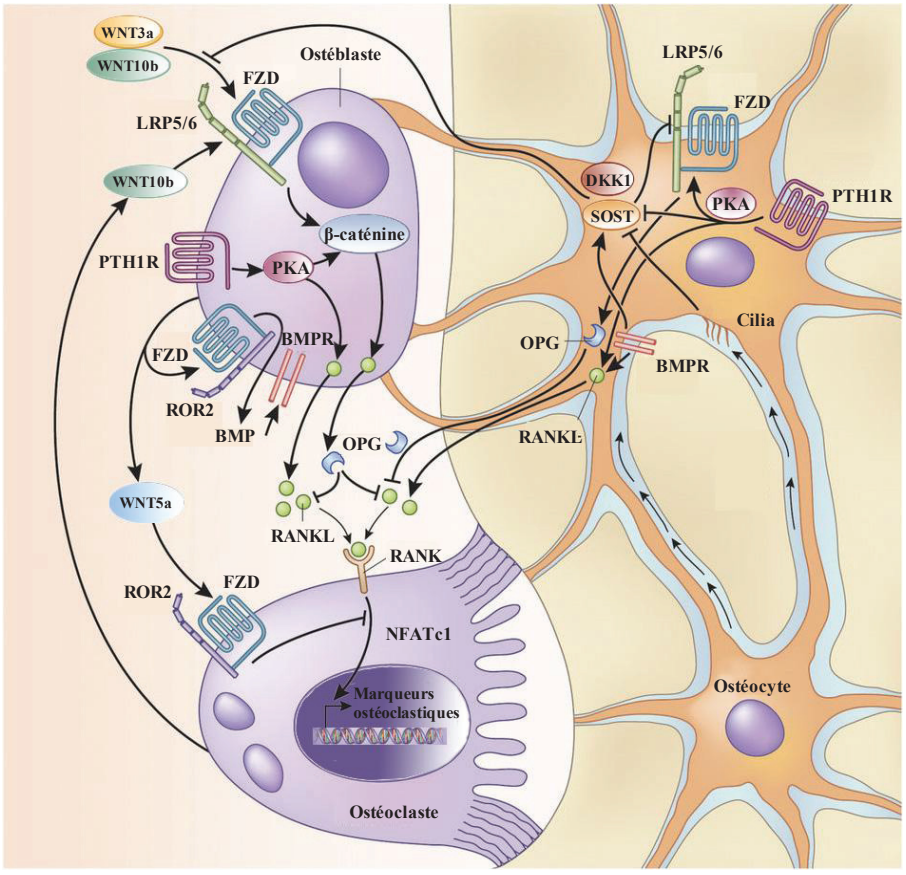


Figure 10 : Implication de la voie Wnt / β Caténine dans l'homéostasie osseuse

La voie de signalisation Wnt / β Caténine permet la différenciation des ostéoblastes induisant à leur tour l'activation des ostéoclastes. Cette différenciation ostéoclastique maintient l'activation de la voie Wnt / β Caténine [139]

- PI3K / Akt / mTOR

La voie de signalisation intracellulaire PI3K / AKT / mTOR est impliquée dans la croissance, la prolifération cellulaire, et l'angiogenèse ainsi que dans la chimiorésistance de l'ostéosarcome [146,147,148]. Cette voie de signalisation est initiée par l'interaction de ligands à leur récepteurs tyrosine kinases comme PDGFR, IGF-1R, et HER 1-4 [146,147,148]. L'activation de cette voie se fait par une cascade de phosphorylations commençant par la phosphorylation PI3K en réponse à l'interaction ligand à un RTK. Cette cascade de phosphorylations aboutit l'activation de mTOR qui contrôle la prolifération, la migration cellulaire via le facteur de transcription 4EBP1. Cette voie de signalisation complexe, est interconnectée avec d'autres et possède des boucles de rétrocontrôle négatif notamment médiée par Akt [162,148]. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOr est également impliquée dans contrôle l'apoptose. En effet une fois Akt activé, Akt peut inhiber deux voies apoptose :

- La voie médiée par Bcl-2 / Bcl-xl : la phosphorylation de BAD par Akt entraine la dissociation de BAD du complexe Bcl-2 / Bcl-X qui ne pourra alors plus exercer son rôle pro-apoptotique [149].

- La voie apoptose médiée par p73 : la phosphorylation de YAP par Akt va inhiber l'apoptose médiée par p73 (Figure 11).

Akt est de plus impliquée dans la chimiorésistance : en effet Akt permet la phosphorylation de MDM2 qui pourra alors se fixer sur p53 et ainsi lever le point de contrôle de réparation des dommages à l'ADN. Une prolifération anarchique des cellules est alors observée (Figure 11).

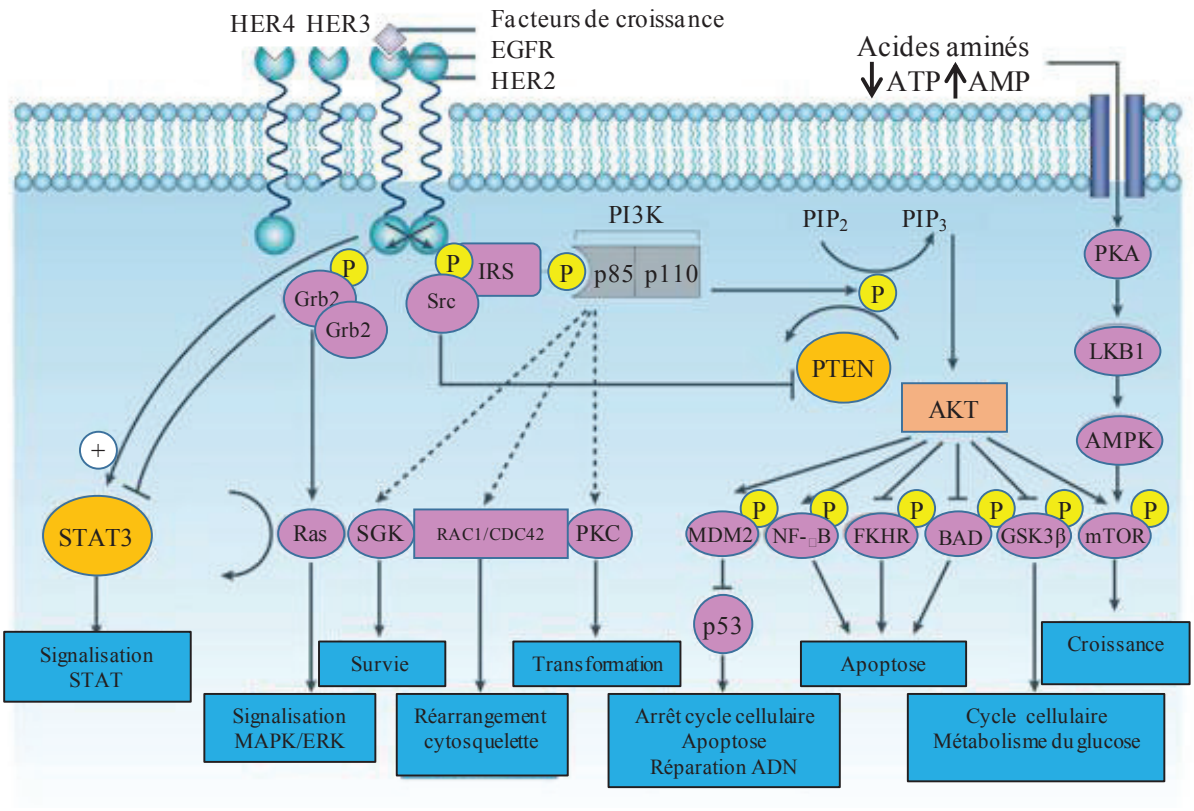


Figure 11 : Voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR

Des cascades de phosphorylation entraine l'arret du cycle ceullaire ou l'aptose ; induit des réarrangements du cytosquelette [150]

Dans l'ostéosarcome différentes altérations de cette voie de signalisation sont recensées et mènent à son activation soutenue favorisant la tumorigenèse et la résistance thérapeutique [151,152,153]. Les principales altérations sont des surexpressions des RTK, des mutations activatrices de PI3K, Akt, mTOR et la diminution de l'expression de PTEN impliquée dans le contrôle négatif de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Dans les ostéosarcomes primaires une surexpression de mTOR est de mauvais pronostic en terme de survie sans métastase et survie globale des patients [154]. L'efficacité anti-tumorale de différents inhibiteurs de cette voie de signalisation a été et est en évaluation dans des modèles précliniques d'ostéosarcome et seront présentés dans le chapitre dédié aux nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome.

- IGF-1 et IGF-1R

La voie IGF-1 est impliquée dans l'homéostasie du tissu osseux ; elle est notamment impliquée dans la différenciation ostéogénique des ostéoblastes [155] et la mise en place du

périoste [156]. Dans un contexte physiologique normal, l'interaction entre IGF-1 et son récepteur IGF-1R cause l'autophosphorylation du récepteur et déclenche l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire dont les voies PI3K / Akt / mTOR et la voie des MAPKinases [157].

De nombreuses mutations dans la cascade de signalisation de l'IGF-1 dont l'amplification de IGF-1R sont présentes dans l'ostéosarcome [158,159]. Des études préliminaires *in vitro* mettent en évidence une surexpression de l'IGF-1R à la surface des cellules d'ostéosarcome induisant une activation accrue de la prolifération des cellules tumorales en présence de IGF-1 [160]. Une surexpression significative d'IGF a été retrouvée dans des tumeurs primaires d'ostéosarcomes humains [161] et est alors associée à l'agressivité de la tumeur. Dans une cohorte de 122 ostéosarcomes, il a été montré que 27 % des tumeurs présentent des mutations impliquant l'un des acteurs de la voie de signalisation IGF-1R ; mutations touchant le récepteur lui-même ou des partenaires de signalisation comme ceux de la voie PI3K / Akt / mTOR [159].

La voie de signalisation de l'IGF1 représente un axe de recherche attractif pour le développement de thérapies ciblées anti-cancéreuses. Ce point sera abordé dans le paragraphe traitant des nouvelles thérapies de l'ostéosarcome.

Jusqu'à présent, nous avons présenté des mutations touchant des voies de signalisation impliquées dans les fonctions cellulaires. D'autres voies de signalisation impliquées dans l'établissement du microenvironnement osseux peuvent être mutées créant un microenvironnement favorable à la prolifération et migration des cellules tumorales. C'est notamment le cas de la voie du TGF-β.

- TGF-β

Le TGF-β est une cytokine présente en abondance dans le tissu osseux [162,163]. Dans les conditions physiologiques, la fixation du TGF-β sur ses récepteurs induit la phorolysation de SMAD-R qui se fixe alors sur SMAD4. Ce complexe est alors transloqué vers le noyau où il activera la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire [164]. En plus d'activer la voie PI3K/mTOR, le TGF-β stimule la migration et la prolifération des cellules souches mésenchymateuses lors de la différenciation ostéoblastique [165,166] suggérant un rôle important dans le développement de l'ostéosarcome.

L'implication de cette voie de signalisation dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome a été mise en évidence dans différents modèles cellulaires et animaux. Une diminution de l'expression du TGF- β induite par il'nterférence avec le miR-29 dans la lignée MG63 est accompagnée d'une réduction de la capacité des cellules à former des colonies et une augmentation de l'apoptose. Dans un modèle de xénogreffe murine, le miR-29 provoque une diminution de l'expression du TGF-β associée à un ralentissement de la progression tumorale [167]. Des essais précliniques inhibant la voie de signalisation du TGF-β ont donné des résultats prometteurs que nous détaillerons dans la partie consacrée aux nouvelles approches thérapeutiques pour l'ostéosarcome.

- YAP et TAZ

YAP et TAZ sont des facteurs de transcription induits par la voie de signalisation Hippo. Cette voie est notamment impliquée dans la prolifération cellulaire et l'apoptose, mais elle régule également la prolifération des ostéoblastes immatures et leur maturation en ostéoblastes non prolifératifs [168] (Figure 12). Les dérégulations de la signalisation Hippo sont rencontrées dans de nombreux cas d'ostéosarcomes : la surexpression de YAP [169,170] est mise en évidence dans une cohorte de 40 ostéosarcomes humains et est corrélée avec le grade de la tumeur. D'autres études mettent en avant qu'une surexpression de YAP localisée dans le noyau des ostéosarcomes conventionnels est corrélée avec le caractère invasif de la tumeur [171].

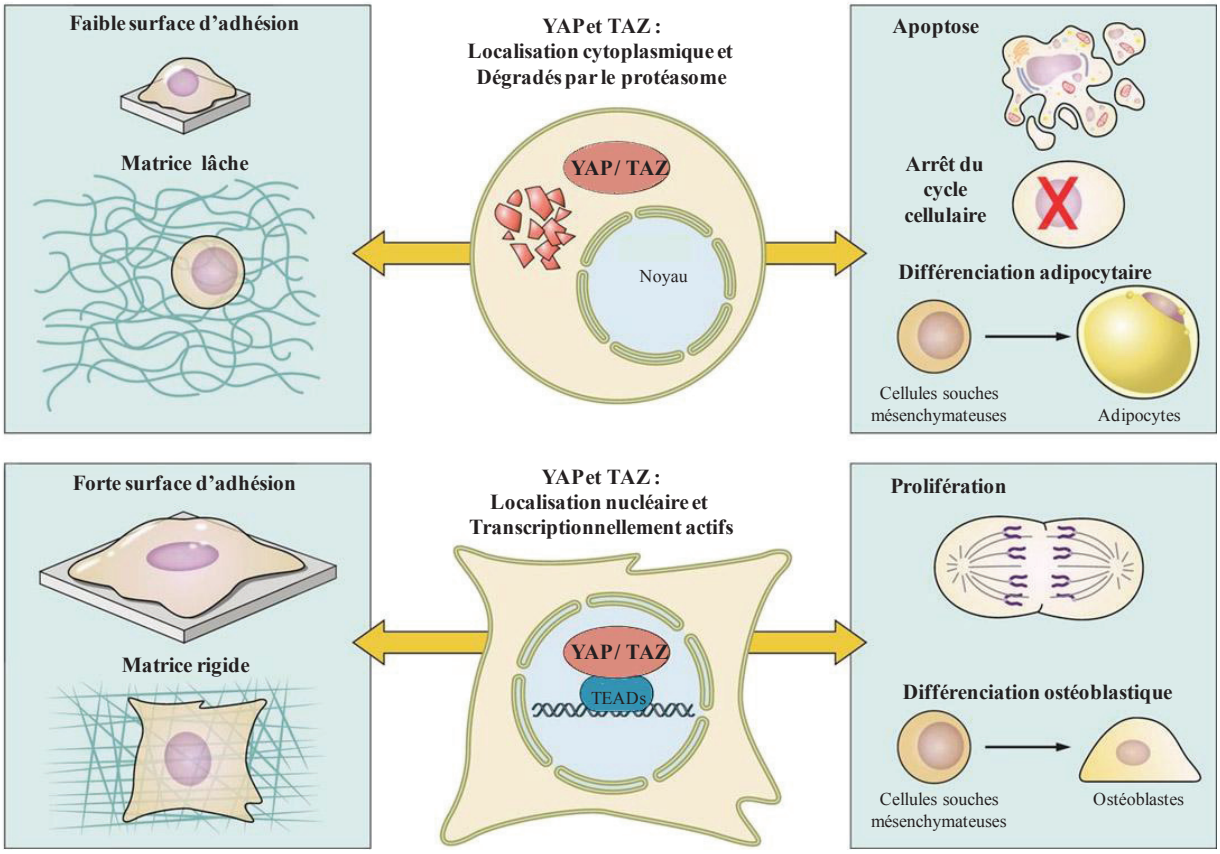


Figure 12 : Implication de YAP / TAZ dans la différenciation ostéoblastique

L'activation transcriptionnelle de YAP / TAZ permet d'induire la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses [168]

L'activation de la voie de signalisation Hippo par des RTK se fait par une cascade de phosphorylations et aboutit à l'inactivation et la translocation cytoplasmique des facteurs de transcription YAP et TAZ.

Lorsque la voie Hippo est inactivée, YAP et TAZ sont déphosphorylées et transloquent dans le noyau où elles induisent la transcription de gènes cibles notamment impliqués dans la survie, la prolifération cellulaire ainsi que dans l'auto renouvellement des cellules [172–174]. La dérégulation de la voie Hippo de part son rôle dans la différentiation ostéoblastique est impliquée dans le processus tumorigenèse de l'ostéosarcome. Il a été montré dans la lignée d'ostéosarcome MG63 que l'inhibition de YAP par KO entrainait une inactivation de la cycline D1 se traduisant par une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, cette lignée cellulaire déficiente pour YAP présente un potentiel invasif diminué due à la réduction de la production de MMP9, impliquée dans la dégradation de la matrice et donc de l'envahissement métastatique [174].

c. Marqueurs moléculaires pronostics dans l'ostéosarcome

Aujourd'hui, le facteur pronostique majeur de l'ostéosarcome reste la réponse aux chimiothérapies. D'autres facteurs cliniques tels que la présence de métastases au diagnostic sont aussi des éléments pronostiques [3]. La qualité de la résection chirurgicale est également un élément de pronostic : des études ont montré que des marges de résection supérieure à 2 mm sont associées à une mauvaise survie globale [175,176].

En plus de ces facteurs cliniques, le niveau d'expression de certains gènes apparait comme étant des éléments pronostiques. Une forte expression du facteur de transcription Runx2 impliqué dans la différenciation ostéoblastique est significativement liée à un risque métastatique plus important [177]. L'expression de la P-gp, impliquée dans la chimiorésistance, est aussi considérée comme un marqueur pronostique prometteur. En effet, il a été montré dans une cohorte de 94 ostéosarcomes que l'expression accrue de P-gp était liée à une mauvaise réponse aux traitements et une survie réduite des patients [109]. Une forte expression de CCN3, protéine impliquée dans la différenciation des chondrocytes et l'ossification endochondrale [178], dans le tissu tumoral est significativement corrélée à un mauvais pronostic dans l'ostéosarcome [179]. L'altération génomique conduisant à la perte de Rb est elle aussi associée à un mauvais pronostic de la tumeur [88,180].

L'ostéosarcome reste une tumeur complexe où de nombreuses altérations moléculaires sont retrouvées, activent la prolifération et rendent la tumeur résistante aux traitements conventionnels. L'identification de facteurs pronostiques de la réponse aux traitements permet une médecine plus personnalisée pour la prise en charge de cette tumeur.

II- Traitements de l'ostéosarcome

De nos jours, le traitement de l'ostéosarcome comprend une résection monobloc de la tumeur associée à une polychimiothérapie pré et post-opératoire. Si l'introduction des chimiothérapies a fortement amélioré la survie des patients [181–183], la chirurgie reste indispensable pour maintenir le contrôle local de la tumeur. Ce traitement pluridisciplinaire permet d'obtenir une survie à cinq ans proche de 70 % pour les patients présentant une tumeur non métastatique.

1. La chirurgie de l'ostéosarcome

a. Résection de la tumeur primaire

Les ostéosarcomes touchant majoritairement une population jeune, la procédure chirurgicale se veut au maximum conservatrice, elle doit permettre le maintien de la fonction du membre ou permettre sa reconstruction et doit minimiser la morbidité liée à l'acte chirurgical [184]. La résection de la tumeur doit permettre d'obtenir un retrait en bloc complet de la lésion maligne et du trajet de biopsie avec des marges adéquates dans les tissus sains environnants [185]. Avant toute chirurgie, un bilan d'extension loco-régional de la tumeur est réalisé afin de connaitre avec précision la localisation de la tumeur, ses extensions dans les tissus environnants et dans l'os par IRM et scanner. Cette imagerie pré-opératoire permet au chirurgien de planifier au mieux la résection tumorale. La qualité de la résection tumorale est un facteur pronostique de l'ostéosarcome. Une résection dont les marges sont supérieures à 2 mm est corrélée à une diminution de la récidive locale[175,176]. La qualité de la chirurgie est fonction des marges de résection. On distingue à l'heure actuelle trois niveaux de résection : R0, R1 et R2. Une résection R0 indique une résection en marges saines (aucune tumeur microscopique n'est détectable à la surface encrée de la pièce opératoire lors de l'analyse histologique). Une résection R1 indique la présence de résidus tumoraux microscopiques à la marge encrée de la pièce opératoire et une résection R2 indique la détection de résidu macroscopique à la marge encrée.

De nombreuses améliorations techniques permettent de limiter la morbidité liée à l'acte chirurgical et facilitent le geste du chirurgien. On peut notamment citer la conception d'un gabarit personnalisé en 3D réalisé à partir d'analyses de CT ou d'IRM pré-opératoires. Ce gabarit peut être conçu pour guider le chemin des outils de coupe chirurgicaux, ce qui permet au chirurgien de reproduire exactement un plan pré-opératoire idéal [186,187].

Des techniques de chirurgie assistée par imagerie pré-opératoire ont pour but de permettre au chirurgien de visualiser en temps réel les limites tumorales. Dans le cas de l'ostéosarcome, une étude préclinique a montré la faisabilité de ce guidage chirurgical dans un modèle d'ostéosarcome de rat. Le traceur utilisé, couplé à une sonde détectable dans le proche infrarouge, ciblait l'intégrine $\alpha v\beta 3$ surexprimée dans la tumeur par rapport au tissu sain environnant. L'utilisation de cette technique de chirurgie guidée permet un meilleur contrôle des marges de résection ainsi qu'une meilleure détection des métastases pulmonaires [188].

Après la résection de la tumeur primaire, une reconstruction osseuse peut être pratiquée soit par autogreffe dont le greffon provient d'un fragment d'os du patient lui-même soit par allogreffe osseuse dans ce cas le greffon provient d'une banque de tissus. Des greffes osseuses vascularisées sont aussi réalisées : le péroné est greffé avec son réseau sanguin qui est ensuite connecté à celui déjà présent [189].

b. Métastasectomie

Plus de 30 % des patients avec une tumeur localisée lors du diagnostic vont développer des métastases et 20 % des patients présentent des métastases pulmonaires au diagnostic de la tumeur primaire. Le traitement de ces métastases pulmonaires est chirurgical [190]. La réalisation de la métastasectomie dépend de l'accessibilité de la lésion, de l'état général du patient, du contrôle initial de la tumeur et de l'absence d'autres métastases extra thoraciques [191]. Plusieurs études ont montré que la métastasectomie permet d'améliorer la survie des patients qui passe de 10 % à 2 ans en cas de traitement local à 30% avec la métastasectomie [192].

La chirurgie est complétée par des régimes de chimiothérapies pré et post-opératoire.

2. Les chimiothérapies de l'ostéosarcome

L'introduction des chimiothérapies dans les années 1970 a permis d'améliorer significativement la survie des patients atteints d'ostéosarcome. Ces agents ont fait passer le taux de survie à 5 ans de 10 à 20 % avec une chirurgie seule, à environ 70 % en combinant les deux [34,193]. La chimiothérapie pré-opératoire contrôle localement la tumeur et permet un acte chirurgical moins invasif. Son rôle est aussi d'éradiquer les micro-métastases présentes au diagnostic mais non détectables chez la plupart des patients [194]. La chimiothérapie post-opératoire prévient la rechute locale et métastatique de la tumeur. Ce régime est adapté à la réponse tumorale à la chimiothérapie pré-opératoire.

Aujourd'hui, les trois chimiothérapies qui composent principalement les chimiothérapies pré-opératoires sont : la doxorubicine (ou adryamycine), le cisplatine et le méthotréxate haute dose. Ce régime est désigné par le nom de MAP. Chacune de ces chimiothérapies possède un mode d'action différent. Le méthotréxate est un inhibiteur de la

dihydrofolate synthase limitant la synthèse des thymidines [195] et donc sur la synthèse *de novo* des acides nucléiques. La doxorubicine est un agent interacalant qui inhibe le désenroulement des brins d'ADN [181,196]. Le cisplatine est un agent alkylant induisant la formation de ponts inter et intra-brins dans l'ADN. A cette combinaison peut parfois s'ajouter de l'ifosfamide [96], agent alkylant capable de former des ponts entre les différents brins d'ADN [197]. Les schémas d'administration de ces chimiothérapies sont présentés dans le tableau 2.

<table>
<tr><th></th><th>Méthotréxate [195]</th><th>Doxorubicine [181,196]</th><th>Cisplatine [197]</th><th>Ifosfamide [197]</th></tr>
<tr><td>Mode d'action</td><td>inhibiteur de dihydrofolate réductase; enzyme clé de la synthèse de la thymidine</td><td>Agent intercalant inhibiteur des topoïsomerases de type II</td><td>Agent alkylant induisant des ponts intra et inter-brins dans l'ADN</td><td>Agent alkylant induisant des ponts inter-brins de l'ADN en se fixant sur les guanines</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Administration</td><td>Jeunes patients</td><td rowspan="2">Cure de
50 à 90 mg/m²</td><td>Admnistration séquentielle</td><td rowspan="2">Cure de
8 à 12 g/m²</td></tr>
<tr><td>Forte dose
(> à 100 mg/m²)</td><td>Cure de
80 à 120 mg/m²</td></tr>
<tr><td>Effets secondaires et prévention</td><td>Toxicité rénale et neurologique</td><td>Toxicité hématologique, néphrologique</td><td>Toxicité hématologie, néphrologique, neurologie, auditive</td><td>Toxicité hématologie, néphrologique, neurologie, alopecie</td></tr>
</table>

Tableau 2 : propriétés des chimiothérapies utilisées pour le traitement de l'ostéosarcome

L'utilisation de la chimiothérapie pré-opératoire est devenue l'approche standard du traitement de l'ostéosarcome dans les années 1970. La réponse tumorale à la chimiothérapie pré-opératoire est appréciée par le pourcentage de nécrose retrouvée dans la pièce résection (grade de HUVOS) (Tableau 3).

Grade	Pourcentage de nécrose	Réponse à la chimiothérapie
1	< 50	Mauvaise
2	50 à 95	Partielle - Mauvaise
3	95 à 100	Bonne
4	100	Bonne

Tableau 3 : Grade de HUVOS

Selon le pourcentage de nécrose induite par la chimiothérapie 4 grades de réponses sont définis de 1 (mauvais répondeur) à 4 (bon répondeur)

Une nécrose tumorale induite par la chimiothérapie supérieure à 90 - 95 % permet de classer le patient en bon répondeur et de lui administrer le même régime de chimiothérapie en post-opératoire. Seulement 30 % des patients sont bons répondeurs à la première ligne de traitement. Les patients mauvais répondeurs ou présentant une réponse partielle (*i.e*. dont les tumeurs présentent moins de 90 % de nécrose) voient leur régime de chimiothérapie post-opératoire réadapté [34,96]. En outre, l'IRM peut également être utilisée pour prédire la réponse tumorale histologique à la chimiothérapie pré-opératoire. Cette réponse peut aussi être prédite par la tomographie (TEP/CT) en cours de traitement et permet de réadapter plus précocement la chimiothérapie [198]. Malgré tout, la réponse tumorale reste appréciée sur la pièce de résection et le régime de chimiothérapie post -pératoire n'est défini qu'à ce moment là.

Des travaux ont été menés afin de déterminer l'impact de l'intensification des chimiothérapies sur l'amélioration de la qualité de vie et de la survie de patients lors de la prise en charge de l'ostéosarcome. Aucune relation entre l'intensité de la chimiothérapie et le pronostic n'a été trouvée par rapport aux quatre agents inclus dans l'analyse : le méthotrexate, le cisplatine, la doxorubicine et l'ifosfamide [199]. Une analyse rétrospective sur plus de 900 patients n'a pas permis de mettre en évidence de relation entre l'intensification de la chimiothérapie et le pronostic des patients. L'administration de doses plus intenses de chimiothérapies ne permet pas d'augmenter la survie sans évènement et la survie globales des patients [199].

Si la chimiothérapie est le traitement de référence pour l'ostéosarcome, la radiothérapie peut également être utilisée.

3. La radiothérapie de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome a été longtemps considéré comme une tumeur radiorésistante nécessitant l'utilisation de forte de doses de radiations allant jusqu'à 50 Gy (Gray) [200]. Malgré cette résistance aux radiations de l'ostéosarcome, la radiothérapie peut s'avérer nécessaire dans certains cas comme pour des patients traités par polychimiothérapie mais dont une résection complète de la tumeur n'est pas envisageable [201]. Dans ces cas la radiothérapie permet d'assurer un contrôle local de la tumeur et est actuellement indiquée à visée palliative [202–204].

Depuis les années 1970, la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome a beaucoup évolué et a permis d'améliorer le pronostic des patients. Cependant, les tumeurs développent des mécanismes de résistance aux traitements conventionnels. De nombreuses études précliniques et cliniques sont en cours afin d'améliorer l'efficacité des traitements actuels. Dans la prochaine partie nous allons mettre l'accent sur certains de ces travaux ciblant notamment l'environnement de l'ostéosarcome.

4. Nouvelles approches thérapeutiques pour l'ostéosarcome

Les ostéosarcomes sont des sarcomes à génomique complexe. En effet cette tumeur est caractérisée par un caryotype complexe, la présence de nombreuses variations structurales, des variations du nombre de chromosomes ainsi que de fréquentes altérations génomiques et une instabilité du génome. Comme nous l'avons évoqué dans les précédents paragraphes, toutes ces altérations conduisent à la mise en place des mécanismes de résistance aux approches thérapeutiques conventionnelles par les cellules tumorales. Face à cette difficulté, de nouvelles approches thérapeutiques sont étudiées pour contourner ces mécanismes de résistance et cibler des voies de signalisations essentielles à la cellule tumorale. Au cours des quinze dernières années avec l'avancée des connaissances moléculaires sur les voies de signalisation mutées, de nombreuses thérapies ciblées ont été développées et testées. Devant leur multiplicité, nous n'aborderons que certaines d'entre elle dans ce chapitre qui leur est consacré.

a. Chimiorésistance

Nous avons rappelé précédemment que la chimiorésistance des cellules d'ostéosarcome est due notamment à la surexpression de la pompe à efflux P-gp codée par le gène MDR1. Différentes stratégies ont été évaluée pour inhiber l'activation de cette pompe à efflux notamment par l'utilisation de siRNA spécifique de MDR1 ou de la cyclosporine A.

La cyclosporine A, qui est connue pour être un inhibiteur de la calréticuline, est également un substrat de P-gp [205]. L'inhibition de MDR1 par ajout de cyclosporine A, qui agit comme un substrat de P-gp permet de réinduire une mort cellulaire après traitement par Dox dans des lignées cellulaires qui n'étaient plus sensibles à la chimiothérapie [206]. L'inactivation du gène de MDR1 par siRNA a permis *in vitro* de restaurer la chimiosensibilité dans des lignées d'ostéosarcomes (KHOS et MNNG/HOS). L'inhibition de MDR1 par les SiRNA a permis de réduire les IC50 des chimiothérapies testées (Dox et MTX) et a résulté en une inhibition de plus de 80 % de la prolifération de ces lignées cellulaires [207,208]. De plus, une accumulation de doxorubicine dans le cytoplasme et le noyau des cellules initialement chimiorésistantes a été observée [208].

b. Ciblage des voies de signalisation mutées de l'ostéosarcome

Comme nous l'avons décrit précédemment, certaines mutations et certaines voies de signalisation mutées dans l'ostéosarcome jouent un rôle dans la tumorigenèse et la dissémination métastatique de la tumeur. Ces voies de signalisation représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour l'ostéosarcome et diverses approches ont été testées.

- Ciblage de l'IGF-1R

Nous avons rappelé l'implication la voie IGFR dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome. Le blocage de cette voie de signalisation à l'aide d'un miRNA ciblant entre autre cette voie, réinduit l'apoptose, limite la prolifération et le caractère invasif des lignées d'ostéosarcomes humains Saos-2, MG63, U2OS, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans des modèles de xénogreffes murines [167,209].

Une autre approche ciblant IGF1R a montré des résultats intéressants dans ces capacités à restaurer l'apoptose des cellules d'ostéosarcome. La combinaison de la Dox et de la

chimaphiline, un inhibiteur de IGF-1R, permet de restaurer l'apoptose de cellules chimioresistantes [210] et de réinduire la chimiosensibilité des cellules. La forte expression de l'IGF-1R par les cellules d'ostéosarcome en fait une cible intéressante pour le traitement par radioimmunothérapie. Cette approche, qui n'a pas pour but de rétablir l'apoptose, est basée sur le couplage d'un isotope radioactif à un anticorps ciblant un antigène exprimé par les cellules tumorales. La liaison anticorps / antigène permet l'internalisation de l'isotope radioactif spécifiquement dans les cellules tumorales dont il induira la mort. Dans le cas de l'IGF1R, un anticorps monoclonal anti IGF-2R a été couplé à ^{188}Rhenium et a montré une capacité à induire une diminution de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome [211].

- Ciblage de la voie Wnt / β-Caténine

La voie Wnt / β-Caténine est impliquée à la fois dans l'échappement à l'apoptose et dans l'homéostasie osseuse, son ciblage permet alors d'agir sur deux mécanismes cellulaires différents. La modification de lignées d'ostéosarcome, pour qu'elles expriment un récepteur LRP5 non fonctionnel, entraine *in vitro* une diminution de leur capacité à former des colonies et une perte de la capacité migratoire. *In vivo*, ces cellules présentent des capacités moindre à former des tumeurs que les cellules exprimant le récepteur LRP5 fonctionnel : lors de la xénogreffe des cellules déficientes pour LRP5, une forte diminution de la croissance tumorale ($p=0.014$) ainsi qu'une réduction de l'envahissement métastatique ($p=0.0048$) [212] sont obsevées.

Dans les ostéosarcomes, une hyperméthylation du promoteur d'un inhibiteur de Wnt (Wif-1) a été retrouvée[213]. L'activation de la transcription Wif-1 induirait alors la production de ce facteur sécrété et permettrait l'inhibition de la voie. Dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome le traitement par cet inhibiteur de Wnt a permis de ralentir la croissance tumorale et la dissémination métastatique de 70 % et 90 % respectivement par rapport au groupe contrôle [214].

- MDM2 et P53

P53 et MDM2 sont des protéines clés du cycle cellulaire dont l'expression est altérée dans l'ostéosarcome. Différents travaux mettent en avant l'effet anti-tumoral de l'interférence entre MDM2 et P53, dans des modèles d'ostéosarcomes murins par l'administration d'inhibiteur comme la nutline et le RG7112. Des inhibiteurs de l'interaction entre P53 et MDM2 ont alors été synthétisés. L'inhibiteur RG7112 stabilise et restaure la fonction de P53 dans les cellules cancéreuses *in vitro*. Dans des modèles de xénogreffes d'ostéosarcome murin, le RG7112 administré par voie orale induit une diminution de 70 % de la croissance tumorale et restaure l'apoptose des cellules tumorales [215]. Des résultats similaires sont obtenus dans des modèles de xénogreffes murines d'ostéosarcome avec la Nutline 3 ou avec d'autres inhibiteurs de l'interaction MDM2 et P53 [216,217]. La Nutline 3 est une petite molécule inhibant la fixation de MDM2 sur P53, elle permet d'induire l'apoptose des cellules tumorales dans des modèles d'ostéosarcome *in vitro* et *in vivo* [218].

- Protéines de la famille Bcl-2

Les protéines anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 sont impliquées dans l'inhibition de la mort cellulaire en prévenant le relargage du cytochrome C, la permabilisation de la membrane mitochondriale et entraine la prolifération des cellules tumorales. Dans l'ostéosarcome, la protéine anti-apoptotique Bcl-xl, est surexprimée. Si cette surexpression n'a pas de valeur pronostique, elle offre toutefois la possibilité de cibler spécifiquement cet effecteur de l'apoptose. Des études *in vitro* ont montré que l'inhibition de Bcl-xl, médiée par un ShRNA, améliore considérablement la chimiosensibilité ou la radiosensibilité des cellules d'ostéosarcome. Cette diminution de l'expression de Bcl-xl dans ces cellules est associée à une augmentation de l'activité caspase 3, indicateur précoce du déclenchement de l'apoptose [135].

Différentes molécules ciblant les protéines de la famille Bcl2 ont été développées : les BH3 mimétiques agissent en ré-induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Des études pré cliniques mettent en avant le regain de chimio-sensibilité de lignées d'ostéosarcome traitées avec l'ABT-737 (Abbot). Une activation des caspases est alors observée dans les cellules et induit ensuite leur apoptose [219]. Ces molécules ont ensuite été testées dans différents modèles

pré-cliniques dont des modèles d'ostéosarcome murins, dans lesquels il n'a pas montré d'efficacité anti-tumorale [220].

c. Ciblage de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est nécessaire à la progression tumorale et la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. Processus complexe, elle offre de nombreuses cibles potentielles pour des thérapies. De nombreux agents et stratégies anti-angiogéniques ont été testés et nous présenterons ici que certains agents qui ont montré une activité anti-tumorale et anti-métastatique dans l'ostéosarcome.

Plusieurs inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF ont été développés comme un anticorps spécifique du VEGF A, le bévacizumab, qui prévient l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs VEGFR1 et 2, limitant ainsi l'initiation de l'angiogenèse. Différentes études montrent que dans des modèles de xénogreffes d'ostéosarcome, le bévacizumab induit un ralentissement de la progression tumorale et de l'envahissement métastatique [221,222].

Des résultats similaires ont été observés avec le Sorafenib, un inhibiteur multikinase, ciblant notamment les récepteurs VEGFR1, VEGFR2, dans des xénogreffes murines. Cet inhibiteur limite l'activation de la voie signalisation du VEGF et réduit alors leur activité pro-angiogenique. Administré dans un modèle de xénogreffe ostéosarcome (U2OS) il induit une réduction de la progression tumorale et une importante diminution de l'envahissement métastatique [223].

Transposé en clinique, le sorafenib n'a pas montré d'efficacité anti-tumorale accrue et n'a pas permis d'améliorer significativement le taux de survie des patients atteints d'ostéosarcomes [26].

D'autres agents ciblant des effecteurs différents impliqués de l'angiogenèse ont été testés dans des modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* [224,225,226] mais n'ont pas atteint ou dépassé le stade de l'évaluation préclinique.

Le ciblage de PDGFR, récepteur impliqué dans le développement vasculaire, à l'aide l'Imatinib ou le sunitinib des inhibiteurs multiples de RTK limitant leur activité a montré un effet anti-tumoral dans des modèles précliniques d'ostéosarcome murin. *In vitro* il inhibe la prolifération cellulaire de différentes lignées ostéosarcome en causant l'arrêt du cycle

cellulaire en phase G1. Dans des modèles murins, l'Imatinib induit le ralentissement de la croissance tumorale [227]. Par la suite, des essais cliniques de phase II n'ont mis en évidence aucune activité anti-tumoral de cet agent chez des patients atteints d'ostéosarcomes en rechute [228].

d. Environnement osseux

Le rôle de l'environnement osseux dans le développement de l'ostéosarcome et l'intérêt de son ciblage ont été démontrés dans plusieurs travaux. En effet la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes mènent à la formation de lésions osseuses et facilitent la dissémination métastatique de la tumeur. Tous ces acteurs de l'homéostasie osseuse représentent aujourd'hui une cible thérapeutique pour l'ostéosarcome.

L'acide zolédronique

L'acide zoledronique (ZOL) provoque l'apoptose des ostéoclastes inhibant alors la résorption osseuse. Dans des modèles précliniques d'ostéosarcomes murins, la combinaison d'une chimiothérapie au zoledronate, en limitant l'activité lytique des ostéoclastes, permet de prévenir la rechute tumorale et métastatique et améliore la survie des animaux [229,230]. Ces résultats prometteurs ont permis la mise en place d'un essai clinique sur 318 patients porteurs d'un ostéosarcome local ou métastatique (OS2006). La combinaison du ZOL à la chimiothérapie n'a pas permis d'améliorer la survie sans événement ainsi que la survie globale à 3 ans des patients en comparaison avec les patients n'ayant reçu que la chimiothérapie [231].

Ciblage de la voie du TGF-β

La voie de signalisation du TGF-β impliquée dans l'homéostasie osseuse représente une cible thérapeutique prometteuse. Le ciblage du TGF-β permet de limiter les différenciations ostéoblastique et ostéoclastique. L'halofuginone bloque la phosphorylation de Smad-3, un des récepteurs au TGF-β [232] et inhibe aussi l'action lytique des ostéoclastes. L'action anti-tumorale de l'halofuginone a été évaluée dans des essais précliniques menés dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome murin [232]. Ces travaux mettent en avant une importante

inhibition de la croissance tumorale chez les animaux ayant reçu l'halofuginone. Ce ralentissement de la progression tumorale est associé à des modifications du remodelage osseux comme la diminution de lésions osseuses induites par la suractivité des ostéoclastes. De plus, une diminution de l'envahissement métastatique pulmonaire est observée dans ce groupe d'animaux [233].

Inhibition de RANKL

La voie RANK / RANKL / ostéoprotégérine est impliquée dans l'homéostasie osseuse en intervenant lors de la différenciation des ostéoclastes. Dans l'ostéosarcome, la voie RANK/ RANKL favorise la dissémination métastatique [46,234] ; le denosumab, anticorps spécifique ciblant l'ostéoprotégérine permet d'inhiber la liaison de RANK et RANKL limitant la différenciation ostéoclastique. Dans des modèles d'ostéosarcome murins, le denosumab ralentit la croissance tumorale et améliore significativement la survie des animaux [43]. De plus, il réduit l'activité des ostéoclastes, donc les lésions osseuses liées à cette activité et limite la progression tumorale. L'efficacité anti-métastatique de l'inhibition de RANKL à l'aide du denosumab a aussi été démontrée dans des modèles précliniques de métastases osseuses [235,236]. Des essais cliniques de phase II évaluant l'efficacité du denosumab, pour le traitement de tumeurs et des métastases osseuses [237] ont été réalisés. Ils ont permis de montrer la capacité du dénosumab a ralentir l'apparition de métastases osseuses chez des patientes atteintes de cancers du sein métastastatiques [238]. Ces résultats sont prometteurs pour l'application du dénosumab dans le traitement des ostéosarcomes.

Si l'environnement osseux joue un rôle dans le développement de l'ostéosarcome, l'environnement immunitaire n'est pas à négliger et des approches d'immunothérapies sont en cours de développement.

e. Immunothérapies

Le ciblage de l'environnement immunitaire représente aujourd'hui un axe de recherche en plein développement. Les avancées en immunologie ont permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques [239] visant à exploiter la capacité du sytème immunitaire, inné comme adaptatif, à contenir la croissance des cellules tumorales. Certaines sont d'ores et déjà

utilisées dans le traitement des lymphomes, mélanomes, carcinomes [65,29,240]. L'immunothérapie des sarcomes est relativement moins avancée que pour d'autres tumeurs.

Pourtant, des observations cliniques ont montré que l'incidence des sarcomes est multipliée par 3 chez les patients immunodéprimés [241]. Ces données sont complétées par des études dans des modèles animaux impliquant le système immunitaire dans la prévention du développement de l'ostéosarcome [242]. De plus, l'ostéosarcome est un sarcome à génomique complexe [243] impliquant que des mutations apparaissent au cours de l'évolution tumorale créant de nouveaux épitopes, qui pourraient être reconnus par le système immunitaire. Enfin, dans le cas d'un ostéosarcome, un important infiltrat immunitaire a été mis en évidence au sein de la tumeur [244]. Des approches d'immunothérapie, incluant l'administration d'anticorps, de cytokines et des approches vaccinales génèrent beaucoup d'intérêt pour la recherche clinique des ostéosarcomes.

Parce qu'il est difficile d'identifier des antigènes tumoraux spécifiques de l'ostéosarcome, beaucoup de recherches se sont dirigées vers l'utilisation d'approches permettant d'augmenter la réponse immunitaire [245–247].

Le mifamutide, immunostimulant, est décrit pour induire la conversion des macrophages M2 anti-inflammatoire vers le phénotype M1 pro-inflammatoire. Son évaluation préclinique dans l'ostéosarcome canin, a montré les capacités de cet agent à améliorer la survie des animaux se traduisant par une survie globale des animaux grandement supérieure à celle du groupe contrôle. Chez l'homme, combiné à la chimiothérapie, le mifamurtide a permis d'améliorer significativement la survie à 6 ans des patients ayant un ostéosarcome de 70 % à 78 % ($P = 0.03$) [248,249]. Cet essai clinique (INT-0133) a permis au mifamurtide d'obtenir une autorisation d'utilisation dans le traitement des ostéosarcomes non métastatique en Europe.

Des études précliniques ont testé la combinaison du ZOL et du mifamurtide dans des modèles murins d'ostéosarcome. Ces études ont mis en évidence l'action synergique de ces deux composés ciblant l'un l'environnement osseux de l'ostéosarcome (ZOL) l'autre l'environnement immunitaire de la tumeur. L'ajout du mifamurtide au ZOL renforce l'effet anti-tumoral de ce dernier [250].

D'autres approches immunothérapies utilisant des inhibiteurs de check points immunitaires ou ciblant des antigènes tumoraux peuvent être envisagées pour l'ostéosarcome.

PD1/PDL1 est certainement à l'heure actuelle le check point immunitaire le plus étudié dans différents cancers [251]. Chez l'homme, l'infiltration de lymphocytes PD-L1$^+$ dans l'ostéosarcome a été rapportée dans une cohorte de 54 ostéosarcomes primaires. La présence de ces cellules est corrélée à une diminution de la survie à cinq ans (de 25 à 69.4 %) [252]. Dans un modèle d'ostéosarcome murin, le blocage de l'interaction PD1/PDL1 par un Ac spécifique permet de doubler la survie des animaux. De plus, cet Ac utilisé dans un modèle métastastique d'ostésarcome (injection de la lignée K7M2 par voie intraveineuse) permet de réduire l'envahissement pulmonaire [253]. Ces résultats prometteurs sont des arguments en faveur du ciblage du check point immunitaire PD-1/PD-L1 dans l'ostéosarcome. Aujourd'hui, des essais cliniques de phase II sont en cours chez des patients porteurs d'ostéosarcome utilisant des anticorps anti PD-1 (Pembrolizumab ou le Nivolumab) (NCT02301039 et NCT02304458). Les premiers résultats de ses études montrent une efficacité du traitement entrainant des réponses partielles et une stabilisation de la maladie après quatre cycles de traitements [254].

Dans ce paragraphe nous avons présenté quelques-unes des approches thérapeutiques différentes des régimes conventionnels de chimiothérapies développées pour ostéosarcome, certaines passées de la préclinique à évaluation clinique.

Le tableau 4 suivant synthétise différents essais cliniques évaluant ces thérapies pour l'ostéosarcome au cours des 10 dernières années.

	Agent	Mécanisme d'action	Clinique	Traitement	Patients	Résultats	Références
Syteme immunitaire	Mifamurtide (L-MTP-PE)	Conversion des macrophages M2 en M1	Clinique - Phase III	MAP + L-MTP-PE	Ostéosarcomes intra médullaires de haut grade	Amélioration survie des patients (p=0.03)	Meyers, 2008 / Chou 2009
				Chimiothérapies + L-MTP-PE	Ostéosarcomes métastatiques ou récurrents	Amélioration survie des patients	Anderson 2014
	INFα2b	Immunostimulateur	Clinique - Phase III	MAP + INFα2b	Ostéosarcomes de haut grade locaux ou métastatiques - Ages < 40 ans	Aucune différence significative entre MAP et MAP + INFα2b	Bielack, 2015
	Anticorps humanisé anti GD2 (hu3F8) + GM-CSF	Activation ADCC et recrutement macrophages	Clinique - Phase II	hu3F8 + GM-CSF	Ostéosarcomes récurrents	En cours	NCT02502786
Microenvironement osseux	Zolédronate	Inhibiteur de la résorption ostéoclastique osseuse	Clinique - Phase III	Chimiothérapies + Zolédronate	Ostéosarcomes de haut grade	Aucune amélioration survie des patients	Piperno Neumann, 2016
Potentialisation chimiothérapies	MAPIE	Agent alkylant	Clinique - Phase III	MAP + Ifosfamide + Etoposide	Ostéosarcomes de haut grade	Augmentation de la toxicité du traitement pas amélioration survie des patients	Marina, 2016
	Anti Folate (Pemetrexed)	Inhibiteur des enzymes de synthèse de l'ADN et des enzymes folate dépendantes	Clinique - Phase II	Administré en monothérapie	Ostéosarcomes de haut grade avancé et / ou métastatique	Aucune réponse aux traitements observée	Duffaud, 2012
	Chimiothérapies métronomiques (cyclophosphamide - methotrexate - sirolimus -zolédronate)	Administration plus fréquentes de doses plus faible de chimiothérapies	Clinique - Phase I	Sirolimus + administrations fréquentes de chimiothérapies	Ostéosarcomes de haut grade avancé	En cours	NCT02517918
Aberrations génétiques	Everolimus	Inhibiteur de mTORC1	Clinique - Phase I	Administré en monothérapie	Ostéosarcomes de haut grade	Pas de réponse objective	Fouladi, 2007
	Cixutumumab	Activation des voies PI3K/AKT et MAPK	Clinique - Phase II	Administré en monothérapie	Ostéosarcomes de haut grade	Médiane de survie sans progression 6 mois	Schwartz, 2012
	Imatinib mesylate	Inhibiteur PGDFR et c-KIT	Clinique - Phase II	Administré en monothérapie	Ostéosarcomes métastatiques ou récurrents - Age < 30 ans	Pas de réponse objective	Bond, 2008
	Everolimus + figitumumab	Inhibiteur de mTORC1 + IGF-1R	Clinique - Phase I	Everolimus + figitumumab	Ostéosarcomes de haut grade	Pas de toxicité des traitements - activité anti tumorale observée	Quek, 2011
	Lenvatinib	Inibiteur multiple de tyrosines kinases dont VEGF	Clinique - Phase I et II	Seul ou en combinaison avec chimiothérapie (Ifosfamide, etoposide)	Ostéosarcome - Age entre 2 et 25 ans	En cours	NCT02432274

Tableau 4 : Principaux essais cliniques menés au cours des 10 dernières années ciblant l'ostéosarcome et son microenvironnement à base de chimiothérapies et de nouveaux agents

Ainsi, le ciblage de l'environnement tumoral de l'ostéosarcome est de plus en plus exploré pour la future prise en charge des patients. Aujourd'hui les chimiothérapies sont au cœur de cette prise, des études sont menées pour améliorer leur efficacité en leur adjoignant des agents autres qui ciblent des voies cellulaires ou l'environnement. Nous allons aborder une nouvelle stratégie de traitement de l'ostéosarcome qui est basée sur la potentialisation de la chimiothérapie. Cette potentialisation de la chimiothérapie passe par la combinaison d'agents aux mécanismes d'action différents et complémentaires. C'est une telle combinaison que nous avons évalué dans le cadre de mon projet de doctorat : nous avons testé de renforcer

l'efficacité de Dox par un anticorps anti NTN1 (Ac aNTN1). Par cette combinaison nous avons souhaité réinduire la mort cellulaire grâce à l'effet cytotoxique de la chimiothérapie et par le blocage d'un facteur de survie qui est la NTN1

5. Combinaisons thérapeutiques à base de chimiothérapie

a. Les traitements combinés actuels

Aujourd'hui la chimiothérapie reste le traitement de base lors de la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome. Malgré le développement de nouvelles approches thérapeutiques, pour le moment aucun traitement novateur n'a montré une efficacité clinique suffisante pour remplacer les régimes de chimiothérapies. Le taux de survie des patients a été amélioré mais plafonne aujourd'hui entre 60 et 70 % depuis plusieurs dizaines d'années. De plus, ces traitements présentent plusieurs effets secondaires dus à leur non spécificité tissulaire, le manque de ciblage ou à l'acquisition de la chimiorésistance par les cellules tumorales. Pour limiter ces effets, la chimiothérapie est aujourd'hui combinée à de nouveaux agents. Que ces agents ciblent l'environnement osseux ou immunitaire, des voies de signalisation altérées dans l'ostéosarcome, le but est de renforcer et de potentialiser l'effet anti-tumoral et anti métastatique des chimiothérapies en attaquant la tumeur sur deux axes différents.

- Contourner la chimiorésistance

L'acquisition d'une chimiorésistance par les cellules tumorales au cours des traitements est observée chez les patients atteints d'ostéosarcome. Aujourd'hui de fortes doses de méthotrexate sont administrées couramment lors de la prise en charge de l'ostéosarcome. Cependant une augmentation des patients chimiorésistants est notée, due à une perte d'expression de la DHFR et est associé à une diminution de la survie des patients. Pour pallier à cette chimiorésistance, des agents anti folate comme le Premetrexed ont été développés. Un essai clinique a été mené chez des patients chimio résistants cependant même si la molécule semble bien tolérée aucune réponse majeure au traitement n'a été observée [255].

- Contourner la chimiorésistance au méthotrexate

Aujourd'hui de fortes doses de méthotrexate sont administrées couramment dans le traitement de l'ostéosarcome. Cependant une résistance due à une perte d'expression de la DHFR survient et est associé à une diminution de la survie des patients. Pour pallier à cette chimiorésistance, des agents anti folate comme le Pemetrexed sont utilisés. Une augmentation de l'apoptose et une réinduction de la sensibilité des cellules à la chimiothérapie est observée dans les lignées U2OS et MG63 après traitement au Pemetrexed [256]. Cet agent permet de ré induire la mort cellulaire en bloquant une enzyme de la synthèse *de novo* de l'ADN complémentaire à celle du MTX. Un essai clinique mené, a montré chez des patients atteints d'ostéosarcome à un stade avancé que si la molécule semble être bien tolérée elle n'induit aucune amélioration du traitement [255].

- Combinaison de la chimiothérapie et ciblage de l'environnement osseux

Le ciblage de l'environnement osseux combiné à la chimiothérapie montre des effets anti tumoraux intéressants. RANKL est un acteur de la différention, de l'activation et de la survie des ostéoclastes favorisant l'ostéolyse et la prolifération tumorale. Des études précliniques démontrent, dans un modèle d'ostéosarcome murin, l'effet potentialisateur d'un siRNA anti RANKL combiné à l'Ifosfamide. Un important retard de la croissance tumorale est observé chez les animaux traités avec l'iIfosfamide et le siRNA anti RANKL en comparaison avec le traitement conventionnel (ifosfamide) [257]. Chez l'homme la combinaison du denosumab, anticorps ciblant RANKL et la chimiothérapie conventionnelle augmente la survie sans métastase lors de la prise en charge de cancers du sein métastatique. Des effets prometteurs ont été observés dans le traitement des métastases osseuses [238].

- Combinaison de la chimiothérapie et ré-induction de l'apoptose

La ré-induction de la mort cellulaire et de l'apoptose peut compléter l'action cytotoxique des chimiothérapies conventionnelles. Plusieurs agents visant à restaurer ces différentes voies de mort cellulaire peuvent être utilisés

Dans le paragraphe s'intéressant aux principales voies de signalisation altérés dans l'ostéosarcome, nous avons présenté l'implication de YAP / TAZ dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome. Des études *in vitro* réalisées sur des lignées cellulaires d'ostéosarcome ont montré que la combinaison chimiothérapie à une extinction de YAP, par transfection de shRNA anti YAP permettait de restaurer l'apoptose [174].

Combiner la cytotoxicité des agents conventionnels avec une approche restaurant l'apoptose semble une stratégie intéressante pour le traitement de l'ostéosarcome, nous avons étudié une telle approche dans ces travaux. Le couplage de la chimiothérapie à une stratégie bloquant l'interaction NTN1 avec ses récepteurs permet de restaurer la mort cellulaire dans des lignées tumorales [258–260]. L'interférence de la NTN1 semble d'autant plus pertinente que cette protéine est impliquée dans d'autres processus retrouvés dans la tumorigenèse de l'ostéosarcome : la migration cellulaire, l'angiogenèse, le recrutement et la polarisation d'effecteurs de l'immunité. Dans le prochain paragraphe nous allons présenter plus en détail la NTN1, ses rôles dans la tumorigenèse et l'impact de son blocage dans d'autres modèles tumoraux.

b. La nétrine 1 (NTN1) : un facteur de survie à cibler dans la tumorigenèse

La Nétrine 1 et ses récepteurs

La Netrine 1 (NTN1) a été découverte pour son implication dans le chimiotaxisme axonal durant le développement de la corde spinale des vertébrés grâce à sa liaison aux récepteurs transmembranaires DCC (deleted in colorectal carcinoma), et à la famille UNC5H [261,262]. Chez l'adulte, la NTN1 et ses récepteurs sont présents de façon ubiquitaire dans les différents tissus et sont exprimés à un niveau basal [263]. La NTN1 est aussi impliquée dans d'autres processus biologiques comme l'angiogenèse [264–266], le recrutement de populations immunitaires [267], mais aussi dans la tumorigenèse [260,268,269]. L'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs à dépendance DCC et la famille UNC5H régule une induction de l'apoptose de manière dépendante à la présence de NTN1.

Aujourd'hui, une quinzaine de récepteurs compose la famille des récepteurs à dépendance (RD). Elle regroupe en autres les récepteurs à la NTN1 : DCC, UNC5H et

néogénine, p75NTR, Ptch1, Plexin-D1, des récepteurs à activité tyrosine kinase : TrkA, TrkC, MET et IGFR1, ou encore certaines intégrines [270–273] (Figure 13). L'appartenance à cette famille se fait par la capacité de ces récepteurs à induire la mort cellulaire en absence de leur ligand. Nous nous intéresserons par la suite aux récepteurs à la NTN1, DCC et UNC5H, ils sont aujourd'hui les plus étudiés dans les RD.

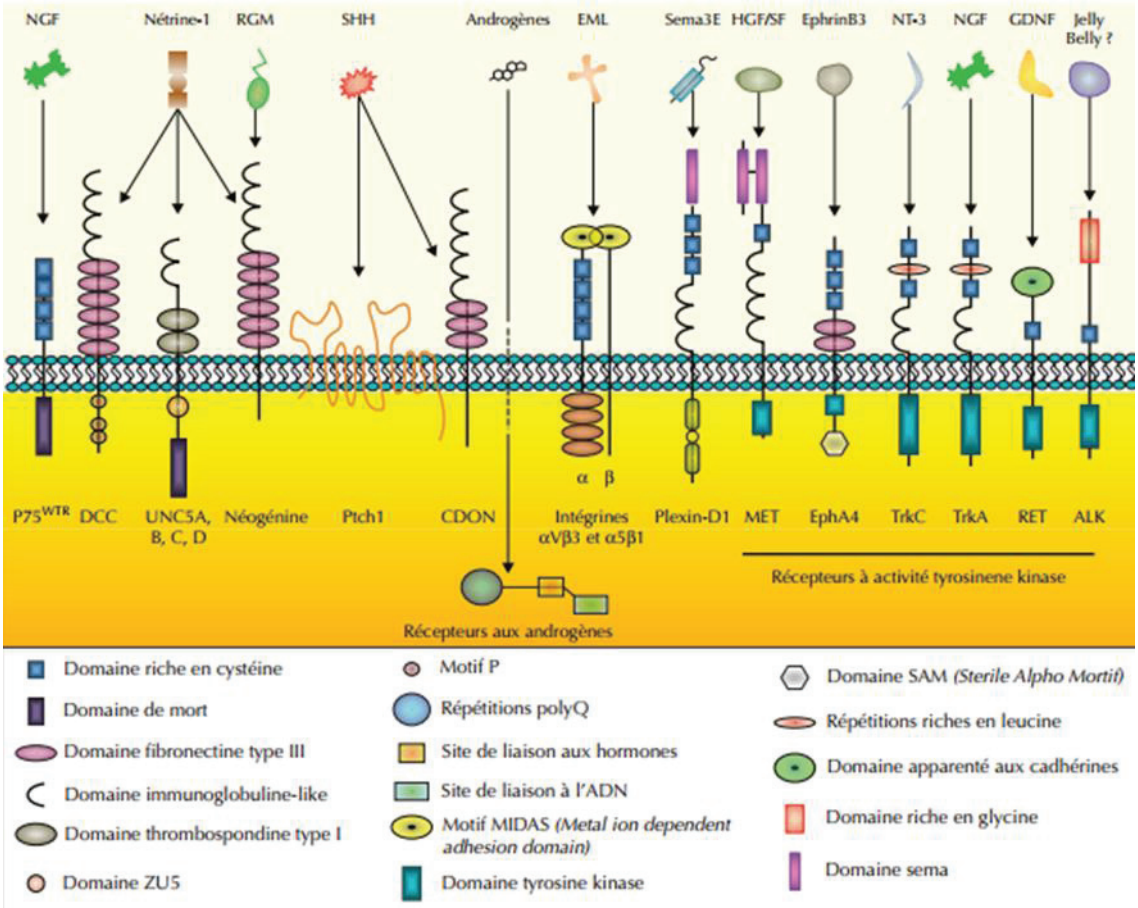


Figure 13 : Membres de la famille des récepteurs à dépendance

Les RD comprennent une quinzaine de membres dont les récepteurs à la NTN1, des RTK et des intégrines. Ils ont en commun la particularité d'induire la mort cellulaire en absence de leur ligand [274]

DCC est un récepteur transmembranaire dont la partie extracellulaire est composée de domaines semblables aux immunoglobulines et de fibronectine et dont la partie cytoplasmique comporte un domaine de mort [275]. La NTN1 se fixe à DCC via les domaines fibronectine présents sur la partie extracellulaire du récepteur [276,277]. Chez l'homme, au cours du développement, DCC est exprimé dans diverses régions du cerveau, mais également dans l'épithélium du tractus digestif, de la peau, des poumons, de la vessie ou de la prostate [278]. Chez l'adulte, DCC est faiblement exprimé de manière ubiquitaire [263].

Les récepteurs UNC5H sont des récepteurs transmembranaires et regroupent chez l'homme UNC5A, B, C et D. La partie extracellulaire de ces récepteurs comporte des domaines semblables aux immunoglobulines et des domaines thrombospondine. Un domaine de mort homologue à celui des récepteurs de mort classiques de la famille du TNF est quant à lui retrouvé dans la partie intracellulaire du récepteur. La fixation de la NTN1 sur cette famille de récepteurs se fait alors grâce aux domaines semblables aux immunoglobulines présents sur la partie extracellulaire des récepteurs [276,277,279]. Chez l'homme, l'expression de ces récepteurs est principalement retrouvée lors du développement du système nerveux central et périphérique : UNC5A et B sont exprimés au niveau de la moelle épinière, mais également au niveau de la rétine dorsale et le cervelet, avec UNC5C [280]. UNC5D est quant à lui exprimé dans le cortex somatosensoriel et les aires visuelles [281]. Chez l'adulte, les récepteurs UNC5H ont une expression assez ubiquitaire [263].

Différents processus cellulaires, tels que l'apoptose, l'angiogenèse ou le recrutmenet de cellules immunitaires sont induits par l'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs.

Implication de la NTN1 dans l'angiogenèse

Le rôle de la NTN1 dans l'angiogenèse reste controversé, certaines études lui conférant un rôle inhibiteur de l'angiogenèse alors que d'autres l'associent à un rôle pro-angiogénique.

Son rôle anti angiogénique est mis en avant des modèles murins déficient pour la NTN1 ou pour son récepteur UNC5B [264]. Ces animaux présentent en effet un excès de ramifications vasculaires au niveau des vaisseaux inter segmentaires le long de l'aorte dorsale traduisant une vascularisation immature et anarchique [282]. Son rôle pro-angiogénique est quant à lui démontré par sa capacité à induire *in vitro* la prolifération et la migration des cellules endothéliales et des cellules vasculaires du muscle lisse et *in vivo* à favoriser l'angiogenèse de modèles de membrane chorio-allantoique d'embryons de poulet [265]. L'action de la NTN1 dans l'angiogenèse n'est pas médiée ici uniquement par liaison DCC et UNC5H; mais également par son interaction avec CD146 exprimé par les cellules endothéliales [266]. Ce rôle ambivalent de la NTN1 dans l'angiogènese peut alors varier en fonction de sa concentration:

- Une faible concentration de NTN1 (50 ng/mL) serait associée à un potentiel pro-angiogénique

- Une forte concentration de NTN1 et sa liaison à UNC5B favoriserait une inhibition

NTN1 et recrutement des effecteurs de l'immunité

Dans le contexte très inflammatoire d'un modèle d'ischémie après transplantation cardiaque, l'administration de NTN1 recombinante par voie intraveineuse une heure avant la reperfusion favorise la création d'un environnement immunitaire plus tolérant composé de cellules et de cytokines anti-inflammatoires. Une diminution globale des cellules immunitaires pro-inflammatoire comme les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi qu'une polarisation des macrophages vers le phénotype M2 (anti-inflammatoire) sont observées en réponse à la NTN1 [267]. Cette polarisation des macrophages vers le phénotype M2 est également observée chez des souris transgéniques surexprimant NTN1.

Ces données suggèrent que la NTN1 est capable d'induire la polarisation des macrophages vers le phénotype M2, anti-inflammatoire. Ce phénotype macrophagique est pro-tumoral et est un marqueur de mauvais pronostic pour les sarcomes osseux [52,283].

Induction de l'apoptose médiée par la NTN1

Aujourd'hui il est admis que la NTN1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose par la voie de signalisation des récepteurs à dépendance (RD) [284]. Le nom de RD est donné à ces récepteurs en référence à leur capacité commune d'induire deux voies de signalisation antagoniste dont la mort cellulaire de manière dépendante de la présence ou à l'absence de leur ligand [284].

L'interaction de la NTN1 avec son récepteur induit une signalisation dite positive qui active la proliferation, la migration, survie cellulaire. L'activité chimiotatique de la NTN1 est principalement décrite pour permettre le guidage axonal [285,286]. Outre son implication dans la mise en place du système nerveux l'interaction NTN1 / RD facilite l'agrégation cellulaire lors la morphogenèse de la glade mammaire [287]. A l'inverse, l'absence d'interaction entre le récepteur et son ligand entraine une signalisation négative pour la cellule se traduisant par l'induction de l'apoptose [274,284] (Figure 14).

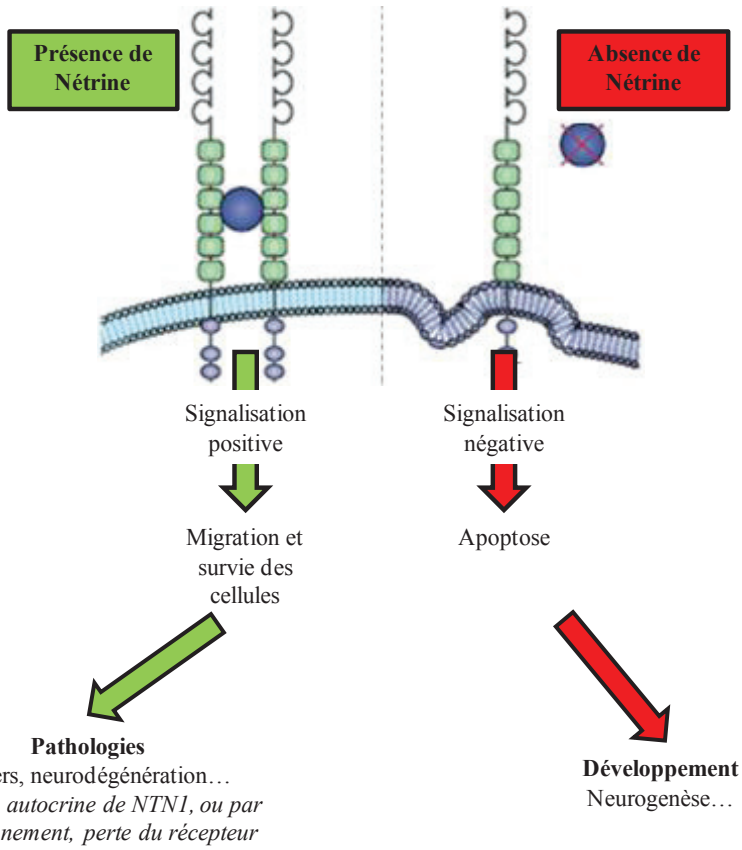


Figure 14 : Voie de signalisation des récepteurs à dépendance
La présence du ligand induit la survie de la cellule alors que son absence provoque son apoptose [274,288,289]

- Voie de signalisation positive induite par DCC et UNC5H

La voie de signalisation dite positive est majoritairement impliquée lors de l'embryogenèse lors de la mise en place de nombreux organes. Les voies de signalisation induite par l'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs DCC et UNC5B sont décrites dans les paragraphes suivants.

Signalisation positive induite par NTN1/DCC

En présence de NTN1,celle-ci ce lie à la partie extracellulaire de DCC, qui est alors dimerisée [290]. Dans cette conformation, la partie transmembranaire de DCC interagit avec la pro-caspase 3 mais ne permet pas son activation (Figure 15 A). La liaison entre la NTN1 et DCC est alors impliqué dans le guidage axonal : la NTN1 joue ici un rôle de chimioattractant qui attire les neurones comissuraux jusqu'à la ligne médiane. Cette attraction est médiée par la présence de DCC [291].

Signalisation positive induite par NTN1/UNC5B

En présence du ligand NTN1 soit en condition anti-apoptotique, UNC5B est homodimérisée et adopte une conformation intra-cytoplasmique «fermée». Dans cette conformation, DAPK1 et UNC5B interagissent via leurs domaines de mort respectifs, et sont capables de s'autophosphoryler pour se maintenir à l'état inactif. Cette phosphorylation de DAPK1 est assurée et maintenue par la protéine CIP2A (Cancerous Inhibitor of PP2A) et limite le recrutement de protéines susceptibles d'activer DAPK1 par déphosphorylation comme la PP2A (Protein Phosphatase 2A) [292,293] (Figure 15 B). De même un changement de conformation provoqué par l'absence de NTN1 permettra l'induction de l'apoptose médiée par UNC5B.

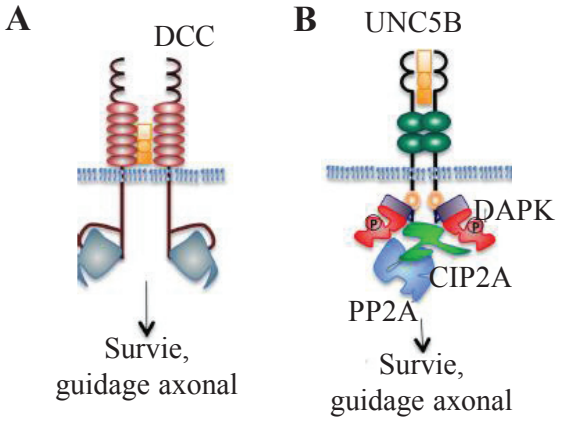


Figure 15 : Voies de signalisation positive induite par DCC et UNC5B
(A) DCC et (B) UNC5B se dimérise en présence de NTN1 et induisent tous les deux la survie cellulaire et le guidage axonal. Leurs domaines de mort respectifs sont rendu inactif par leur conformation fermée [288]

- Voie de signalisation négative induite par DCC et UNC5H

Signalisation négative induite par NTN1/DCC

L'absence de NTN1 cause un changement de conformation de DCC qui est alors sous forme de monomère. Dans cette conformation, la partie intracellulaire de DCC est clivée notamment par la capsase 3. DCC va alors recruter différents partenaires dont la protéine DIP13α et active la caspase 9, activant en cascade des caspases effectrices qui aboutit au déclenchement de l'apoptose. L'induction de l'apoptose par DCC, en absence de NTN1, ne passe par la voie canonique classique de l'apoptose [274,288] (Figure 16B). De plus, les interactions directes et indirectes entre DCC, DIP13α ou avec la caspase 9 restent aujourd'hui à éclaircir.

Signalisation négative induite par NTN1/UNC5B

En absence de NTN1, la voie pro-apoptotique d'UNC5B, fait intervenir DAPK1 (Death Associated Protein Kinase). De par son activité sérine-thréonine kinase, cette protéine intracellulaire est impliquée dans l'induction de mort cellulaire en réponse à un assez grand nombre de signaux apoptotiques [294]. En absence de NTN1, UNC5B reste sous forme monomérique, sa partie intracellulaire est clivée par des protéases, et démasque le domaine de mort, permettant la libération de CIP2A. PP2A est alors recrutée et va déphosphoryler DAPK1 par la rendant active. Une fois active, DAPK recrute à son tour d'autres partenaires pro-apoptotiques, conduisant à l'activation des caspases effectrices. Les caspases vont alors induire une boucle positive d'amplification du clivage des récepteurs, ce qui va amplifier le signal et finalement aboutir à un déclenchement de l'apoptose par bourgeonnement de la membrane cellulaire[295,296] (Figure 16B).

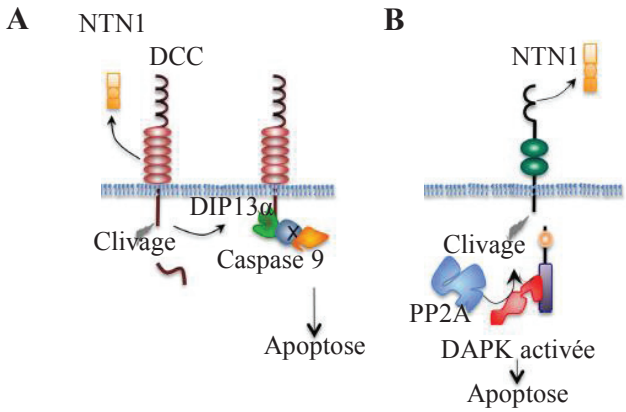


Figure 16 : Voies de signalisation négative induite par DCC et UNC5B
(A)Sous forme monomérique en absence de son ligand il recrut DIP13α et induit l'apoptose par l'activation de la capase 9. En Absence de NTN1, UNC5B se monomérise laissant ses domaines de mort accessibles et activables [288]

Ce mécanisme d'échappement à l'apoptose médiée par les RD est décrit dans de nombreux cancers comme le neuroblastome [297], le cancer du sein [298], le cancer du poumon non à petites cellules [299]. Cette absence d'induction de la voie de signalisation apoptotique se fait par perte des récepteurs par surexpression de la NTN1 par les cellules tumorales ou leur environnement[260]. La capacité de ces récepteurs à induire deux voies de signalisation antagonistes en fait une cible thérapeutique intéressante.

En effet une stratégie permettant de bloquer l'interaction ntn1 et ses récepteurs permettrait de la réinduction de la signalisation négative des récepteurs à dépendance et le déclenchement de l'apoptose. Ceci a été montré par les travaux de l'équipe de P Mehlen.

Le blocage de la NTN1 par SiRNA a permis de ré induire l'apoptose des cellules tumorales par induction de la capsase 3. Par ailleurs le blocage de l'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs à l'aide d'un Ac spécifique se traduit aussi par augmentation de la capase 3 dans des lignées de carcinomes pulmonaires et mammaires. Cette induction de la mort cellulaire par apoptose est renforcée lorsque l'interférence à la NTN1 par Ac aNTN1 ou SiRNA ANTN1 est associée à une chimiothérapie [258,298].

Comme nous l'avons décrit précédemment le ciblage de l'apoptose pour renforcer l'effet cytotoxique de la chimiothérapie est une approche thérapeutique intéressante pour la prise en charge de l'ostéosarcome.

c. Combinaison de l'Ac aNTN1 et de la chimiothérapie

Une nouvelle stratégie thérapeutique a été envisagée pour renforcer l'effet de la chimiothérapie : cette approche est basée sur le blocage de l'interaction de la NTN1 et de ses récepteurs pour potentialiser l'effet de la chimiothérapie et éviter l'acquisition d'une chimiorésistance.

Des travaux ont montré dans des lignées de cancer du sein, du poumon, du pancréas, de neuroblastome et des biopsies de cancer des ovaires que les chimiothérapies (5 Fluouracile, Cisplatine, Doxorubicine, Taxol) induisent une augmentation de l'expression de NTN1 . Cette augmentation de l'expression est totalement indépendante du caractère chimiorésistant des cellules. Les cellules répondent au stress induit par chimiothérapie par augmentation de la NTN1 qui s'avère alors être un mécanisme de survie puisqu'il permet à cellule tumorale de rester dans une signalisation positive et de proliférer [258].

Ces observations ont permis de construire la stratégie thérapeutique suivante : Administrer de manière concomitante la chimiothérapie augmentant l'expression de la NTN1 avec un agent bloquant l'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs pour réinduire la mort cellulaire et renforcer l'effet de chimiothérapie (Figure 17).

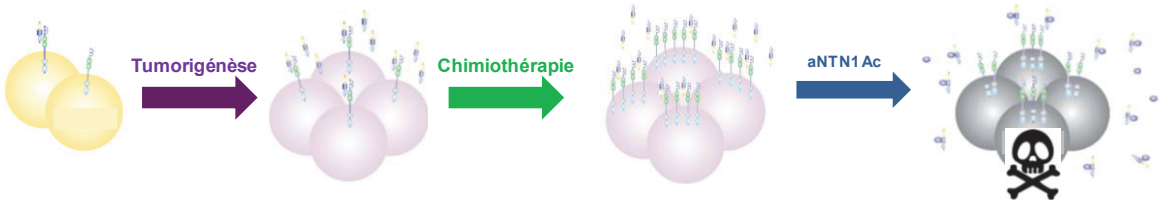


Figure 17 : Stratégie de combinaison de la NTN1 à la chimiothérapie pour réinduire la mort cellulaire

La chimiothérapie induit une augmentation de l'expression de NTN1 par les cellules tumorales. La combinaison de la chimiothérapie et d'un agent interférant avec la voie de RD permettrait de renforcer l'effet anti tumoral de la chimiothérapie [258,300].

Des essais menés dans différents modèles de xénogreffes murins (carcinome pulmonaire et mammaire) en associant la chimiothérapie (Doxorubicine ou Décitabine) à un anticorps anti NTN ont permis de montrer un ralentissement de la progression tumorale [258,298]. La combinaison de la chimiothérapie et de l'interférence avec la NTN1 révèle un potentiel anti-tumoral intéressant et prometteur pour des tumeurs chimiorésistantes comme les sarcomes.

Dans cette partie bibliographique nous avons montré que le traitement de l'ostéosarcome s'est amélioré grâce à l'avancée de la chirurgie orthopédique et à l'introduction puis à l'amélioration des régimes de chimiothérapies. Cependant aujourd'hui, l'efficacité des chimiothérapies atteint ses limites.

De nombreux essais cliniques ont évalué de nouvelles approches thérapeutiques ciblant soit les cellules tumorales soit l'environnement de l'ostéosarcome. Certains ont démontré une efficacité thérapeutique mais elle n'est pas suffisante pour se passer chimiothérapie. Il faut donc s'orienter pour le moment vers des combinaisons de chimiothérapies avec des agents ciblant des voies de signalisation rétablissant la mort cellulaire ou ciblant l'immunité. C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse ont été effectués et ont porté sur la combinaison d'une chimiothérapie combiné avec agent restaurant l'apoptose. Nous avons testé l'hypothèse de la potentialisation de la Doxorubicine par sa combinaison avec un anticorps anti NTN1 dans la prise en charge de l'ostéosarcome.

RATIONNEL DE L'ETUDE

Rationnel de l'étude

Les avancées technologiques, les connaissances accrues des voies de signalisation impliquées dans les processus de tumorigenèse ont permis d'améliorer les traitements des patients atteints d'ostéosarcome. On peut notamment citer l'évolution des techniques chirurgicales vers des méthodes moins invasives et guidées par imagerie pré-opératoire. Les chimiothérapies restent aujourd'hui la pierre angulaire de la prise en charge de l'ostéosarcome avec la chirurgie. Cependant la survie des patients présentant des métastases au diagnostic (20 % des cas) ou en récidive reste à améliorer. Des thérapies ciblées visant à inhiber spécifiquement des voies de signalisation sont développées et testées mais n'obtiennent pas toujours le succès escompté : la phase II de l'essai clinique mené sur l'imatinib ne met en avant aucun effet thérapeutique [228] malgré des résultats prometteurs lors des essais précliniques.

Dans ce contexte, le renforcement de l'efficacité des chimiothérapies en les combinant avec des thérapies ciblées tel que le bevacizumab ou le zoledronate est explorée. C'est une telle approche que nous avons exploré au cours de ce projet de recherche.

L'objectif de ce travail a été de tester la possibilité d'augmenter l'action anti-tumorale de la dox en la combinant à l'Ac aNTN1. Cet anticorps empêche l'interaction de la NTN1 avec ses récepteurs réactivant des voies de mort. La stratégie thérapeutique repose sur l'association d'un cytotoxique et d'une réinduction l'apoptose. Pour valider l'hypothèse nous avons utilisé à la fois des modèles cellulaires et animaux ainsi que des techniques moléculaires et immunologiques qui sont présentées dans la partie suivante.

MATERIELS & METHODES

Matériels et méthodes

I- Lignées et modèles cellulaires

1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées d'ostéosarcomes MNNG/HOS, MG63 et Saos-2 (ATCC, Manassas, VA, USA) ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère à 5 % de dioxyde de carbone (CO_2) dans du milieu de culture dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Life technologies, Carlsbad, Californie USA) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de l-glutamine, 100 U/ml de penicilline/streptomycine (Life technologies). Quand les cellules atteignent 90 % de confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du phosphate buffer saline (PBS), les cellules sont décollées par traitement à la trypsine / EDTA 0,05 % (Life technologies). Après un lavage au PBS les cellules sont réensemencées à la densité de 1500 cellules/cm² (pour les lignées MNNG/HOS et MG63) et 3500 cellules/cm^2 (pour la lignée Saos-2) dans du milieu DMEM complet en flask T75.

Les différents réactifs (Doxorubicine (Dox) et les anticorps (Ac Irr et Ac aNTN1)) utilisés dans les expérimentations *in vitro* sont référencés dans le tableau 5 ci-dessous.

	Concentration	Fournisseur
Dox	3,5 µM	Teva – Castleford - UK
Ac Irr	10 ng/mL	Netris Pharma – Lyon-France
Ac aNTN1	10 ng/mL	

Tableau 5 : Concentration de la chimiothérapie et des anticorps pour les modèles cellulaires
La concentration de Dox a été choisie en dessous de l'IC50 et les concentrations d'Ac sont suffisantes pour bloquer la production de NTN1 cellulaire [301]

2. Modèle de migration cellulaire

Un test de migration cellulaire a été réalisé sur la lignée d'ostéosarcome MNNG/HOS sur l'automate xCelligence ® (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Le système qui mime la chambre de Boyden permet de mesurer, en temps réel, la migration de cellules. Un

«chimio-attractant» est ajouté la chambre inférieure, afin de stimuler la migration des cellules de la chambre supérieure vers la chambre inférieure. La migration s'effectue à travers les micropores (d = 8µm) de la membrane séparant les 2 compartiments de culture. Les cellules migrantes vont faire varier l'impédance mesurée grâce à des électrodes d'or présentes sous la membrane poreuse. Une mesure d'impédance a été acquise toutes les 15 min durant toute la durée de l'expérimentation (Figure 18).

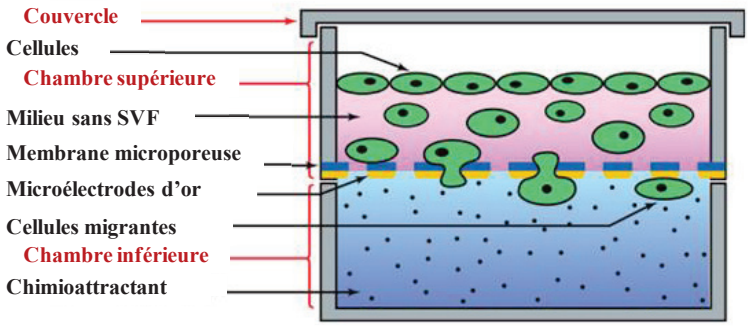


Figure 18 : Principe des tests de migration sur l'appareil de xCelligence

Le test de migration est basé sur le principe des chambres de Boyden : les cellules sont ensemencées dans la chambre supérieure, un chimio-attractant est placé dans la chambre inférieure pour induire leur migration. L'appareil de xCelligence permet de recueillir en temps réel la migration des cellules : des électrodes placées sous la membrane poreuse mesurent les variations d'impédance causées par le passage des cellules à travers la membrane.

Une étude de faisabilité a montré que sur les trois lignées d'ostéosarcome utilisées, seule la lignée MNNG/HOS avait des capacités migratoires intéressantes. Cette lignée a donc été utilisée pour les tests de migration.

Une phase de mise au point a permis de déterminer les conditions de migration optimales pour ces cellules : une densité d'ensemencement de 20 000 cellules par puits dans la chambre supérieure et la présence de milieu de culture supplémenté par 5 % SVF dans la chambre inférieure.

L'analyse de ses différentes conditions ont permis d'établir la condition optimale pour un test de migration : une densité cellulaire de 20 000 cellules par puits avec la chambre inférieure contenant du milieu DMEM supplémenté par 5 % SVF.

Dans ces conditions une migration des cellules est observée à partir de 10 h après ensemencement. Pendant la phase exponentielle de migration soit entre 10 et 30 h après ensemencement, la courbe de migration est une droite dont la pente est l'indice de migration

cellulaire. Un exemple de migration et de calcul d'index migration sont présentés dans la figure 19.

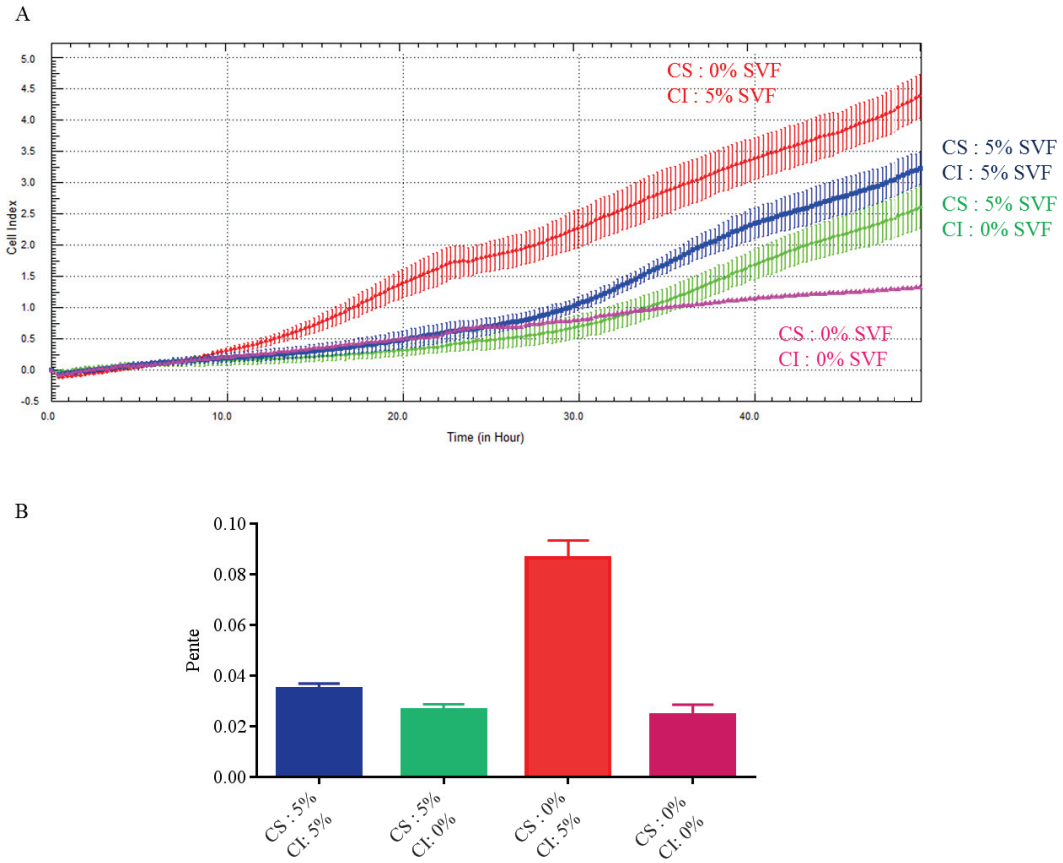


Figure 19 : Profil de migration des cellules MNNG/HOS en fonction du gradient de SVF

A) : profil type des courbes de migration permettant de calculer indice migration. (B) représentation graphique des indices de migration en fonction des différents gradients de SVF : Différentes combinaisons de gradient de SVF ont été testées pour induire la migration des cellules d'ostéosarcome MNNG/HOS ensemencées ici à 20 000 cellules/puits.

Les différentes conditions d'inhibition de la migration des cellules MNNG/HOS testées sont résumées dans le tableau 6 ci-dessous.

Conditions	Contenu chambre supérieure	Contenu chambre inferieure
Contrôle négatif de migration	MNNG/HOS DMEM sans SVF	DMEM sans SVF
Contrôle positif de migration	MNNG/HOS DMEM sans SVF	DMEM 5 % SVF
Ac Irr	MNNG/HOS DMEM sans SVF Ac Irr	DMEM 5 % SVF
Ac aNTN1	MNNG/HOS DMEM sans SVF Ac aNTN1	DMEM 5 % SVF
Chimiothérapie - Dox	MNNG/HOS DMEM sans SVF Dox	DMEM 5 % SVF
Dox + Ac Irr	MNNG/HOS DMEM sans SVF Dox + Ac Irr	DMEM 5 % SVF
Dox + Ac aNTN1	MNNG/HOS DMEM sans SVF Dox + Ac aNTN1	DMEM 5 % SVF

Tableau 6 : Conditions d'induction et d'inhibition de la migration des MNNG/HOS

Les cellules sont ensemencées dans la chambre supérieure en présence ou non des traitements ; le SVF notre chimioattractant est placé dans la chambre inférieure

II- Modèle de polarisation de macrophages *in vitro*

Nous avons souhaité évaluer les capacités de l'Ac aNTN1 à reverser le phénotype des macrophages M2 (anti-inflammatoire et pro-tumoral) vers un phénotype M1, pro-inflammatoire et anti-tumoral. Pour ce faire nous avons isolé de la moelle osseuse de rats sains et induit leur polarisation *in vitro*.

La moelle osseuse est extraite de fémurs de rats Sprague Dawley mâle sains âgés de 2 mois. Les fémurs sont récupérés stérilement, les extrémités des os sont coupées et la moelle

osseuse est poussée hors des futs osseux à l'aide de seringue contenant du PBS stérile. La moelle osseuse extraite est lavée et centrifugée en PBS (5 min ; 800 g), puis filtrée sur tamis cellulaire (d=45 µm) avant d'être de nouveau lavée en PBS (5 min ; 800 g) (Figure 20).

Les précurseurs monocytaires sont alors comptés et ensemencés à la densité de 4.10^6 cellules dans des boites de Pétri (d 10 cm) dans 10 mL de milieu de différenciation (milieu DMEM complet complété par 20 ng/mL de M-CSF (Bio Legend, Montigny-le-Bretonneux, France). Après trois jours de culture dans ces conditions, 5 ml de milieu de différenciation sont ajoutés à ces cellules en culture. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont décollés après sept jours de culture dans ces conditions, par addition de PBS /EDTA 2 mM (Figure 20), comptés et ensemencés à 10^5 cellules/puits de plaque 6 puits. La pureté des macrophages dérivés de la moelle osseuse est analysée par cytométrie de flux (BD FACSCalibur™, BD Biosciences) en utilisant des anticorps spécifiques des macrophages totaux et des phénotypes M1 et M2 avant d'être soumis à une étape de polarisation en macrophages de type M1 ou M2 (Tableau 7). (Figure 20)

	Marqueurs
Macrophages totaux	CD68-APC (Milteny Biotec)
Type M1	CD68-APC + CD86-PE (Milteny Biotec)
Type M2	CD68-APC + CD163-FITC (Biorad)

Tableau 7 : Anticorps spécifiques utilisés pour caractériser les macrophages totaux M1 et M2

La polarisation des macrophages vers le phénotype M1 est induit par stimulation à l'interferonγ (IFNγ) recombinant (20 ng/ml ; R&D System –Abingdon - UK) ou vers le phénotype M2 avec du TGF-β (20 ng/ml ; Promega – Charbonnières les Bains - France) durant 24 h dans le milieu de culture complet. A l'issue de cette stimulation le phénotype des

macrophages est analysé par cytométrie de flux en utilisant le panel d'anticorps présenté dans le tableau 7

Après validation des phénotypes, les macrophages sont mis en contact avec l'Ac aNTN1 (10 ng/ml) durant 24 h afin d'évaluer la capacité de cet Ac à induire une conversion des macrophages M2 en macrophages M1. Les populations macrophagiques obtenues au terme de cette culture sont phénotypées par FACS (FACSCalibur™) (Tableau 7).

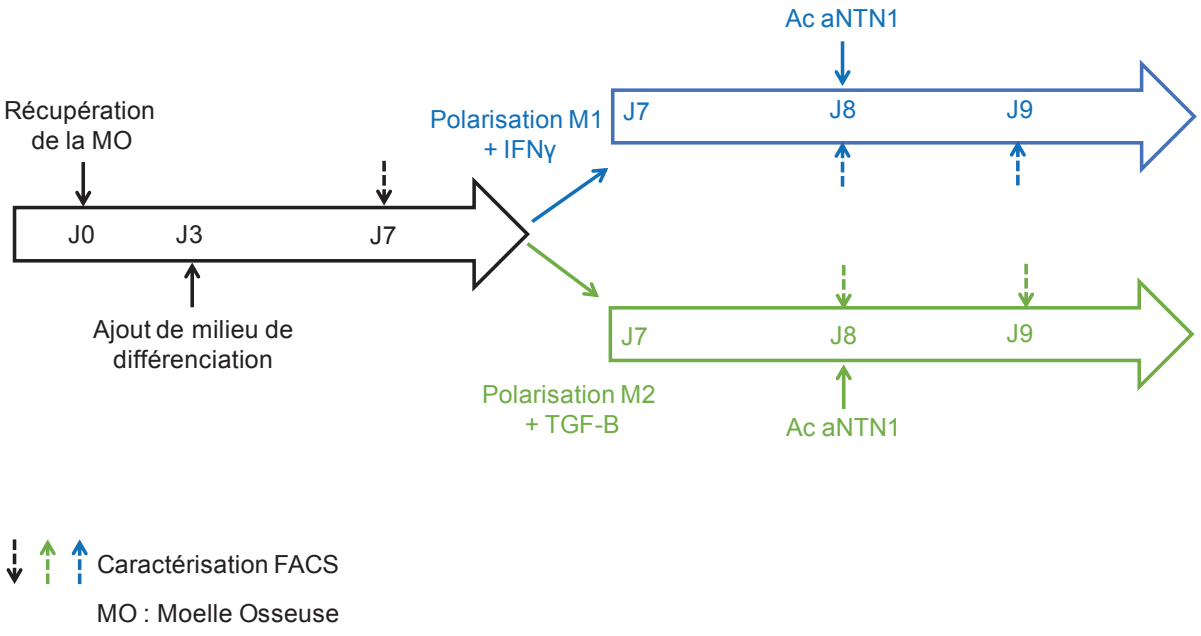


Figure 20 : Modèle de polarisation des macrophages

Les précurseurs des macrophages extraits de moelle sont mis en culture dans du milieu de différenciation pendant 7 jours. Les macrophages sont alors caractérisés par FACS. Une polarisation vers le phénotype M1 ou M2 est induite durant 24 h par traitement àl'IFNγ ou au TGFβ. L'effet de l'Ac aNTN1 chacun des sous-types de macrophages M1 ou M2 et analysé par FACS

III- Modélisation *in vivo* : effet anti-tumoral de la combinaison Dox + Ac aNTN1

Toutes les expérimentations ont été réalisées sur la plateforme Animage (imagerie du CERMEP) (N° d'agrément : A69 3830501). Les animaux ont été hébergés dans des cages ventilées avec un cycle jour / nuit de 12 h et ont eu accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

1. Modèle d'ostéosarcome de rat

L'ostéosarcome est une tumeur complexe dont la réponse à de nouvelles approches thérapeutiques est mieux apprécié dans les modèles *in vivo* récapitulant les interactions de la tumeur avec son environnement.

Le modèle utilisé est un modèle syngénique orthotopique d'ostéosarcome de rat [302]. Ce modèle établi chez des animaux immunocompétents, mime d'un ostéosarcome humain de par son agressivité et sa chimiorésistance. La tumeur est obtenue par l'implantation d'un greffon tumoral sur des rats Sprague-Dawley âgés de 4 semaines (Charles River Laboratoires, L'Arbresle, France) maintenus sous anesthésie gazeuse (isoflurane/oxygène (2.5 %/1.5 %, v/v) dispensée par un appareil d'anesthésie (Minerve Esternay, France). Avant l'implantation tumorale, les animaux reçoivent une injection sous-cutanée de Rimadyl (10mg/kg, Zoetis, France). Les fragments tumoraux (10 mm^3) sont implantés en position paratibiale (tibia postérieur droit) des rats après abrasion périostale. Après l'implantation du greffon tumoral, la plaie est suturée, les animaux retransférés dans leur cage après réveil.

La tumeur est détectable 8 jours post implantation lorsqu'elle atteint un volume moyen de 150 mm^3. Les animaux sont alors répartis aléatoirement dans les différents groupes en fonction du schéma de traitement étudié.Administration des traitements

Les différents traitements sont administrés bi-hebdomadairement par injection intra péritonéale sur rat vigile. Les traitements sont administrés durant 3 semaines après la détection de la tumeur ou jusqu'à ce que les tumeurs atteignent le point limite de 2500 mm^3.

a. Suivi de l'évolution tumorale

Le suivi de l'évolution tumoral est réalisé bi-hebdomadairement par mesure au pied à coulisse de deux diamètres perpendiculaires a et b où a est le petit. Le volume tumoral est calculé par application de la formule suivante : $V= 0,5xa^2xb$.

b. Mise à mort des animaux et récupération des échantillons

A la fin de l'étude ou lorsque la tumeur atteint le point limite de 2500 mm3, les animaux sont mis à mort par injection intracardiaque de barbiturique (1µL/g Doléthal Vetoquinol

France). La tumeur est alors disséquée et des échantillons sont prélevés. Une partie de la tumeur est fixée en formol (4 % en PBS) puis incluse en paraffine pour de futures analyses immunohistologiques. D'autres échantillons sont congelés à sec dans des cryotubes puis conservés à - 80°C pour des analyses moléculaires.

Les poumons sont examinés *in situ* et récupérés, les métastases macroscopiques sont comptées avant fixation des poumons en formol (4 % en PBS) pour inclusion en paraffine et analyses immunohistologiques.

Différentes études ont été menées à partir de ce modèle d'ostésarcome.

Une cinétique d'expression de la NTNT1 au cours de l'évolution tumorale a été analysée avant évaluation de l'efficacité thérapeutique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur la tumeur progressive et sur un modèle de récidive tumorale. Ces trois schémas expérimentaux vont maintenant être présentés.

2. Cinétique d'expression de la NTN1 dans l'ostéosarcome progressif

Nous avons validé l'expression de la NTN1 dans le modèle d'ostéosarcome de rat en progression et analysé les variations d'expression de la NTN1 en réponse à des cycles de chimiothérapie (Dox).

Pour cela les animaux ont été répartis en 2 groupes après détection de la tumeur (J8 post implantation tumorale): i) groupe contrôle PBS (250 µl/rat) (n=12) ; ii) groupe Dox (1 mg/kg ; n=12). Les traitements sont administrés selon le schéma présenté dans la figure 21 L'expression de la NTN1 est analysée 24h après administration du traitement à 3 temps différents : J9, J14 et J21 Pour chaque temps l'expression de la NTN1 est analysée sur 4 rats / groupe (Figure 21).

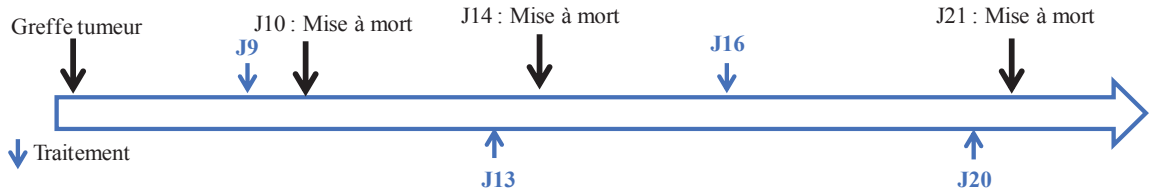


Figure 21 : Cinétique d'expression de la NTN1 au cours de la progression de l'ostéosarcome de rat

Après détection de la tumeur, les animaux ont reçu les traitements durant 2 semaines. Des mises à mort séquentielles ont été réalisées après 1, 2 ou4 administration de PBS ou Dox.

L'os controlatéral sain de chaque animal a été prélevé afin de mesurer le niveau basal de NTN1 dans le tissu sain à chaque temps.

3. Effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur l'ostéosarcome progressif

Pour cette expérimentation, 26 animaux porteurs d'ostéosarcome progressif sont répartis dans les groupes de traitement récapitulés dans le tableau 8.

Groupes	Effectif (n=)	Dose
Ctrle =PBS	3	250 µL/rat
Ac Ctrle : Ac Irr	5	4 mg/kg
Ac aNTN1	4	4 mg/kg
Dox	4	1 mg/kg
Dox + Ac Irr	4	1 + 4 mg/kg
Dox + Ac aNTN1	6	1 + 4 mg/kg

Tableau 8 : Groupes de traitement

Les animaux sont traités sur une période de 3 semaines ou jusqu'à ce que la tumeur atteigne un volume de 2500 m^3selon le schéma présenté dans la figure 22 ci-après.

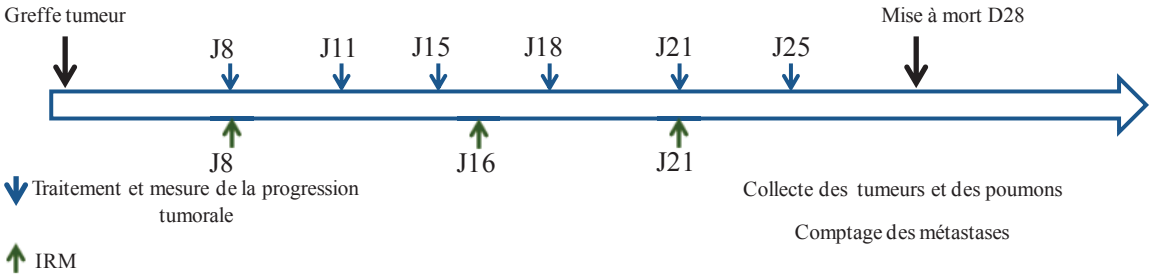


Figure 22 : Schéma expérimental modèle d'ostéosarcome progressif

Dès détection de la tumeur (J8 post implantation), les animaux sont traités bihedomadairement par IP, un suivi de la croissance tumorale est réalisé à chaque traitement par mesure de 2 diamètres. Suivi clinique qui est complété par 3 examens IRM . Lors de la mise à mort des échantillons de tumeur et de poumons sont conservés pour de futures analyses moléculaires et immunohistochimiques.

L'évolution tumorale a été suivie par IRM (plateforme Animage CerMEP Bron) dans le modèle d'ostéosarcome progressif. L'imagerie a été réalisée sur 4 rats par groupe pour les groupes de traitement contrôle, Dox et Dox + Ac aNTN1 à J8, 16 et 21 jours après la greffe.

4. Effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur la récidive d'ostéosarcome

Un modèle de récidive d'ostéosarcome a été généré à partir d'animaux porteurs d'ostéosarcome progressif, obtenus comme précédemment présentés. Pour mimer un protocole clinique humain, tous les animaux présentant une tumeur détectable à J8, reçoivent deux injections de Dox (traitements à J8 et J12). Une résection tumorale de type R2 est ensuite réalisée sur toutes les tumeurs, qui ont alors un volume moyen de 170 ± 35 mm^3. Suite à cette résection les animaux sont répartis de façon aléatoire dans les différents groupes de traitement (Tableau 9).

Traitement post opératoire	Effectif (n=)	Dose
Dox	10	1 mg/kg
Dox + Ac Irr	8	1 + 4 mg/kg
Dox + Ac aNTN1	10	1 + 4 mg/kg

Tableau 9 : Groupes de traitement récidive

La répartition des animaux dans les groupes de traitement après résection. Représentative de 3 expérimentations

Les animaux ont alors été traités durant 3 semaines post chirurgie ou jusqu'à ce que la tumeur récidive et atteigne un volume maximal de 2500 m^3 (Figure 23).

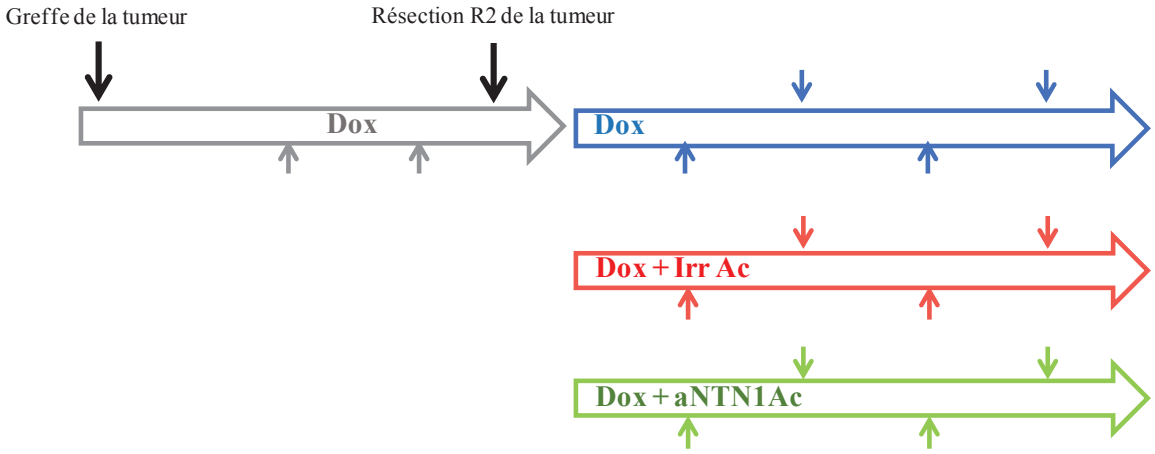


Figure 23 : Schéma expérimental modèle de récidive tumorale

Après détection de la tumeur les animaux ont reçu 2 administrations de dox avant qu'une résection R2 de la tumeur soit réalisée. Post chirurgie, les animaux sont répartis dans les différents groupes de traitement. Les animaux sont traités bi-hedomadairement par IP, un suivi de la croissance tumorale est réalisé à chaque traitement par mesure de 2 diamètres. Lors de la mise à mort des échantillons de tumeur et de poumons sont conservés pour de futures analyses moléculaires et immunohistochimiques

IV- Analyses moléculaires

Des analyses de PCR quantitative sont réalisées pour mesurer le taux d'expression de NTN1 dans différents échantillons tumoraux humains et dans les ostéosarcomes de rats en réponse aux différents traitements.

1. Extraction et dosage et des acides nucléiques

Les ARN extraits de sarcomes humains (Tableau 10) proviennent de la Plateforme de Gestion des Echantillons Biologiques (PGEB) du Centre Léon BERARD. Cette étape est réalisée uniquement sur les échantillons prélevés sur les tumeurs de tous les animaux inclus dans les différents schémas de traitements. Les ARN extraits de sarcomes humains (Tableau10) proviennent de la Plateforme de Gestion des Echantillons Biologiques (PGEB) du Centre Léon BERARD.

Sous-type histologique Echantillons Sarcomes humains	Effectif
Chondrosarcomes	7
Léiomyosarcomes	5
Ostéosarcomes Diagnostic (1) Résection (10) Métastases (22) Récidive locale (5)	38
Rhabdomyosarcomes	4
Sarcomes inclassés	6
Os sain	2

Tableau 10 : Composition des cohortes de sarcomes humains

Cette étape d'extraction est réalisée uniquement sur les échantillons prélevés sur les tumeurs de tous les animaux inclus dans les différents schémas de traitements.

Les échantillons tumoraux congelés sont broyés à sec à l'aide d'un Cryobroyeur P2000 (CryoRivoire) et les ARN totaux sont extraits à l'aide du réactif Tri-Reagent (Sigma, Lezennes, France). Après ajout du volume adéquat de Tri-reagent (1 mL/50 mg de tissu), les échantillons sont incubés dans du chloroforme (0.2 ml/ml Tri-reagent; 5 min ; T Amb). Après incubation, les tubes sont mélangés par retournement (15 sec), puis centrifugés (12 000 g ,15 min ; 4°C). Suite à la centrifugation, la phase aqueuse supérieure contenant l'ARN est conservée. Les ARN sont précipités par ajout d'isopropanol (0.5 ml/ml Tri-reagent) puis incubés (10 min ; T Amb) avant d'être centrifugés (12 000 g ,15 min ; 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est repris dans de l'éthanol 75 % (1 ml/ml Tri-reagent) centrifugé (7500 g, 5 min ; 4°C). A l'issue d'une nouvelle centrifugation, l'éthanol est éliminé et les culots sont resuspendus dans de l'eau « RNAse free » (entre 20 et 200 µL).

La concentration d'ARNm des échantillons est déterminée par mesure d'absorbance sur spectrophotomètre Nano-drop® (Thermo Scientific) et leur qualité est validée par les rapports 260/280 > 1.8 et 1.8 < 260/230 > 2.2. L'ARN a ensuite été stocké à -80°C jusqu'à réalisation de la transcription reverse - amplification en chaîne par polymérase quantitative (RT-PCRq).

2. PCR quantitative

a. Rétro-transcription

Une étape de rétro-transcription (RT) de l'ARN en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) est réalisée sur 1 mg d'ARN totaux à l'aide du kit PrimeScript RT (TaKaRa, Montigny-le-Bretonneux, France) suivant les instructions du fournisseur. La solution PreMix contenant déjà la transcriptase inverse, les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et les amorces randomisées en concentrations optimales est ajoutée à l'ARNm . Les volumes réactionnels sont présentés dans le tableau 11:

Réactif	Volume (µl)
ARN - 1 mg	x
H2O	8 - x
RT Mix	2

Tableau 11 : Volumes réactionnels nécessaire à la RT

La RT est réalisée par exposition des échantillons à un cycle de chauffage résumé ci-dessous (thermocycleur Biorad) (Tableau 12).

Durée	Température
15 min	37°C
15 sec	85°C
∞	4°C

Tableau 12 : Cycles nécessaires à la RT

Les ADNc obtenus sont ensuite dilués au 1/10ème dans de l'eau RNAse free puis aliquotés par 100 µL et conservés à -80°C jusqu'à réalisation de la PCRq.

b. PCR quantitative

Le niveau d'expression de NTN1 et de ses récepteurs a été mesuré par PCRq dans les échantillons d'ostéosarcomes de rat et dans les échantillons de sarcomes et os sains humains.

La réaction de PCR est effectuée dans un volume réactionnel de 10 µl contenant 2 µl d'ADNc; 0,25 µM d'amorces sens et anti-sens; 5 µl de « SYBR Premix Ex Taq II » (TaKaRa) comprenant les concentrations optimisées de dNTPs, $MgCl_2$, Ex Taq ADN Polymérase et de SYBR Green ; le volume réactionnel est complété par de l'eau RNAse Free (qsp 10 µL). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : un « hot-start » de 30 sec à 95°C suivi de 40 cycles d'amplification (95°C ; 5 sec puis 60°C ;30 sec). Les PCRq sont réalisées sur thermocycler Roche lightcycler 480 (Roche) (Tableau 13).

Etape	Durée	Température
Pré incubation	30 sec	95°C
Amplification (40 cycles)	15 sec	95°C
	30 sec	60°C
Courbes de dissociation		

Tableau 13 : Cycles de PCRq

Les séquences des amorces des différents gènes étudiés ainsi que des gènes de ménage sont présentées dans le tableau 14

Espèce	Catégorie	Nom du gène	Séquences Left et Right
Homme	NTN1 et ses récepteurs	DCC	GGGGTGGTGAAGTCAGATGA CAGCTGAGACGGACAAATCG
		UNC5A	CCTTGTCAGCTACCAGGAGA GCAAACCTTGTGTCCTTGGT
		UNC5B	GGCCAAATACCAGGAGATCC AGAGTGGTATGCAGCTGGAA
		UNC5C	CGATATCGCCCATTCCCTCT GTAGGTTCCTCTGACACGGT
		UNC5D	CCCTTGTGCATTTCAGGAAGT GGCAGGCAGTGAATGGTTTA
		NTN1	GACTATGCCGTCCAGATCCA GAGGGGCTTGATTTTGGGAC
	Gènes de ménage	RPLP0	ATGTGGGCTTTGTGTTCACC TCCAGTCTTGATCAGCTGCA
		GAPDH	AGGTCGGAGTCAACGGATTT ATCTCGCTCCTGGAAGATGG
Rat	NTN1 et ses récepteurs	DCC	AGCCCAGCAAAGGAAGAAAC ATCTGGCTTTCTGACTGGCT
		UNC5A	CCACCAAAAGTCAGAAGGCC AGGTCCTCATTTCGAAGCCA
		UNC5B	CTCTCCCTCCATGACATCCC TGGTGTGCAGCTGGAAAATC
		UNC5C	GGACCCTGCTAGCACCATTA GGCAAAGTAATTCAAGTACCTGT
		UNC5D	GTCTGAGAGAGCCGAGTACC ACTCACCCCTGTATTTGGCA
		NTN1	CTACTGCAAGGAGGGCTTCT GTGGCGCTACAGGAATCTTAA
	Gènes de ménage	CYC 1	GGCATCTTCCATTACGGACA CCACAGCTAGCCCTGCAC
		GAPDH	AACGACCCCTTCATTGACCT CCCCATTTGATGTTAGCGGG

Tableau 14 : Amorces pour les gènes de ménage, la NTN1 et ses récepteurs homme et rat

L'expression de la NTN1 est normalisée par rapport à deux gènes de référence : la GAPDH et la protéine ribosomale RPLP0

V- Immunohistochimie

Des marquages immunohistochimiques sont réalisés sur coupes paraffine d'échantillons tumoraux (épaisseur 5 µm) pour évaluer les effets des différents traitements sur la densité vasculaire et l'infiltrat immunitaire de l'ostéosarcome.

Les lames sont déparaffinées par 2 bains successifs de xylène suivis par une réhydratation en gradient d'éthanol de 100 % à 70 % (Tableau 15).

Réactif	Durée
Xylène	5 min
Xylène	5 min
Ethanol 100 %	2 min
Ethanol 100 %	2 min
Ethanol 95 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
H_2O Distillée	2 min

Tableau 15 : Etapes de déparaffinage des lames

Une étape de démasquage antigénique suit le déparaffinage. Pour chaque anticorps primaire utilisé, un démasquage antigénique adapté a été effectué. Ces conditions sont présentées dans le tableau 16

Marquage Anticorps primaire	Réactifs	Incubations
CD3	EDTA pH8	36 min, 37°C
CD8	EDTA pH8	20 min, 37°C
CD163	Protéase 2	16 min, 37°C
CD146	Tri sodium citrate	20 min, 92°C

Tableau 16 : Démasquage Antigénique

Les lames sont ensuite lavées par une solution de TBS/Tween 0.05 % (3 x 5 min) puis une étape de blocage est réalisée par incubation (1 h) des lames dans une solution de blocage (Avidin Biotin blocking kit (Vector) 5 % en TBS 10 % sérum de cheval). Toutes les

incubations sont réalisées en chambre humide et à l'abri de la lumière. Après des étapes de lavage en TBS/ Tween 0.05 % (3 x 5 min), les lames sont mises en présence de l'anticorps primaire (18h ; 4°C) dilué dans la solution suivante (Avidin Biotin blocking kit (Vector) 5 % en TBS 1 % sérum de cheval). Les différents anticorps primaires utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau 17.

Marquage	Dilution	Clone	Espèce hôte	Fournisseur
CD3	1/100	2GV6	Souris	Ventana
CD8	1/200	OX-8	Souris	AbD Serotec
CD163	1/50	ED2	Souris	AbD Serotec
CD146	1/100	EPR3208	Lapin	AbCam

Tableau 17 : Anticorps primaires utilisé pour identifier l'infiltrat immunitaires et les vaisseaux

Après une série de trois lavages en TBS/ Tween 0.05 % (3 x 5 min) un blocage de la peroxydase endogène a été réalisé par incubation des lames (20 min) dans une solution comprenant 0.03 % de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en TBS. Une nouvelle étape de lavages (TBS/ Tween 0.05 % (3 x 5 min) précède l'incubation des lames avec l'anticorps secondaire biotinylé (1 h en TBS, 1 % de sérum de cheval). Les anticorps secondaires et dilution utilisés sont présentés dans le tableau 18.

Anticorps secondaire	Dilution	Fournisseur
Anticorps biotinylé anti IgG de souris	1/300	Vector
Anticorps biotinylé anti IgG de lapin	1/300	Vector

Tableau 18 : Anticorps secondaires utilisés

Après nouvelle série de lavages (TBS/ Tween 0.05 % (3 x 5 min), le marquage spécifique est amplifié par incubation dans une solution (streptavidine - HRP (Life technologie) diluée au 1/300 en TBS). La révélation des marquages est faite à l'aide d'une solution de révélation de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Tableau 19).

Réactif	Durée
H_2O distillée	5 mL
Tampon pH 7.5	2 gouttes
DAB	4 gouttes
Péroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	2 gouttes

Tableau 19 : Composition de la solution de révélation

Après une dernière série de lavage en eau distillée (3 x 3 min), les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline (1 à 2 min) (Ventana) puis montées à sec à l'aide du milieu de montage Vectamount (Vector)). Toutes les observations sont réalisées sous microscope droit Axio-imager (Zeiss) aux grossissements x50 - x100 et x200. La densité vasculaire intra-tumorale est appréciée par comptage des vaisseaux $CD146^+$, la qualité de l'infiltrat immunitaire est appréciée par comptage des cellules $CD3^+/CD8^+/CD163^+$. Ces observations sont réalisées pour chaque échantillon sur 5 champs non consécutifs (grossissement x200).

VI- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism® (Graphpad software). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes, d'écart-types et d'erreurs standards à la moyenne (ESM). Les expériences d'efficacité thérapeutique de l'Ac aNTN1 sur nos différents modèles ont été répétées 3 fois de façon indépendante et nous présenterons une expérience représentative des 3. L'effet anti-tumoral des traitements apprécié par différence des volumes tumoraux moyens des différents groupes de traitement. Les analyses de survie sont effectuées selon la méthode de Kaplan Meyer. Les différences statistiques sont déterminées grâce au test non paramétrique Mann Whitney à l'aide du logiciel Prism® (Graphpad software). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative pour les analyses de survie, d'expression de la NTN1, d'évolution tumorale et de quantification d'infiltration immunitaire.

.

RESULTATS

Résultats

Il est aujourd'hui nécessaire de valider de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge de l'ostéosarcome permettant de contourner les processus de résistance et ciblant des voies de signalisation essentielles pour la tumorigenèse tels que le rétablissement des mécanismes de mort cellulaire. Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse s'inscrit dans ce contexte et avait pour objectif principal de tester une combinaison thérapeutique ajoutant à la chimiothérapie un Ac prévenant l'interaction entre la NTN1 et ses récepteurs rétablissant ainsi des voies de mort cellulaire et d'apoptose dans les cellules d'ostéosarcome.

Pour ce faire nous avons structuré ce travail selon trois axes. Dans un premier temps nous avons caractérisé le niveau d'expression de la NTN1 dans l'ostéosarcome et étudié sa possible valeur pronostique (**Axe 1**). Nous avons ensuite testé l'efficacité thérapeutique de la combinaison de la chimiothérapie (Dox) et d'un Ac aNTN1 dans un modèle progressif d'ostéosarcome de rat dans un modèle de récidive de l'ostéosarcome (**Axe 2)**. Les effets de ce traitement combiné sur la progression tumorale de l'ostéosarcome nous ont conduit à nous interroger sur les mécanismes d'action de cette combinaison sur l'environnement de l'ostéosarcome **(Axe 3)**.

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail sont organisés en trois grandes parties correspondant aux axes de recherche évoqués ci-dessus.

I- NTN1, cible thérapeutique pour l'ostéosarcome

Le développement des thérapies ciblées et leur évaluation en clinique a mis en évidence qu'une étape indispensable dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques est la détermination du niveau d'expression d'une cible potentielle dans la tumeur d'intérêt. Cette étape peut parfois permettre de mettre en évidence de nouveaux facteurs pronostiques associés à la progression tumorale et / ou à la réponse de la tumeur aux traitements conventionnels. Pour ces raisons, avant de tester cette nouvelle approche d'interférence avec la NTN1, nous avons voulu vérifier son niveau d'expression dans l'ostéosarcome et nous nous sommes également intéressés à la possible valeur pronostique de cette expression.

Pour ce faire, nous avons interrogé deux banques de données transcriptomiques et génomiques : The cancer Genome Atlas (TCGA - https://tcga-data.nci.nih.gov/) et Gene Expression Omnibus (GEO - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).

Il s'est avéré que ces deux banques de données ne contiennent pas de cohortes spécifiques de l'ostéosarcome. Une seule cohorte regroupant tous les sarcomes et dans laquelle la proportion d'ostéosarcome n'est pas indiquée, est présente sur TCGA. La base GEO contient une cohorte d'ostéosarcome (database GSE12512) comportant à la fois des échantillons tumoraux (n=27), des lignées cellulaires (n=12) mais également des léiomyosarcomes (n=8).

Devant ce manque de données spécifiques aux sarcomes osseux, nous nous sommes tournés vers une banque de données spécifiques des sarcomes : ATGSarc (http://atg-sarc.sarcomabcb.org/). Cette base nous a permis d'évaluer le niveau d'expression de la NTN1 dans différents sous-types de sarcomes des tissus mous et d'évaluer sa valeur pronostique dans ces tumeurs.

1. NTN1: profil d'expression et valeur pronostique pour les sarcomes des tissus mous

ATGSarc est une banque de données regroupant les profils d'expressions et les altérations génomiques de presque 1000 échantillons de sarcomes des tissus mous (STS). Cette banque de données nous a permis d'analyser le niveau d'expression de la NTN1 dans différents sous-types histologiques et moléculaires de STS : les sarcomes à génomique complexe, les synovialosarcomes, les liposarcomes myxoides, les tumeurs stromales gastro intestinales (GIST - gastro intestinal stromal tumour), ainsi que les sarcomes à translocation regroupant entre autre les rhadomyosarcomes, les liposarcomes ou les synovialosarcomes.

Dans la base de données le niveau d'expression de la NTN1 pour un sous-type histologique est considéré comme étant : i) soit supérieur à l'expression moyenne observée dans ce sous-type, ii) soit inférieur à la moyenne observée dans ce sous-type. Nous avons focalisé nos analyses sur la survenue de deux événements : la récidive locale et la récidive métastatique des tumeurs en fonction du niveau d'expression de la NTN1.

L'analyse effectuée montre que dans les synovialosarcomes ainsi que dans les GIST une expression de NTN1 supérieure à la moyenne est un facteur de bon pronostic à la fois dans la survenue de la récidive locale comme dans la récidive métastatique (Figure 24) (Tableau 20).

Dans le cas des GIST, 4 ans après le diagnostic de la tumeur, plus de 50 % des patients présentant un niveau d'expression de NTN1 inférieur à la moyenne ont dévelopé des métastases, alors qu'il n'est que de 10 % pour les patients ayant une expression de NTN1 supérieure à la moyenne (Figure 24A). Il en est de même pour la récidive locale : une expression de NTN1 inférieure à la moyenne corrélée avec taux de récidive plus élevé qu'une expression de NTN1 supérieure à la moyenne (Figure 24B).

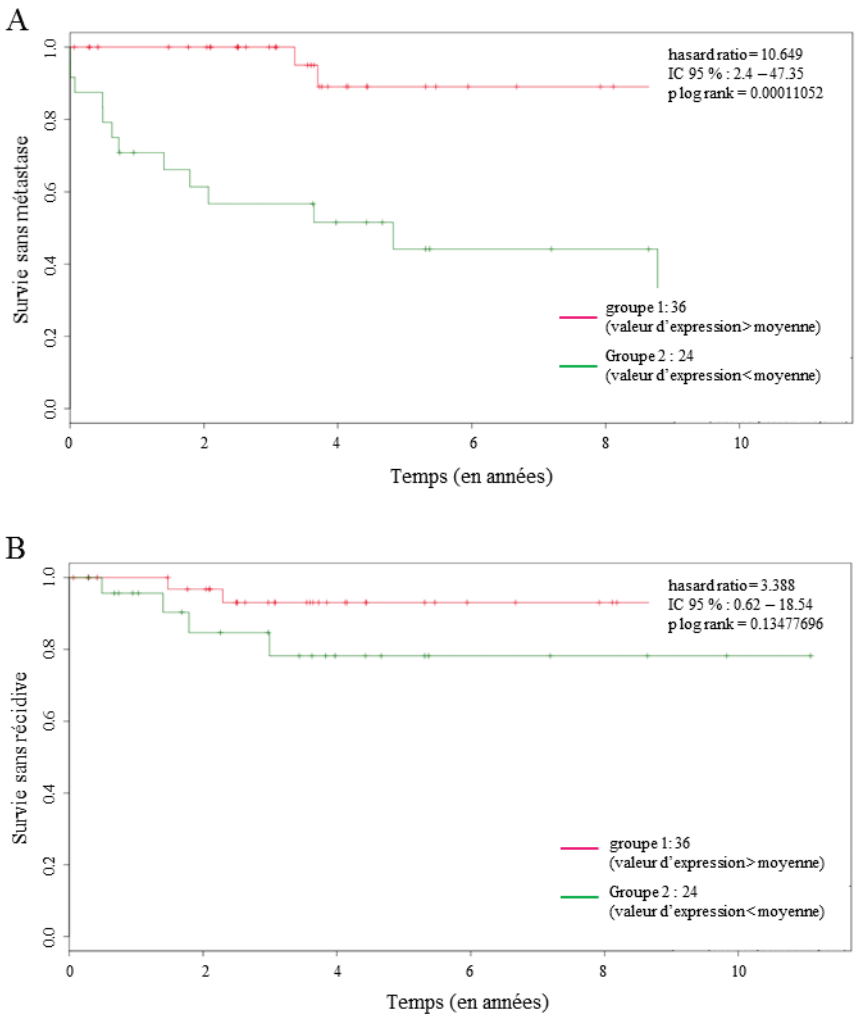


Figure 24 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les GIST

(A) Courbe de survie sans métastase en fonction de l'expression de la NTN1 dans les GIST (n=60). (B) Courbe de survie sans récidive en fonction du niveau d'expression de la NTN1.Pour chaque graphe la courbe verte représente le niveau d'expression de NTN1 inférieur à la moyenne et la courbe rouge niveau d'expression de NTN1 supérieur à la moyenne. Dans le cas des GIST, un niveau d'expression de NTN1 supérieure à la moyenne est associée à une survie sans métastase et à une survie sans rechute plus élevée (p= 0,00011052- p= 0,134 respectivement)

Pour les sarcomes à translocation ainsi que les sarcomes à génomique complexe (SGC), une relation inverse entre le niveau d'expression de la NTN1 et la survie sans métastase ainsi que la survie sans rechute est observée. Pour ce sous-type de sarcomes, une expression de NTN1 supérieure à la moyenne est associée à une diminution de la survie sans métastase et de la survie sans rechute. Le tableau 20 synthétise la valeur pronostique de l'expression de NTN1 pour la survie sans métastase et survie sans rechute des différents sous-types de STS présents dans la base ATGSarc.

Sous-type de STS	**Survie sans rechute** Expression de NTN1 > à la moyenne	**Survie sans métastase** Expression de NTN1 > à la moyenne
Sarcomes à génomique complexe (n=389)	Mauvais pronostic (0,105374)	Mauvais pronostic (0,0012185)
Sarcomes à translocation (n=108)	NS	Mauvais pronostic (0,00429852)
GIST (n=60)	Bon pronostic (0,134)	Bon pronostic (0,00011052)
Synovialosarcomes (n=58)	NS	Bon pronostic (0,02874682)
Tumeurs desmoides (n=128)	NS	NA
Liposarcomes myxoides (n=50)	NS	NS

Tableau 20 : Valeur pronostique de la NTN1 sur la récidive locale et métastatique des STS

Pour les SCG, une expression de NTN1 supérieure à la moyenne est associée à une médiane de survie sans rechute (Figure 25A) et de survie sans métastase (Figure 25B) plus courte que celle observée pour les sarcomes exprimant un niveau de NTN1 inférieur à la moyenne. Dans le cas de la rechute métastatique, la médiane de survie est atteinte plus de 15 ans après diagnostic du SGC chez les patients exprimant un taux de NTN1 inférieur à la moyenne ; alors que la médiane chute à moins de 5 ans chez ceux présentant un taux de NTN1 supérieur à la moyenne (Figure 25A). Il en est de même pour la récidive locale : une expression de NTN1 supérieure à la moyenne est corrélée avec un taux de récidive plus élevé qu'une expression inférieure à la moyenne (Figure 25B).

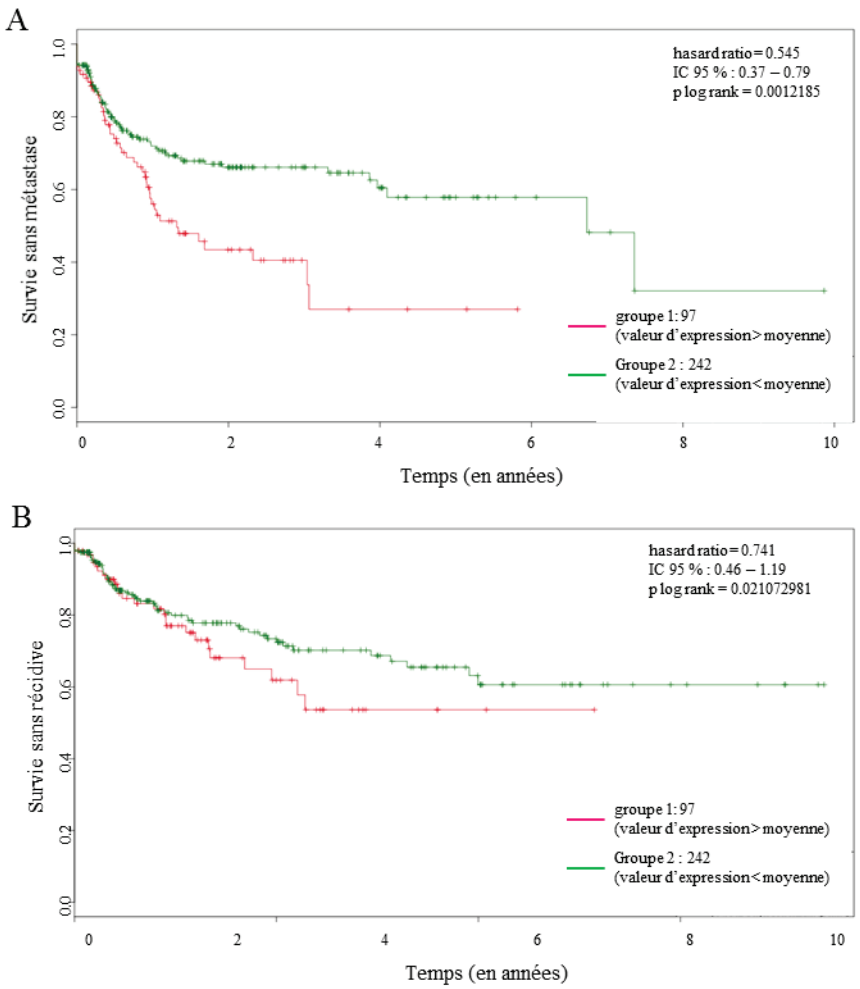


Figure 25 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les SGC

(A) Courbe de survie sans métastass en fonction de l'expression de la NTN1 dans les SGC (n=389). (B) Courbe de survie sans récidive en fonction du niveau d'expression de la NTN1.Pour chaque graphe la courbe verte représente le niveau d'expression de NTN1 inférieur à la moyenne et la courbe rouge niveau d'expression de NTN1 supérieur à la moyenne. Dans le cas des SCG, un niveau d'expression de NTN1 supérieure à la moyenne est associée à une survie sans métastase et à une survie sans rechute plus faible (p= 0,0012185- p= 0,0105374 respectivement)

Cette analyse montre l'existence d'une grande variabilité dans la valeur pronostique de l'expression de NTN1 en fonction du sous-type de STS considéré. Une expression de NTN1 supérieure à la moyenne peut être de bon pronostic dans la survenue des métastases et de la récidive locale pour un sous-type donné et être de mauvais pronostic dans un autre. Cette grande hétérogénéité de valeur pronostique de la NTN1 reflète la diversité histologie et moléculaire de ces tumeurs.

Nous nous sommes plus intéressés à l'expression de la NTN1 dans les SGC. L'ostéosarcome est lui aussi un SGC mais appartient aux sarcomes osseux.

Dans les sarcomes des tissus mous à génomique complexe, nous avons mis en évidence qu'un niveau élevé d'expression de NTN1 est un élément de mauvais pronostic dans la récidive métastatique, nous souhaitions donc transposer cette analyse à l'ostéosarcome. Devant le peu de données disponibles pour les sarcomes osseux, nous avons constitué une cohorte d'échantillons d'ostéosarcome (fournie par le PGEB du Centre Léon BERARD) dans laquelle nous avons analysé l'expression de la NTN1 par PCRq. Nous avons par la suite croisé les données cliniques avec le niveau d'expression de la NTN1 afin de réaliser une analyse similaire à ATGSarc permettant d'analyser la valeur pronostique de la NTN1 dans l'ostéosarcome et son potentiel de cible thérapeutique

2. NTN1: Cible thérapeutique pour l'ostéosarcome

Dans un premier temps, nous avons analysé par PCRq le niveau d'expression de NTN1 dans une petite cohorte de différents sous-types de sarcomes comprenant 7 chondrosarcomes, 5 leiomyosarcomes, 5 osteosarcomes, 4 rhabdomyosarcomes et 6 sarcomes inclassés.

Confirmant les observations issues de ATGSarc, dans cette cohorte, on remarque une variation du niveau d'expression de la NTN1 selon le sous-type de sarcome. Parmi les tumeurs testées, les chondrosarcomes, les léiomyosarcomes et les sarcomes inclassés présentent le niveau d'expression relative de la NTN1 le plus faible avec des valeurs respectives de 1.00 ± 0.21 ; 1.20 ± 0.58 et 0.52 ± 0.29 (Figure 26).

A contrario, l'ostéosarcome est le sous-type histologique présentant le niveau d'expression de NTN1 le plus élevé avec une expression relative NTN1 de 7.76 ± 2.19 ($p < 0.05$) (Figure 26).

En parallèle, nous avons aussi évalué l'expression de différents récepteurs à la NTN1 dans cette cohorte. Seuls les récepteurs UNC5B et UNC5C sont exprimés dans la majorité des tumeurs. Leur niveau d'expression ne variant pas et n'ayant pas de valeur pronostique quelque soit le sous-type de sarcome considéré, nous avons focalisé nos analyses sur l'expression de la NTN1.

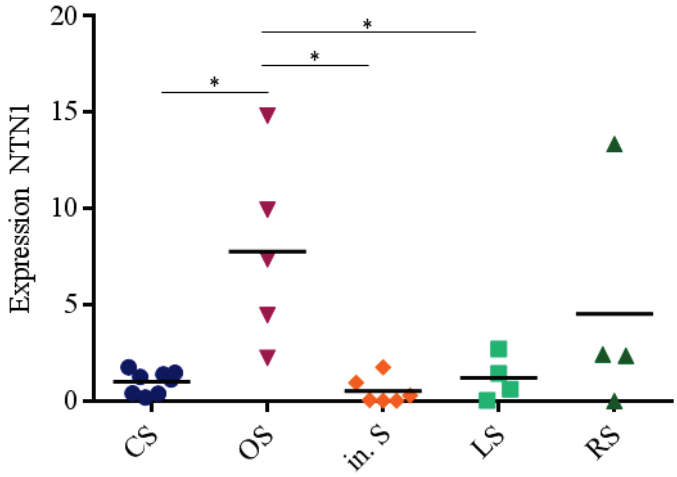


Figure 26 : Expression relative de la NTN1 dans des sarcomes musculosquelettiques

L'expression de la NTN1 a été mesurée par PCRq dans différents sarcomes musculosquelettiques. Parmi ces sous-types, l'ostéosarcome est celui qui présente le taux d'expression le plus important alors que les sarcomes inclassés présentent eux le niveau d'expression de NTN1 le plus faible (p<0.05).*
CS : Chondrosarcome – OS : Ostéosarcome – LS : Léiomyosarcome – In. S : Sarcome inclassé – RS : Rhabdomyosarcome

Au vu de ces premiers résultats, nous avons augmenté la cohorte d'ostéosarcomes. *In fine*, nous avons analysé l'expression NTN1 sur 38 échantillons d'ostéosarcomes dont une biopsie, 22 tumeurs primaires, 10 récidives métastatiques et 5 récidives locales. Nous ne présentons ici que les données obtenues pour les ostéosarcomes primaires. Les PCRq montrent une importante variabilité de l'expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes primaires : neuf d'entre elles présentent un taux de NTN1 inférieur à 0.30 tandis que neuf autres ont un niveau d'expression de NTN1 supérieure à 5 (Figure 27).

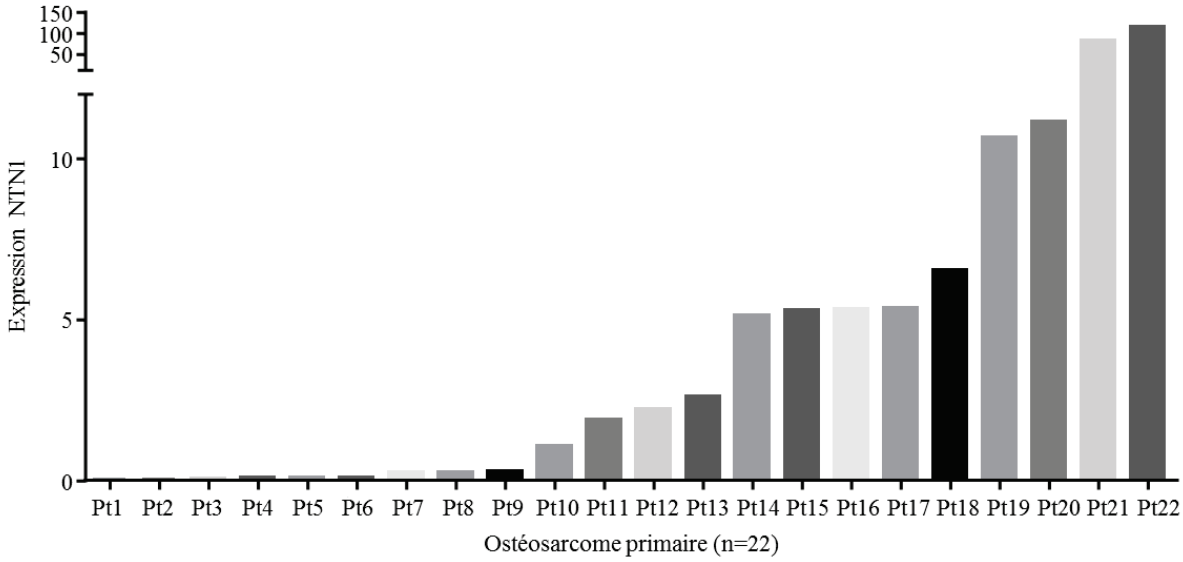


Figure 27 : Expression relative de la NTN1 dans une cohorte de 22 ostéosarcomes primaires
Hétérogénéité de l'expression de la NTN1 dans 22 ostéosarcomes primaires

Devant l'hétérogénéité de l'expression de la NTN1 dans les tumeurs primaires nous avons croisé les données cliniques anonymisées avec ces niveaux d'expression afin de voir si le niveau d'expression de NTN1 avait une valeur pronostique pour l'ostéosarcome. Aucune corrélation entre l'âge au diagnostic de la tumeur, le sexe du patient et le niveau d'expression de la NTN1 n'a pas pu être mise en évidence.

Nous avons réalisé une analyse similaire à celle d'ATGsarc sur notre cohorte d'ostéosarcomes. Nous avons analysé la survie globale et la survie sans métastase des ostéosarcomes constituant notre cohorte selon le niveau d'expression de la NTN1 (considéré comme supérieur à la moyenne ou inférieur à la moyenne d'expression de la cohorte). L'analyse des courbes de survie ne révèle aucune corrélation significative entre le niveau d'expression de NTN1 et la survie globale ou la survie sans métastase (Figure 28).

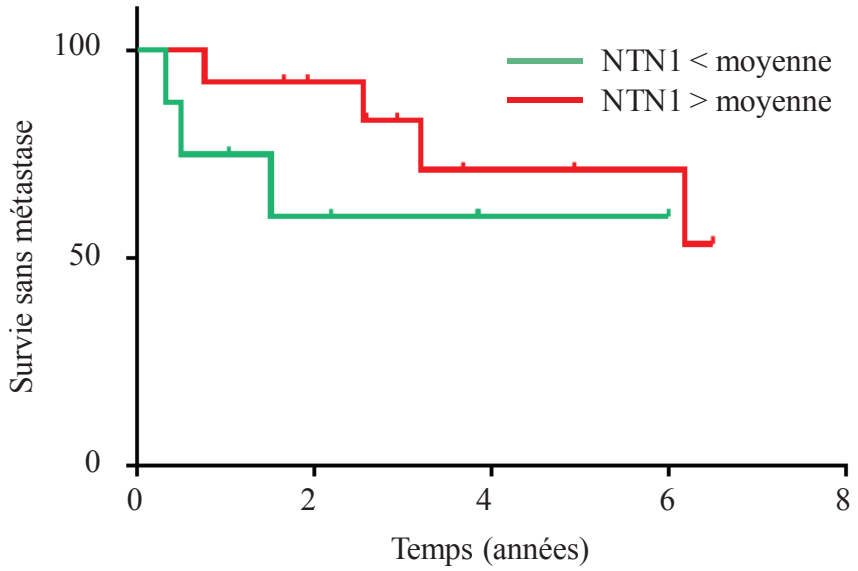


Figure 28 : Valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes
Courbe de survie sans métastase en fonction du niveau d'expression de la NTN1 (n=22). La courbe verte représente le niveau d'expression de NTN1 inférieur à la moyenne et la courbe rouge niveau d'expression de NTN1 supérieur à la moyenne. Dans le cas des ostéosarcomes, aucune association n'est faite entre le taux de TN1 et la survie sans métastase (p>0.05)

Des études récentes ont mis en avant, la capacité de cellules tumorales de neuroblastome, d'adénocarcinomes pulmonaires ou de cancers du sein à surexprimer la NTN1 en réponse à un traitement par chimiothérapie [303]. Nous avons donc analysé l'impact de la chimiothérapie sur le niveau d'expression de NTN1 dans notre cohorte d'ostéosarcomes primaire. Pour cela nous avons comparé le niveau d'expression de la NTN1 dans des ostéosarcomes n'ayant pas été traité à celui d'ostéosarcomes ayant reçu des cycles de chimiothérapie (Figure 29). Le niveau d'expression de NTN1 dans les tumeurs n'ayant pas été traitées par chimiothérapies est faible (1.62 ± 1.31) et augmente significativement en réponse à la chimiothérapie (17.12 ± 9.26). Après l'administration des chimiothérapies, le niveau d'expression de NTN1 dans les ostéosarcomes primaires est 10.6 fois plus élevé que les patients n'ayant reçu aucune chimiothérapie (p=0.0049) et ce quel que soit le régime de chimiothérapies reçu : Méthotrexate, MAP (Methotrexate haute dose, Dox et Cisplatine), API (Dox, Cisplatine et Ifosfamide) (Figure 29).

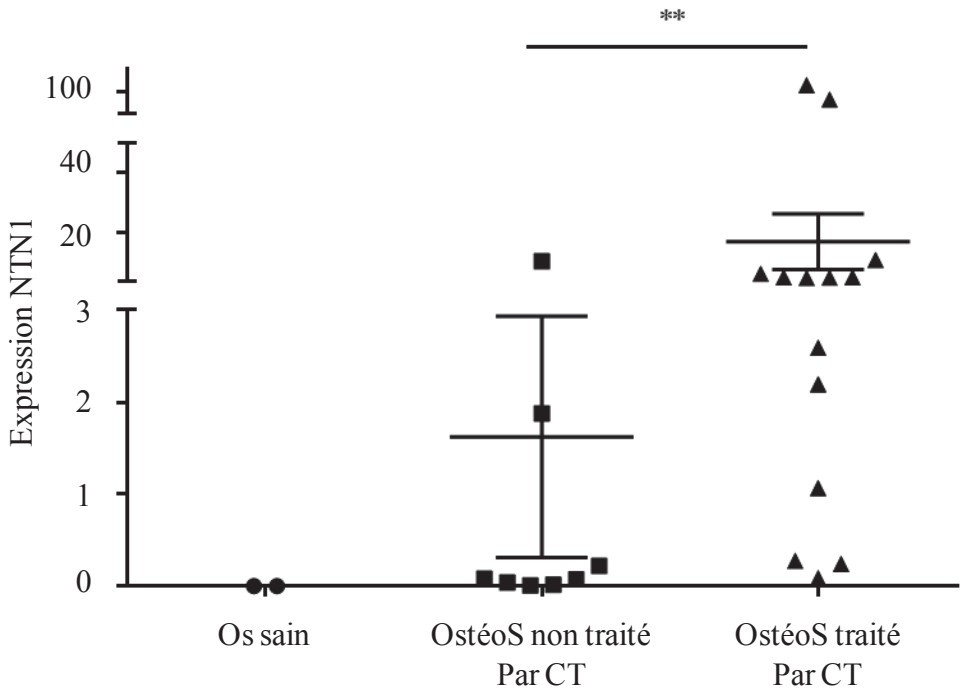


Figure 29 : Expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes primaires augmente en réponse à la chimiothérapie

*L'expression de NTN1 a été mesurée par PCRq dans des échantillons provenant pièces de résection d'ostéosarcomes primaires ayant été préalablement ou non traités par chimiothérapies. L'administration de chimiothérapie augmente l'expression de NTN1 dans ces échantillons (** - p<0.01). CT : Chimiothérapies – OstéoS : Ostéosarcome.*

Une augmentation d'expression de la NTN1 en réponse aux chimiothérapies suggère qu'une stratégie combinant chimiothérapie et un agent interférant avec la NTN1 est envisageable pour l'ostéosarcome, comme cela a été décrit dans un modèle de xénogreffe d'adénocarcinome pulmonaire.

Récapitulatif des résultats – Axe I

Dans cette première partie nous avons montré que :

- Le niveau d'expression de la NTN1 a une valeur pronostique pour la survie sans métastase et la survie sans rechute de certains STS (GIST, de sarcomes à translocation, synovialosarcomes, SGC).
- Le niveau d'expression de NTN1 dans l'ostéosarcome primaire n'est corrélé ni avec l'âge, le sexe, la survie globale ou la survie sans métastase des patients.

- Le niveau d'expression de NTN1 augmente en réponse à la chimiothérapie dans les ostéosarcomes primaires

En conclusion : Le niveau expression de la NTN1 dans les ostéosarcomes, son augmentation en réponse à la chimiothérapie font qu'une approche combinant l'interférence de la NTN1 avec ses récepteurs et la chimiothérapie est envisageable pour l'ostéosarcome. Nous avons donc testé l'efficacité thérapeutique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 *in vivo* dans des modèles d'ostéosarcome de rat.

II- Effets anti-tumoral et anti-métastatique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 : modèle d'ostéosarcome de rat

1. Expression de la NTN1 dans le modèle d'ostéosarcome de rat

Nous avons analysé l'évolution de l'expression de la NTN1 au cours de la progression de l'ostéosarcome primaire de rat et en réponse à une ou plusieurs administrations de Dox.

L'analyse par PCRq de l'expression de NTN1 a permis de mettre en évidence une surexpression de 2.35 fois de la NTN1 dans l'ostéosarcome (expression moyenne : 0.75 ± 0.07) par rapport à l'os sain (expression moyenne : de 0.31 ± 0.08) ($p<0.001$) (Figure 30A).

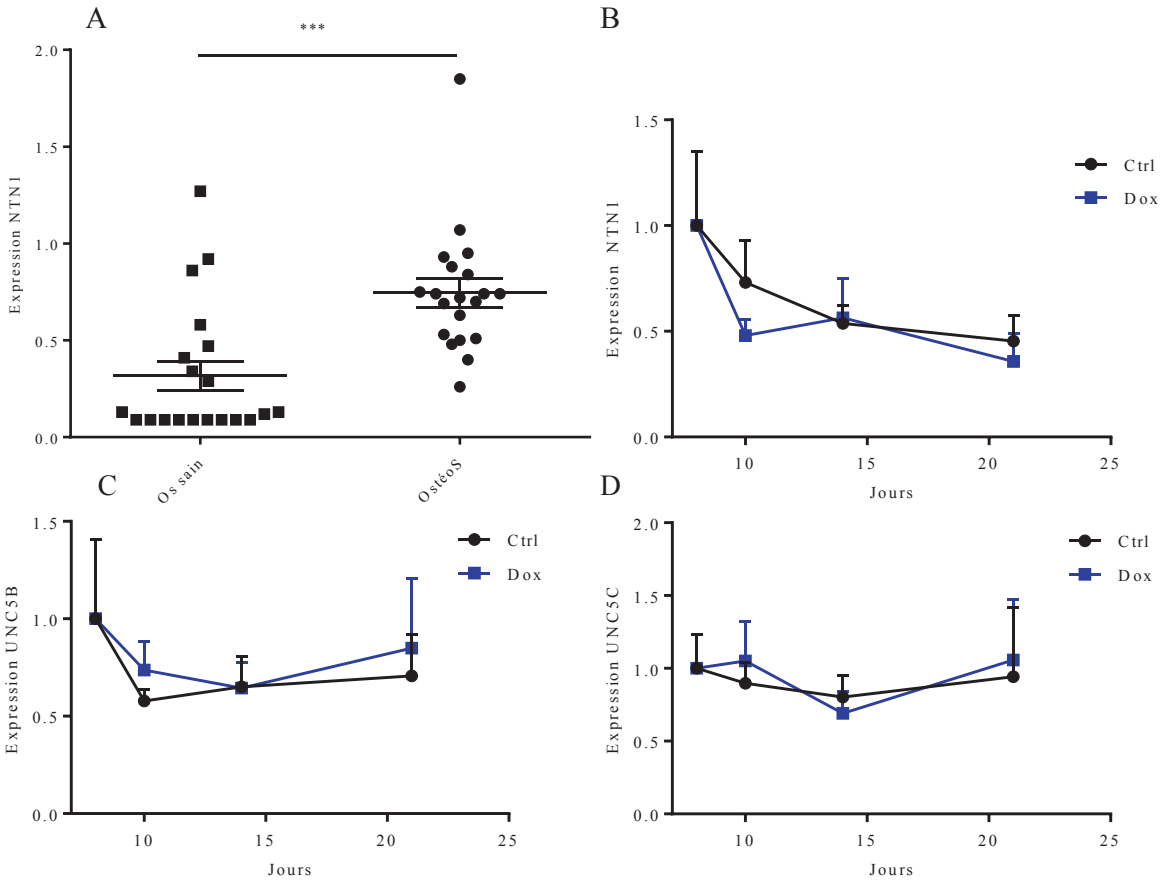


Figure 30 : Expression de la NTN1 et des RD dans l'ostéosarcome rat

*(A) L'expression de la NTN1 par PCRq montre une surexpression de la NTN1 dans la tumeur par rapport à l'os sain (B, C ; D) Cinétique d'expression de la NTN1 et des RD dans l'ostéosarcome progressif et en réponse à 1 2 ou 4 administration de Dox. L'expression de NTN1 diminue au cours du temps alors que celle des récepteurs reste stable. L'administration de Dox ne modifie pas le profil d'expression de la NTN1 et de ses récepteurs (*** $p < 0.001$)*

Une cinétique d'expression de la NTN1 et de ses récepteurs a été étudiée à partir de J1 post implantation du greffon (i.e quand la tumeur est détectable) et sur une période de trois semaines. Au cours de la progression tumorale le niveau d'expression de la NTN1 diminue. De 1.00 ± 0.35 à J7, il passe à 0.53 ± 0.08 à J14 puis à 0.45 ± 0.12 à J21 post implantation du greffon (Figure 30B)

Dans l'ostéosarcome de rat, seuls les récepteurs de la NTN1, UNC5B et UNC5C, sont exprimés et leur expression reste stable au cours de la progression tumorale (Figure 30C). L'expression de UNC5B passe de 1.00 ± 0 .41 à J7, il passe à 0.65 ± 0.18 à J14 puis à 0.80 ± 0.24 à J21 post implantation du greffon (Figure 30C). Il en est de même pour UNC5C qui passe de 1.00 ± 0 .41 à J7 à 1.22 ± 0.48 à J21 post implantation du greffon (Figure 30D).

Ainsi nous montrons que malgré une absence d'induction de la NTN1 par la chimiothérapie, le niveau d'expression relatif de la NTN1 dans l'ostéosarcome primaire de rat reste au cours du temps supérieur à celui de l'os sain. Cette surexpression de NTN1 dans l'ostéosarcome en fait une cible intéressante pour évaluer une approche combinant la chimiothérapie et un Ac aNTN1. La combinaison thérapeutique a été testée dans deux modèles d'ostéosarcome de rat : un modèle progressif et un modèle de rechute.

2. Effets anti-tumoral et anti-métastatique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur l'ostéosarcome progressif

Nous présenterons ici une expérimentation représentative des trois que nous avons réalisées. Des résultats similaires ont été obtenus pour chacune d'entre elles.

a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit progression l'ostéosarcome primaire

Dans cette phase expérimentale nous avons évalué et comparé l'effet de l'Ac aNTN1 seul ou en combinaison avec la Dox sur la progression de l'ostéosarcome primaire.

La Dox, le traitement de référence, n'induit aucun ralentissement de la progression tumorale par rapport au groupe contrôle (Figure 31A). De façon similaire, l'Ac Irr et Ac aNTN1 n'ont pas d'effet notable sur la progression tumorale (Figure 31A). Effectivement, 21 jours après implantation du greffon le volume tumoral moyen atteint respectivement 2219 ± 498 mm^3 (courbe noire) pour le groupe contrôle, 1977 ± 268 mm^3 pour l'Irr Ac (courbe pointillés rouge) et 2724 ± 448 mm^3 pour le groupe traité avec aNTN1 (courbe pointillés verte) (Figure 31A).

La combinaison Dox + Ac Irr n'augmente pas l'efficacité de la chimiothérapie. Au terme de l'expérimentation (J21) les volumes tumoraux moyens sont similaires dans ces deux groupes de traitement : 3117 ± 356 mm^3 (courbe bleue) et 2519 ± 502 (courbe rouge) respectivement pour la Dox et la combinaison Dox + Ac Irr (Figure 31B).

L'addition de l'Ac aNTN1 à la Dox ralentit la croissance tumorale dès le 18ème jour post greffe : une différence entre les courbes d'évolution tumorale de ces deux groupes est alors visible (Figure 31B). Le volume tumoral moyen est de 1750 ± 271 mm^3 pour les animaux traités avec la Dox (courbe bleue) et de 1258 ± 503 mm^3 pour ceux ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1 (Courbe verte). Ce ralentissement de la progression tumorale est maintenu jusqu'à la fin du traitement. A ce moment là, le volume tumoral moyen atteint 3117 ± 356 mm^3 pour le groupe Dox (courbe bleue) et 2028 ± 586 mm^3 pour celui traité avec la combinaison Dox + Ac aNTN1 (courbe verte) (Figure 31B).

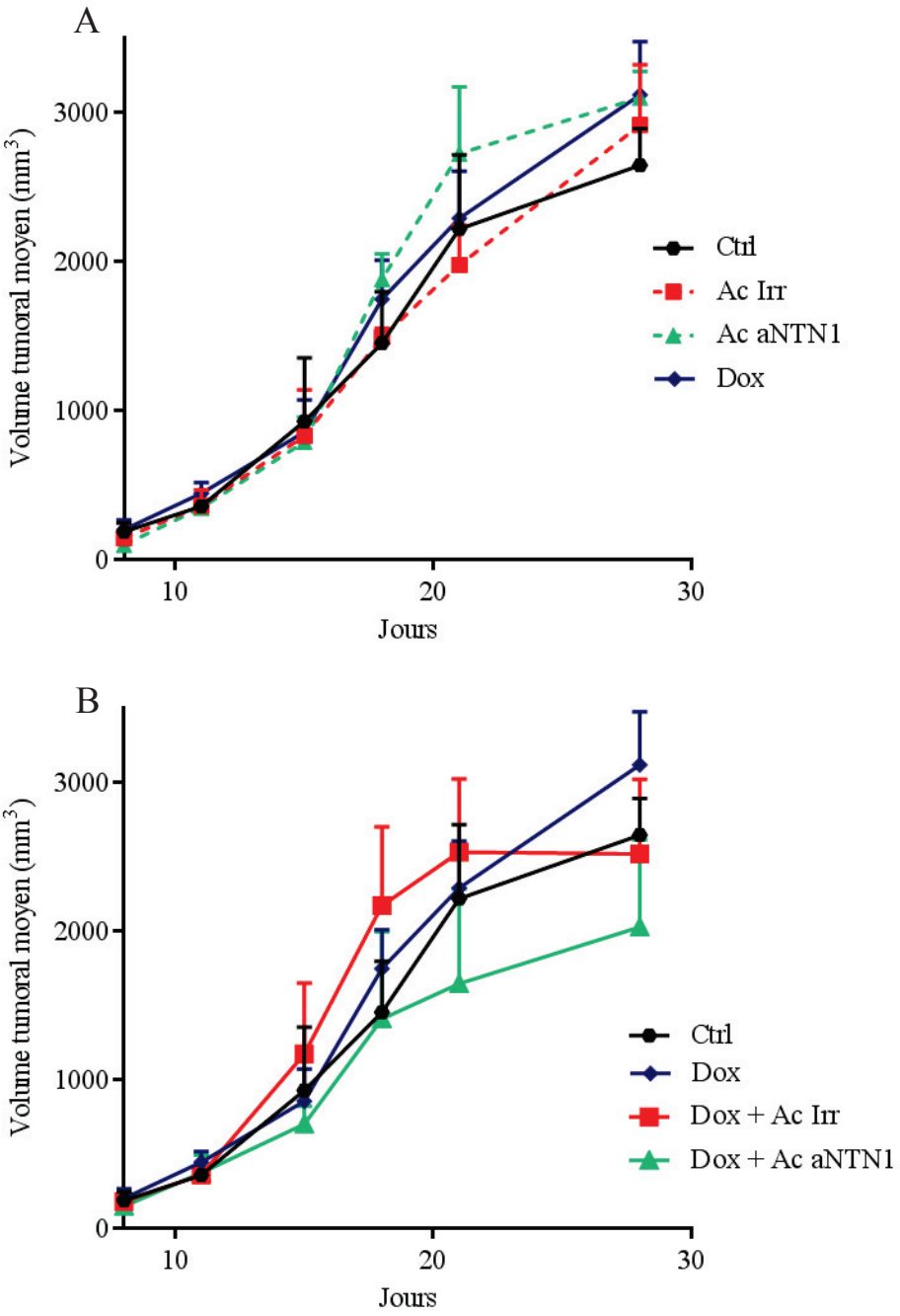


Figure 31 : Evolution de l'ostéosarcome progressif en réponse Ac aNTN1 seul ou en combinaison avec Dox

(A) Progression de l'ostéosarcome en réponse aux différents traitements administré en monothérapie (B) Progression de l'ostéosarcome en réponse aux différentes combinaisons thérapeutiques. La progression tumorale est évaluée bi hebdomadairement à partir du J8 post greffe par mesure de deux diamètres perpendiculaires. Seule la combinaison Dox + Ac aNTN1 induit un ralentissement de la progression tumorale ($p>0.05$)

Le suivi de la croissance tumorale par IRM confirme les mesures des volumes tumoraux. Cet examen d'imagerie a été effectué au premier jour (J8 post greffe), en milieu

(J16) et en fin (J21) de traitement. Une importante croissance tumorale est observée au cours du temps dans les groupes contrôle et traités à la (Dox) (Figure 32 entre J8 et J21 pour les groupes Ctrl et Dox). Au contraire, une progression tumorale plus lente est observée entre J1 et J8 sur les rats recevant la combinaison Dox + Ac aNTN1. Cette progression tumorale semble se stabiliser entre J16 et J21 (Figure 32).

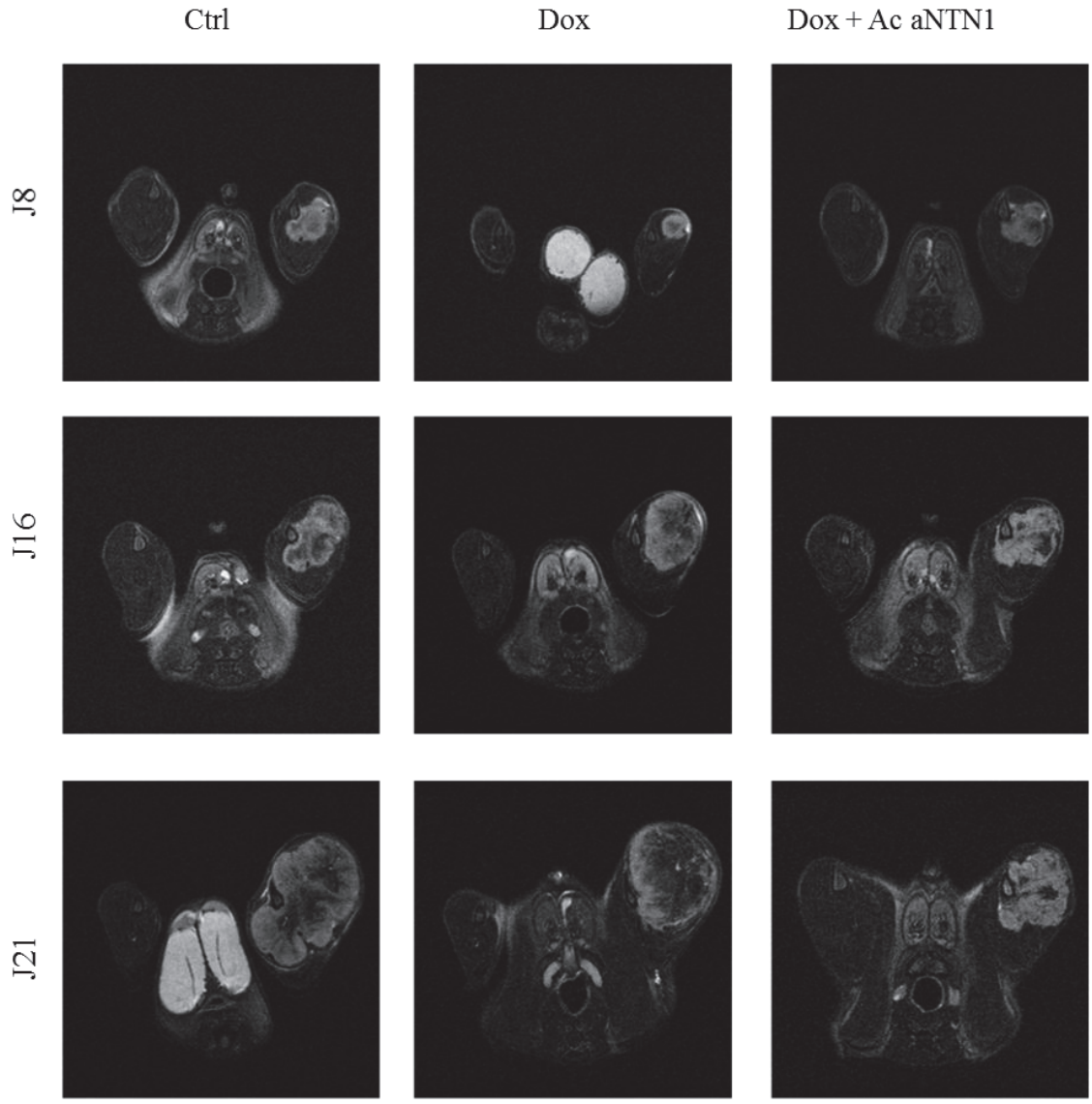


Figure 32 : Réponse aux traitements suivie par IRM

Par groupe de traitement 3 rats ont été suivis par IRM. Des coupes axiales (T1 ou T2) montrent une progression rapide des tumeurs des animaux des groupes contrôle (Ctrl) et Dox alors que les tumeurs des animaux recevant la combinaison Dox + Ac aNTN1 progressent moins vite et se stabilisent même en fin d'expérimentation

L'inhibition maximale de la progression tumorale est obtenue à J21 après implantation de la tumeur soit après 5 traitements. La réponse tumorale aux anticorps administrés en monothérapie ou combinés à la Dox est appréciée par rapport au traitement de référence Dox.

Aucune inhibition de la progression tumorale n'est constatée dans les groupes traités par l'Ac Irr et l'Ac aNTN1 (Figure33). La combinaison Dox + Ac Irr ne présente pas non plus d'effet inhibiteur sur la progression tumorale (+ 14,81 %). La combinaison Dox + Ac aNTN1 entraine une inhibition de 33,08 % de la croissance tumorale par rapport au traitement conventionnel (Figure 33).

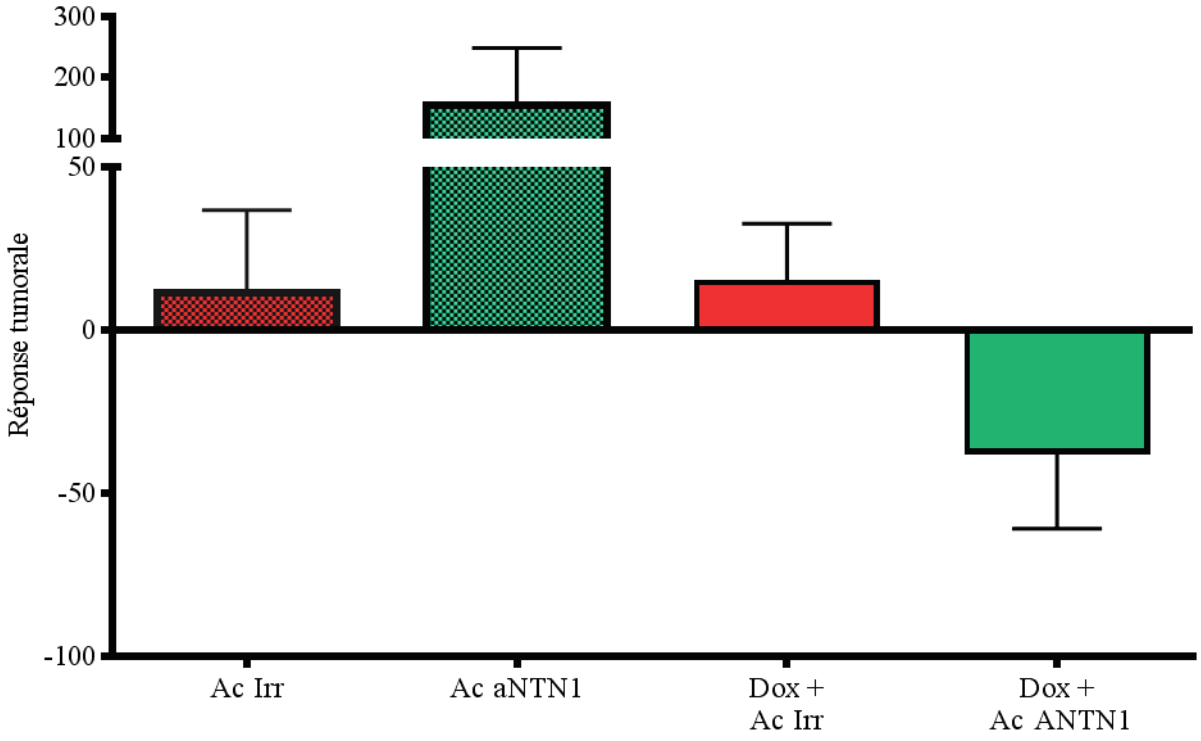


Figure 33 : Effets des traitements sur progression tumorale par rapport à la Dox

La réponse au traitement des ostéosarcomes a été calculée par rapport au traitement conventionnel de chimiothérapie (Dox) au moment où l'inhibition est la plus forte (J21). La combinaison Dox + Ac aNTN1 cause une inhibition de la croissance tumorale. A l'inverse aucun autre traitement monothérapie ou en combinaison avec la Dox n'induit de ralentissement progression tumorale (p>0.05)

Ce ralentissement de la progression tumorale se traduit par une amélioration significative de la survie des animaux traités avec la combinaison Dox + Ac aNTN1 comparativement aux autres groupes de traitement (Figure 34). La médiane de survie est de 18 jours post greffe pour les groupes ayant reçu la Dox seule ou en combinaison avec l'Ac Irr alors que dans le groupe traité avec la combinaison Dox + Ac aNTN1 la médiane de survie n'est pas atteinte en fin d'expérimentation. Effectivement 67 % des animaux ayant reçu cette combinaison n'ont pas atteint le volume tumoral limite fixé à 2500 mm^3 à la fin de l'expérience (p=0.0397).

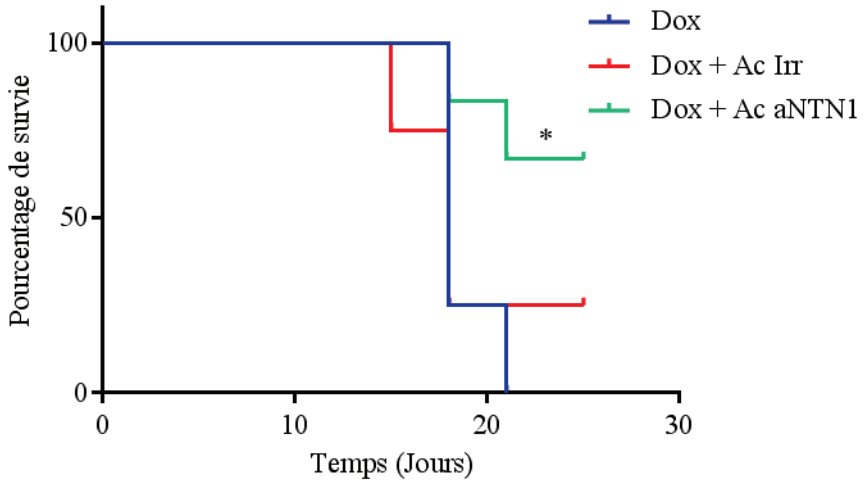


Figure 34 : Courbes de survie des animaux porteurs d'ostéosarcome en fonction des traitements
La médiane de survie des animaux ayant été traité avec la Dox ou la combinaison Dox + Ac Irr a été atteinte 18 jours après la greffe de la tumeur. Pour les animaux ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1, la médiane de survie n'est pas atteinte à la fin de l'expérimentation ($p<0.05$)

La première évaluation thérapeutique montre que tout comme la Dox, l'Ac aNTN1 administré en monothérapie ne ralentit pas la progression de l'ostéosarcome. Cependant, la combinaison de ces deux agents cause un ralentissement important de la progression de la tumeur primaire.

Le modèle d'ostéosarcome de rat étant spontanément métastatique, nous avons pu mesurer l'effet de chacun de ces traitements à ralentir la dissémination métastatique dans ces conditions de traitement. Ceci est d'autant plus intéressant puisque la NTN1 est décrite comme activement impliquée dans la migration cellulaire [304].

b. La combinaison Dox + Ac aNTN1 réduit la dissémination métastatique de l'ostéosarcome

L'effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur la dissémination métastatique est apprécié par comptage des métastases pulmonaires visibles macroscopiquement au moment de la mise à mort des animaux des groupes de traitements présentés précédemment.

Les animaux du groupe contrôle présentent en moyenne 6 métastases de diamètre supérieur à 5 mm (d > 5mm). Les animaux ayant reçu l'Ac Irr présentent un envahissement métastatique similaire avec une moyenne de 3 à 6 métastases (d > 5mm) (Figure 35). La Dox

ralentit la dissémination métastatique de l'ostéosarcome progressif : une seule métastase pulmonaire (d > 5mm) en moyenne a été comptée chez les animaux de ce groupe (Figure 35).

L'Ac aNTN1 a un effet sur la dissémination métastatique équivalent à celui obtenu après traitement par la Dox. Les animaux de ce groupe présentent moins de métastases que le groupe contrôle ou traité avec l'Ac Irr : en moyenne une seule métastase pulmonaire (d > 5mm) a été observée dans le groupe traité par l'Ac aNTN1 en monothérapie (Figure 35).

La combinaison Dox + Ac aNTN1 réduit drastiquement la dissémination métastatique de l'ostéosarcome progressif. En effet, seuls 17 % des animaux ayant reçu le traitement combiné présentent des métastases pulmonaires (d > 5mm) alors que dans les autres groupes de traitement ce pourcentage s'élève entre 75 et 100 % (Figure 35).

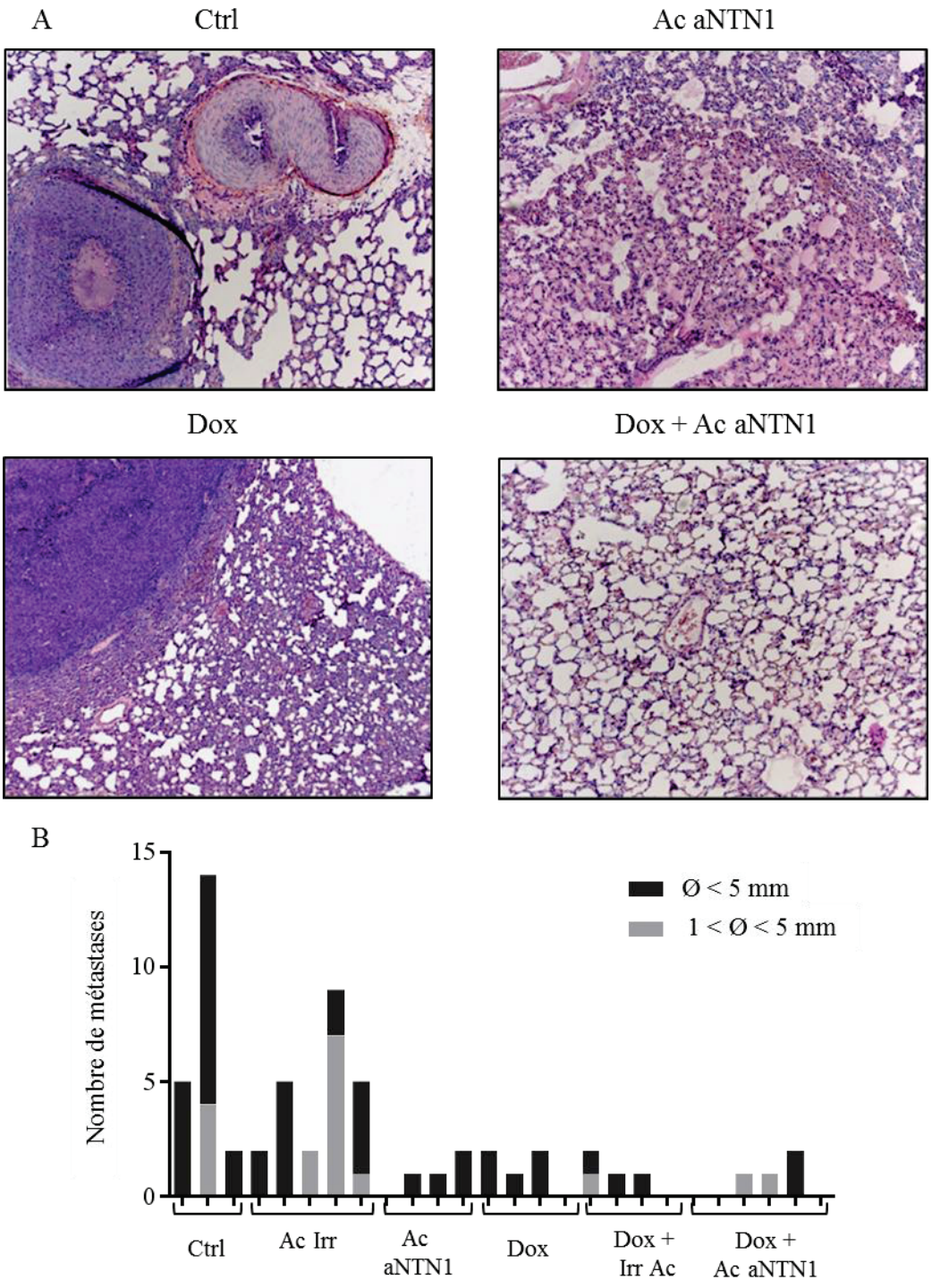


Figure 35 : Ac aNTN1 et dissémination métastatique de l'ostéosarcome progressif

L'effet anti métastatique de l'Ac aNTN1 a été apprécié par comptage de métastases pulmonaires lors de la mise à mort des animaux. (A) : colorations HPS des poumons des animaux en fonction du groupe de traitement. (B) : comptage de métastases pulmonaire pour chaque animal des groupes de traitement.

L'Ac aNTN1 montre un effet anti-métastatique en monothérapie, accentué lors de sa combinaison avec la Dox. Après avoir montré l'effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur

la progression et la rechute tumorale avons évalué l'efficacité de la combinaison Dox + Ac aNTN1 dans un modèle de rechute d'ostéosarcome de rat.

3. La combinaison Dox + Ac aNTN1 retarde la rechute de l'ostéosarcome

Pour évaluer la capacité de combinaison Dox + Ac aNTN1 à ralentir la rechute de l'ostéosarcome, tous les animaux porteurs d'un ostéosarcome progressifs à J8 post implantation du greffon tumoral ont reçu deux traitements de Dox, avant d'être soumis à résection R2 de leur tumeur. Après la chirurgie les animaux ont été traités par Dox seule ou combinée à l'Ac Irr ou l'Ac aNTN1.

La Dox ne ralentit pas la récidive tumorale après la résection (courbe bleue) (Figure 36A). De même, la combinaison Dox + Ac Irr (courbe rouge) ne présente aucun effet sur la rechute tumorale comparativement à la chimiothérapie conventionnelle. Après 26 jours de traitement les tumeurs atteignent respectivement 1510 ± 384 mm^3 et 1731 ± 431 mm^3 pour les animaux traités avec la Dox ou avec la combinaison Dox + Ac Irr (Figure 36A). A la fin de l'expérimentation, l'addition de l'Irr Ac à la Dox ne présente aucun effet sur la rechute tumorale par rapport à la chimiothérapie. Cette combinaison cause un taux d'inhibition tumorale de +0.13 ± 24 % en comparaison avec Dox (Figure 36B).

A contrario, un retard significatif de la rechute et de la progression tumorale est observé dès 4 jours seulement après la résection R2 chez les animaux traités à la Dc + Ac aNTN1 : à ce moment-là, le volume tumoral moyen était de 527 ± 55 mm^3 et de 349 ± 60 mm^3 pour les animaux du groupe Dox (courbe bleue) et ceux du groupe Dox + Ac aNTN1 (courbe verte) (Figure 36A) ($p<0.05$). Ce retard dans la croissance tumorale induit par ce traitement est maintenu jusqu'à la fin de l'expérimentation. En effet, les volumes tumoraux atteignaient respectivement 1303 ± 325 mm^3 et 588 ± 223 mm^3 pour le groupe Dox (courbe bleue) et le groupe Dox + Ac aNTN1 (courbe verte) ($p= 0.0309$) (Figure 36A). De plus, alors qu'aucun effet de la combinaison Dox + Ac Irr n'est observé à la fin du traitement sur l'inhibition tumorale, à ce moment-là, le traitement combiné Dox + Ac aNTN1 induit un retard dans la progression tumoral de 59.7 ± 13 % ($p=0.057$) (Figure 36B).

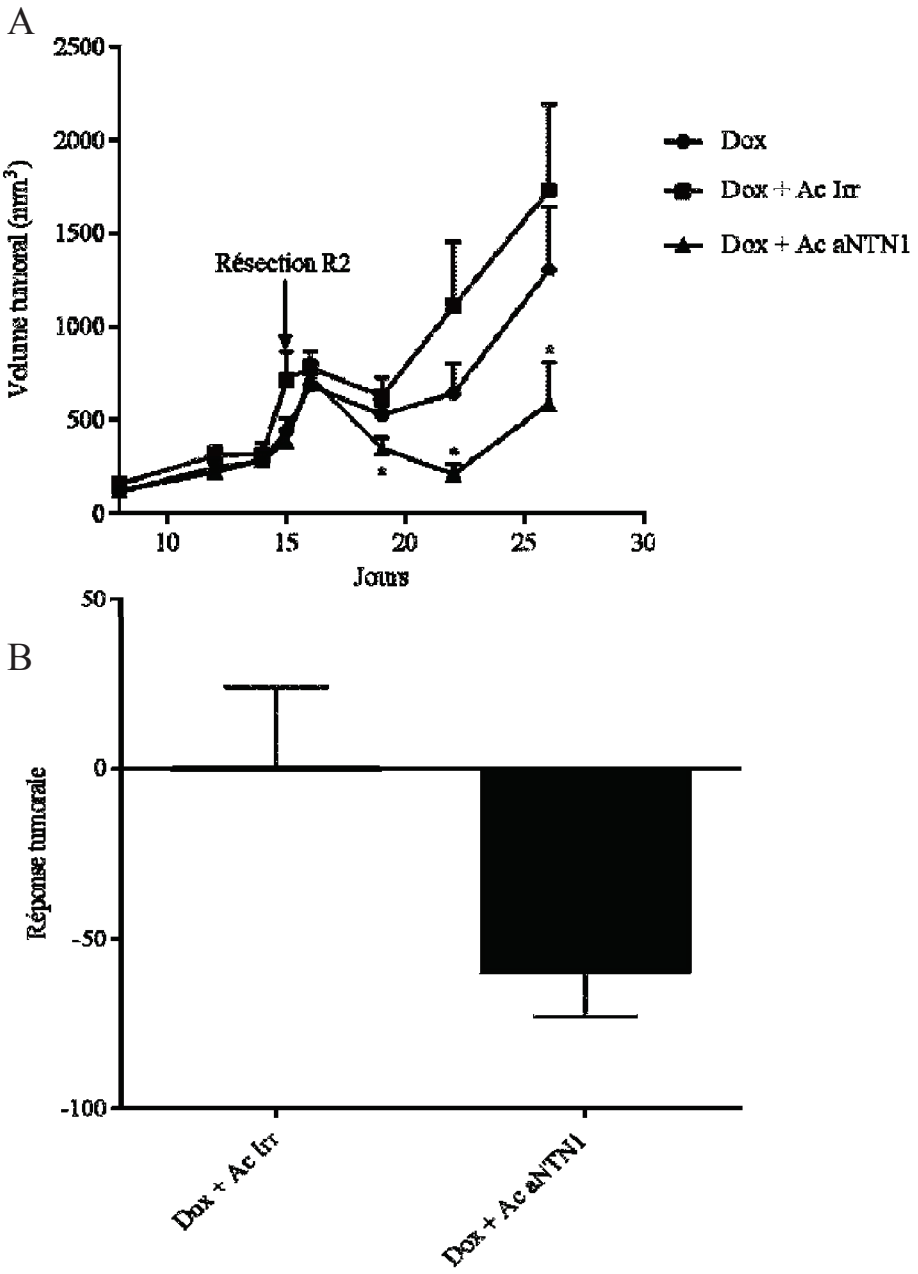


Figure 36 : Evolution de l'ostéosarcome en rechute en fonction des traitements

(A) Progression de l'ostéosarcome en rechute en fonction des différentes combinaisons thérapeutiques. (B) La réponse au traitement des ostéosarcomes a été calculée par rapport au traitement conventionnel de chimiothérapie (Dox) au moment où l'inhibition est la plus forte (J28). La croissance tumorale est suivie dès la détection de la tumeur à J8 jusqu'à ce que le volume tumoral atteigne une limite de 2500 mm^3. Après 2 traitements par chimiothérapie et une résection R2, les animaux sont répartis dans les 3 groupes de traitement. Le groupe traité à la Dox + Ac aNTN1 présente une forte inhibition de la croissance tumorale (- $p<0.05$).*

L'une des conséquences de ce retard de la rechute tumorale induit par la combinaison Dox + Ac aNTN1 est une amélioration significative de la survie des animaux dans ce groupe. La médiane de survie des animaux traités avec la Dox est de 24,5 jours après le début du

traitement. Il faut attendre le 33ème jour pour qu'elle soit atteinte dans le groupe ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1 (p=0.0117) (Figure 37).

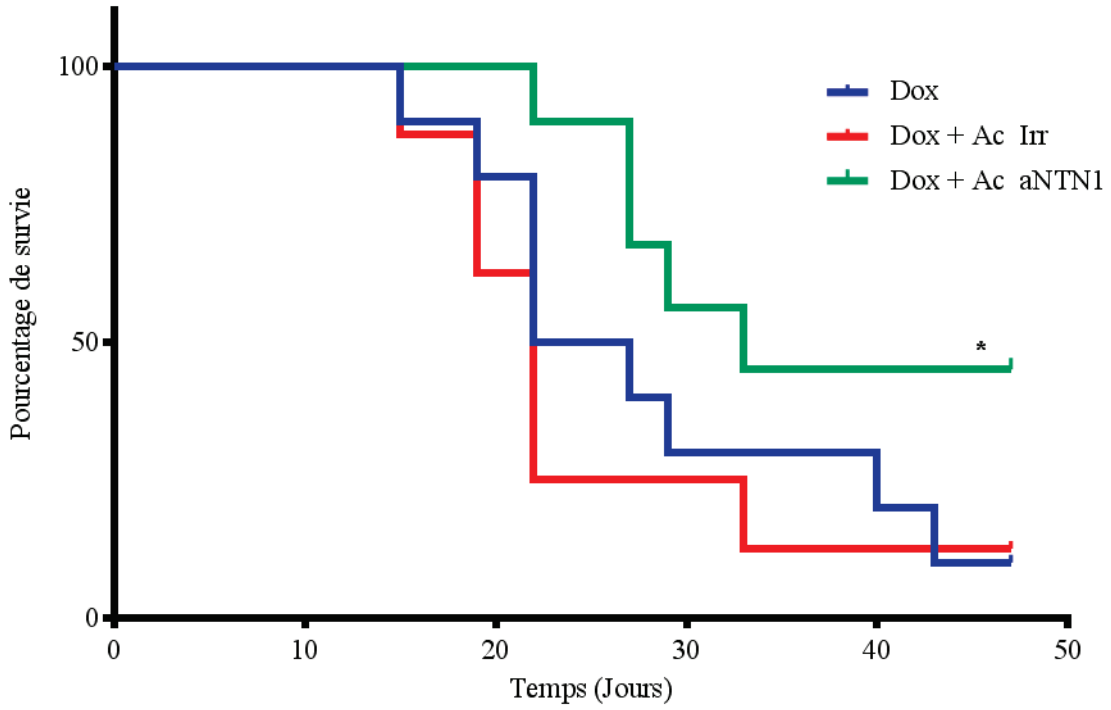


Figure 37 : Courbes de survie des animaux porteurs d'ostéosarcome en fonction des traitements
Courbe de survie des animaux en fonction de la réponse aux traitements. La médiane de survie des animaux ayant été traité avec de la Dox ou de la Dox + Ac Irr a été atteinte 24 ou 22 jours après la greffe de la tumeur. Pour les animaux ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1, la médiane de survie est atteinte 33 jours après la greffe(- p<0.05)*

À la fin de l'expérimentation, seulement 10 % des rats traités avec la Dox n'ont pas rechuté. Ce pourcentage atteint 12 % pour le groupe ayant reçu la combinaison Dox + Ac Irr et 40 % pour le groupe traité par Dox + Ac aNTN1, indiquant un effet inhibiteur de la rechute de l'ostéosarcome de cette combinaison thérapeutique.

Récapitulatif des résultats – Axe II

Dans cette deuxième partie de notre travail nous avons évalué l'effet thérapeutique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 dans un modèle progressif et dans un modèle de rechute de l'ostéosarcome. Ces modèles nous ont permis de mettre en évidence que :

- La combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit la progression de l'ostéosarcome primaire

- La combinaison Dox + Ac aNTN1 permet également de diminuer la dissémination métastatique de l'ostéosarcome par rapport à la chimiothérapie seule

- La combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit et prévient la récidive tumorale de l'ostéosarcome et améliore significativement la survie des animaux

En conclusion : Au vu de l'effet anti-tumoral et anti-métastatique de la combinaison Dox + Ac aNTN1, nous nous sommes intéressés aux possibles mécanismes d'action de cette combinaison sur l'environnement tumoral.

III- Mécanismes d'action de l'Ac aNTN1 sur l'ostéosarcome et son environnement

Après avoir mis en évidence les effets anti-tumoraux de la combinaison Dox +Ac aNTN1, nous nous sommes intéressés aux possibles mécanismes d'actions de cette combinaison thérapeutique.

L'effet anti-tumoral peut être dû à une addition de l'action cytotoxique de la Dox combinée à une action pro-apoptotique de l'interférence à la NTN1 sur les cellules d'ostéosarcome. Des tests de mort cellulaire sur lignées d'ostéosarcome n'ont pas révélé une action pro-apoptotique accrue de la combinaison Dox + Ac aNTN1 ; nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation d'apoptose dans les tumeurs des animaux d'aucun des groupes de traitement.

Nous nous sommes alors intéressés aux autres voies physiologiques impliquant la NTN1 comme la migration cellulaire, la vascularisation et les capacités chimio attractive ou polarisatrice des effecteurs de l'immunité. L'effet thérapeutique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 résulterait de l'action cytotoxique de la Dox sur les cellules tumorales et de l'effet de l'Ac aNTN1 sur l'environnement de l'ostéosarcome. Nous avons testé ces différentes hypothèses en analysant l'environnement tumoral par marquages immunohistochimiques et par des modélisations *in vitro* permettant d'analyser l'effet de l'Ac aNTN1 sur la migration des cellules d'ostéosarcome et sur la polarisation des macrophages.

1. Ac aNTN1 diminue la migration des cellules d'ostéosarcome

L'Ac aNTN1 induisant, seul ou combiné à la Dox, une diminution de la dissémination métastatique de l'ostéosarcome nous avons évalué plus en détail l'effet de cet Ac sur la migration de cellules d'ostéosarcome. Pour ce faire, nous avons mis en place un test migration *in vitro* en temps réel sur la lignée cellulaire MNNG/HOS.

Pour ces cellules, un profil de migration linéaire observé entre 10h et 30h après ensemencement dans la chambre de culture supérieure (Figure 38A). L'ajout de l'Irr Ac au contact des cellules d'ostéosarcome ne modifie ni ce profil ni la vitesse de migration (Figure 38A). Le profil de migration des cellules MNNG/HOS en présence de l'Ac Irr est

superposable au contrôle (Figure 38A) : les 2 indices de migration (pentes des courbes) sont quasiment identiques avec des valeurs de 0.048 et 0.047 (Figure 38B).

A contrario, l'ajout de l'Ac aNTN1 induit un ralentissement de la migration des cellules vers le chimioattractant (SVF). Si la migration des cellules commence 10 h après la mise en culture et atteint aussi un plateau après 30 h (Figure 38A), l'indice de migration est nettement plus faible à 0.032 (Figure 38B).

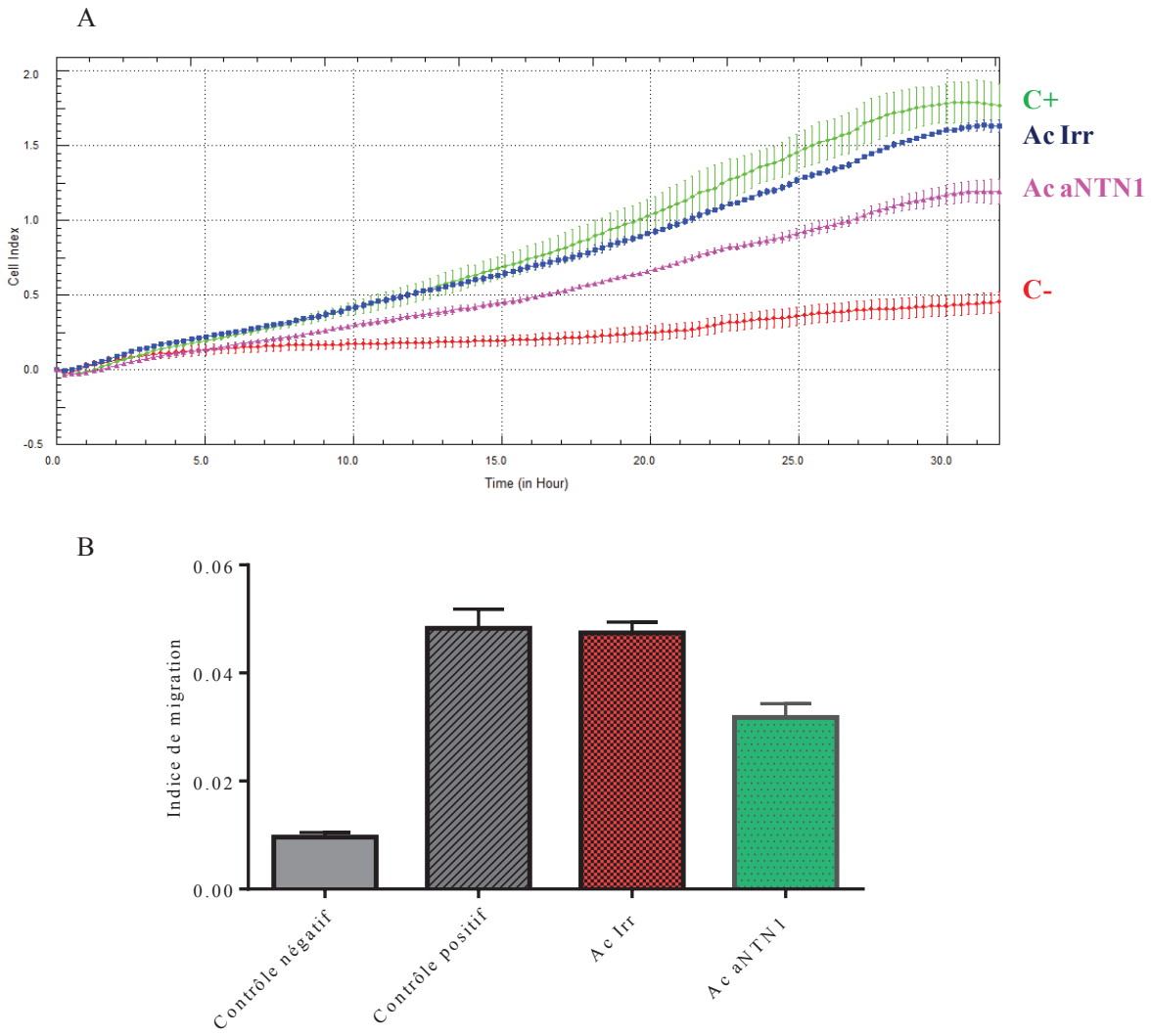


Figure 38 : Effet de l'Ac aNTN1 sur la migration des cellules d'ostéosarcome

(A)Le profil de migration des MNNG/HOS en présence SVF dans la chambre inférieure induit une migration de 10 h à 30 h avant d'atteindre un plateau, (B) Indice de migration pour chaque traitement. Seul l'Ac aNTN1 ralentit la migration des cellules (p>0.05).

La Dox induit un changement du profil de migration des cellules MNNG/HOS : la migration des cellules commence dès 8h après leur mise en culture et un plateau est atteint à partir de 17 h. Ce profil de migration plus faible (0.017) peut être expliqué par l'action

cytotoxique de la Dox utilisée pourtant à une concentration sous IC50 (Figure 39A). L'ajout de l'Ac Irr à la Dox ne modifie ni le profil ni la vitesse de migration des cellules d'ostéosarcome. Les profils de migration sont superposables et les indices de migration cellulaires sont similaires avec des valeurs de 0.017 en présence de Dox et 0.016 pour la combinaison Dox + Ac Irr (Figure 39B).

La combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit la migration des cellules MNNG/HOS. Si la migration cellulaire est toujours observable entre 8 h et 17 h après mise en culture, l'indice de migration cellulaire est plus faible 0.012 (Figure 39). Nous mettons en évidence ici, que la combinaison Dox + Ac aNTN1 est capable de diminuer les capacités de migration des cellules MNG/HOS *in vitro.*

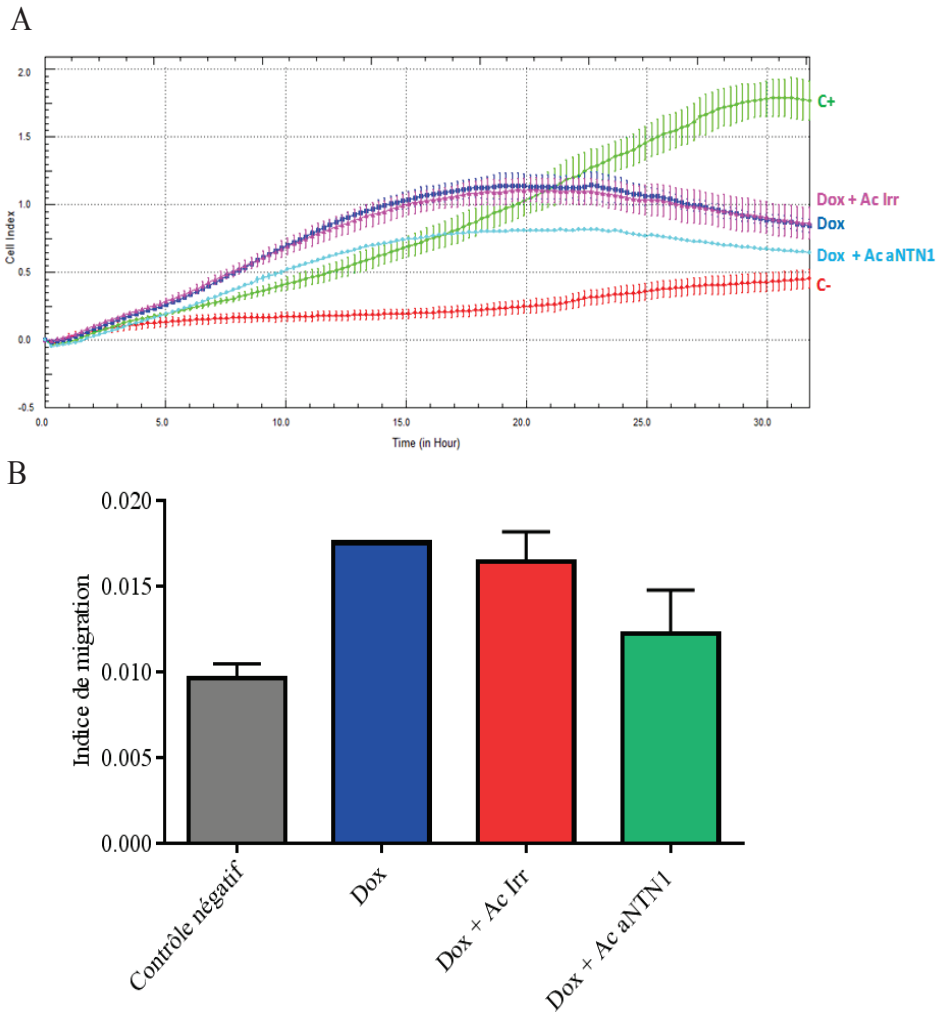


Figure 39 : Effet de l'Ac aNTN1 combiné à la Dox sur la lignée MNNG/HOS

(A) Le profil de migration des MNNG/HOS en présence Dox dans la chambre supérieure induit une migration de 8 h à 17 h avant d'atteindre un plateau, (B) Indice de migration pour chaque traitement. Seule la combinaison Dox + Ac aNTN1 ralentit la migration des cellules (p>0.05).

Ces résultats montrent la capacité de l'Ac aNTN1 utilisé seul ou en combinaison avec la Dox à ralentir la migration des cellules d'ostéosarcome MNNG/HOS. L'effet observé *in vitro* peut expliquer en partie l'effet de la combinaison sur la dissémination métastatique observé dans le modèle *in vivo*. Si une diminution de la migration cellulaire peut être à l'origine de la réduction de l'envahissement métastatique, un effet de l'Ac aNTN1 sur l'angiogenèse tumorale peut aussi être impliqué. Nous avons alors étudié la densité vasculaire tumorale en réponse aux différents traitements.

2. Ac aNTN1 diminue la densité vasculaire de l'ostéosarcome

Il a été décrit que des cellules endothéliales présentant une expression membranaire de CD146 (MCAM) peuvent induire l'angiogenèse en présence de NTN1 dans le milieu environnant [305]. Au cours des expérimentations in vivo nous avons pu mettre en évidence l'effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur la progression et la récidive tumorale et la dissémination métastatique ; ces processus nécessitent la mise en place d'angiogenèse tumorale. Afin de vérifier la potentielle action anti-angiogénique de ce traitement, nous avons analysé la densité de la vascularisation tumorale pour chaque traitement dans les modèles de tumeurs progressives et de rechutes d'ostéosarcome.

a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 diminue la densité vasculaire de l'ostéosarcome progressif

Une vascularisation dense et anarchique est présente dans les tumeurs des animaux contrôle ou traités par la Dox ou par la combinaison Dox + Ac Irr (Figure 40). Dans les tumeurs de ces groupes de traitement, un réseau vasculaire dense composé de vaisseaux de large diamètre et pouvant être regroupés en amas est observé (Figure 40).

Le traitement par la combinaison Dox + Ac aNTN1 modifie ce réseau vasculaire. Les tumeurs des animaux de ce groupe de traitement présentent des vaisseaux plus petits et moins nombreux (Figure 40).

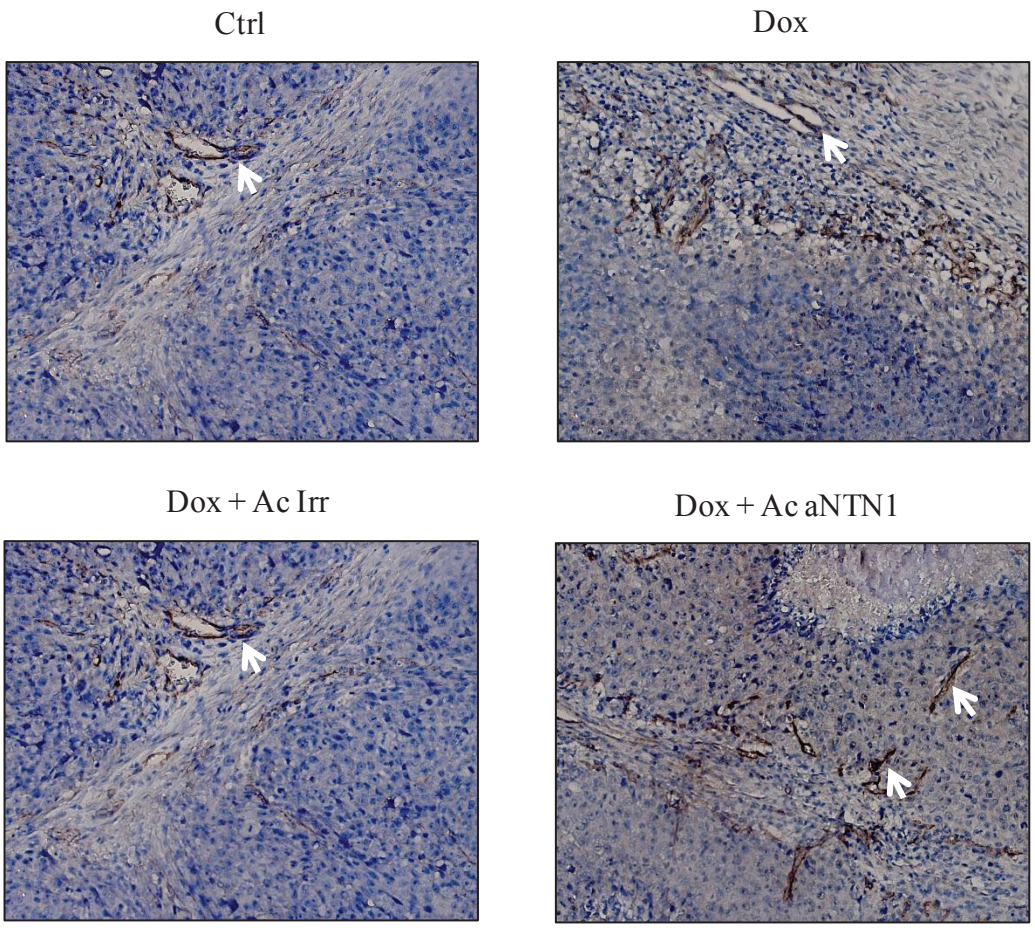


Figure 40 : Vascularisation de l'ostéosarcome progressif en réponse aux traitements
Marquage des cellules endothéliales des vaisseaux par l'ac CD146 permet visualiser la paroi des vaisseaux en marron (flèche blanche). Une diminution de la densité vasculaire est induite en réponse au traitement combiné et des vaisseaux plus petits que dans autres groupes sont observés.

Nous avons ensuite analysé vascularisation tumorale dans les rechutes d'ostéosarcome.

b. La combinaison Dox + Ac aNTN1 diminue la densité vasculaire de la rechute d'ostéosarcome

Dans ce modèle tout comme dans le modèle d'ostéosarcome progressif, on observe qu'une vascularisation dense et anarchique est présente dans les tumeurs des animaux contrôle ou traités par la Dox ou par la combinaison Dox + Ac Irr (Figure 41). Dans les tumeurs de ces groupes de traitement, un réseau vasculaire dense composé de vaisseaux de large diamètre et pouvant être regroupés en amas est observé (Figure 41).

La vascularisation des tumeurs ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1est différente : de petits amas vasculaires avec des vaisseaux de diamètre plus faible sont observés (Figure 41).

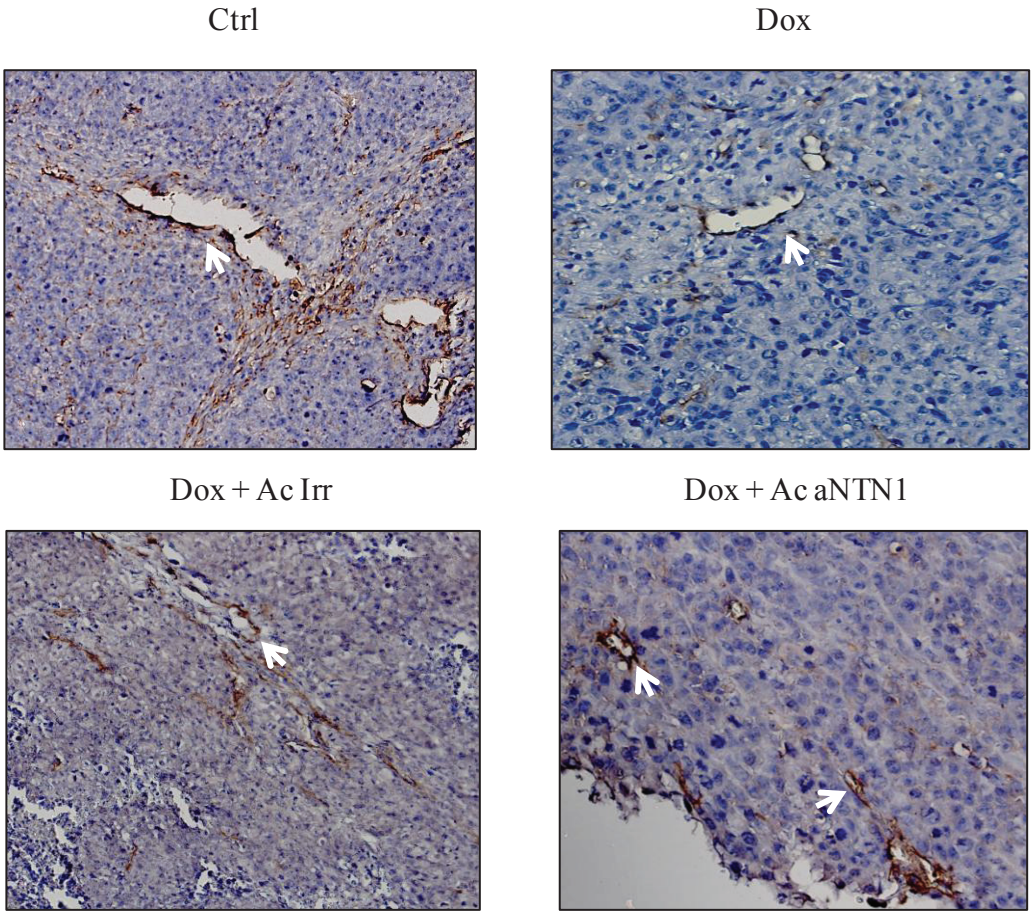


Figure 41 : Vascularisation de la rechute d'ostéosarcome en réponse aux traitements
Marquage des cellules endothéliales des vaisseaux par l'ac CD146 permet visualiser la paroi des vaisseaux en marron (flèche blanche). Une observation similaireau modèle progressif est faite dans le modèle de rechute

Ces analyses indiquent que la combinaison Dox + Ac aNTN1 a un effet sur la vascularisation de l'ostéosarcome pouvant également expliquer l'effet du traitement sur la progression et la rechute tumorale ainsi que sur la dissémination métastatique de l'ostéosarcome.

Ayant mis en évidence ce premier effet de la combinaison sur l'environnement vasculaire de l'ostéosarcome, nous avons analysé si la combinaison Dox + Ac aNTN1 pouvait agir sur le microenvironnement immunitaire de l'ostéosarcome.

3. Ac aNTN1 et microenvironnement immunitaire de l'ostéosarcome

Les approches d'immunothérapies semblent être prometteuses dans la prise en charge de l'ostéosarcome [306].

Les analyses immunohistochimiques montrent la présence de lymphocytes T $CD3^+$, de lymphocytes effecteurs T $CD8^+$ ainsi que de macrophages $CD163^+$ dans le tissu péri et intra-tumoral des tumeurs progressives ainsi que dans les rechutes tumorales. Des observations et comptages similaires ayant été faits dans les deux modèles nous détaillerons le modèle de rechute tumorale.

a. La combinaison Dox + Ac aNTN1 et infiltrat lymphocytaire de l'ostéosarcome

Infiltrat lymphocytaire péri-tumoral

Que ce soit dans la tumeur progressive ou dans le modèle de rechute tumorale, aucun des traitements utilisés n'induit une modification significative de l'infiltrat lymphocytaire T $CD3^+$ et $CD8^+$ péri-tumoral. La même densité de cellules $CD3^+$ est retrouvée quel que soit le groupe considéré. Dans le modèle de rechute tumorale et dans tous les groupes de traitement, les animaux présentent en moyenne 85 à 88 lymphocytes T $CD3^+$ / champ (Figure 42).

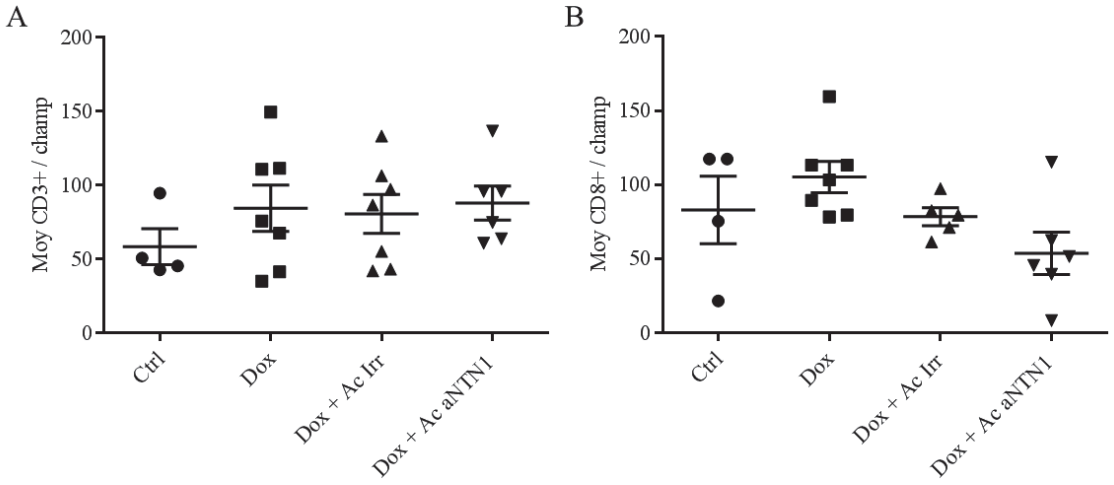


Figure 42 : Infiltrat lymphocytaire péri-tumoral en réponse à la combinaison Dox + Ac aNTN1
(A) Comptage des cellules CD3$^+$ dans environnement péri-tumoral. (B) Comptage des cellules CD8$^+$ dans environnement péri-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200.) (p>0.05)

Infiltrat lymphocytaire intra-tumoral

Des lymphocytes CD3$^+$ et CD8$^+$ sont présents dans la région intra-tumorale du modèle progressif et de rechute d'ostéosarcome de rat. Dans les tumeurs traitées à la Dox ou à la combinaison Dox + Ac Irr, une moyenne de 60 à 76 lymphocytes T CD3$^+$ par champ est observée (Figure 43). Cet infiltrat de cellules T CD3$^+$ et CD8$^+$ est moindre dans les tumeurs du groupe Dox + Ac aNTN1 (Figure 43). En effet en moyenne 41.5 cellules CD3$^+$ / champ sont observées dans les tumeurs de ce groupe de traitement.

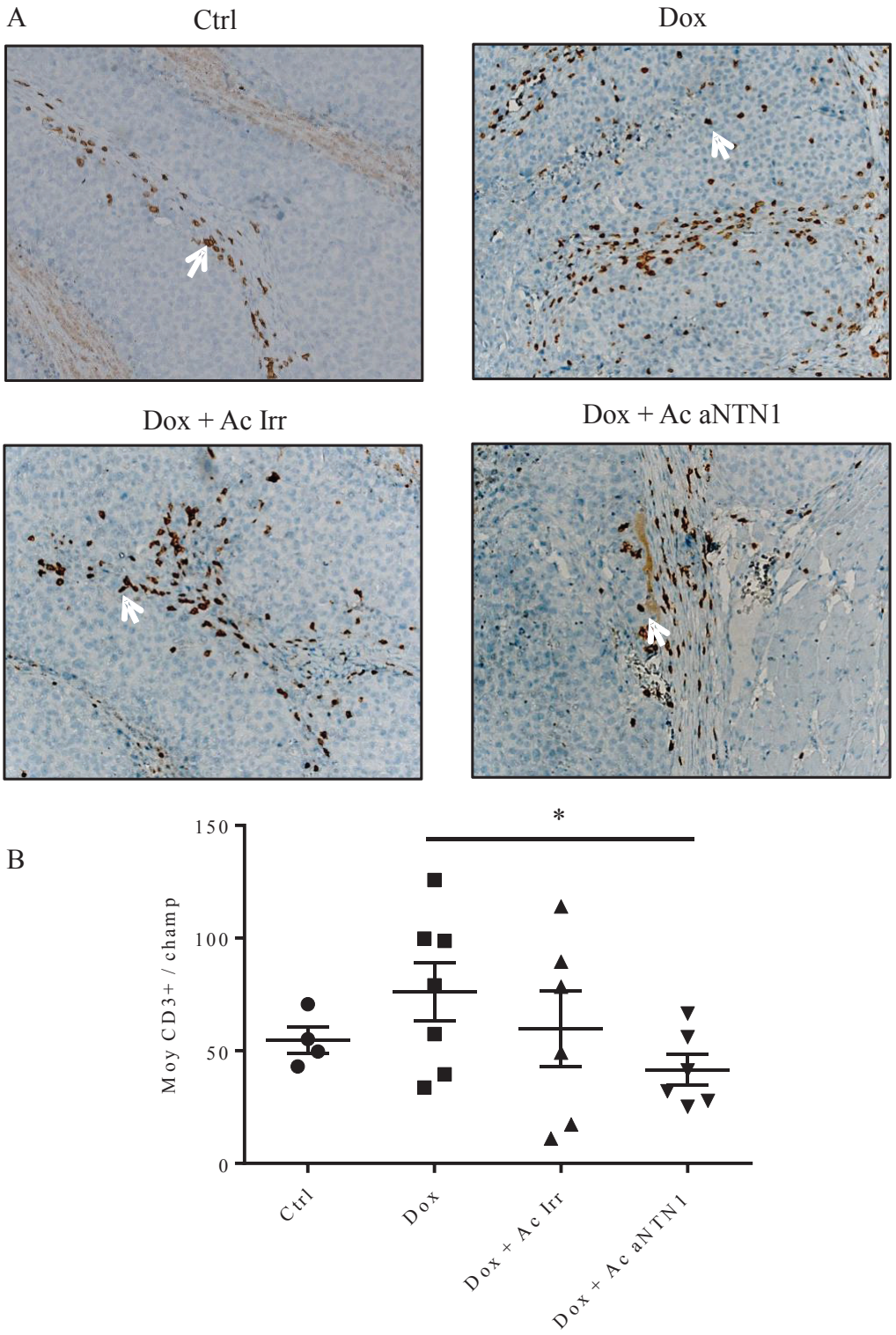


Figure 43 : Infiltrat lymphocytaire CD3$^+$ intra-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1

(A) Marquage CD3$^+$ intra-tumoral indique la présence d'une infiltration de lymphocytes (flèches blanches) dans tumeurs de tous groupes traitement. (B) Comptage des cellules CD3$^+$ dans environnement péri-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200.) (p=0.045)*

Une observation similaire est faite sur l'infiltrat cellules $CD8^+$ intra-tumorale: la Dox + Ac aNTN1 induit une diminution de l'infiltration est observée chez les animaux traités. Effectivement une diminution de 46 % de l'infiltration est notée dans le groupe Dox + Ac aNTN1 en comparaison avec le traitement conventionnel de chimiothérapie, la Dox (Figure 44).

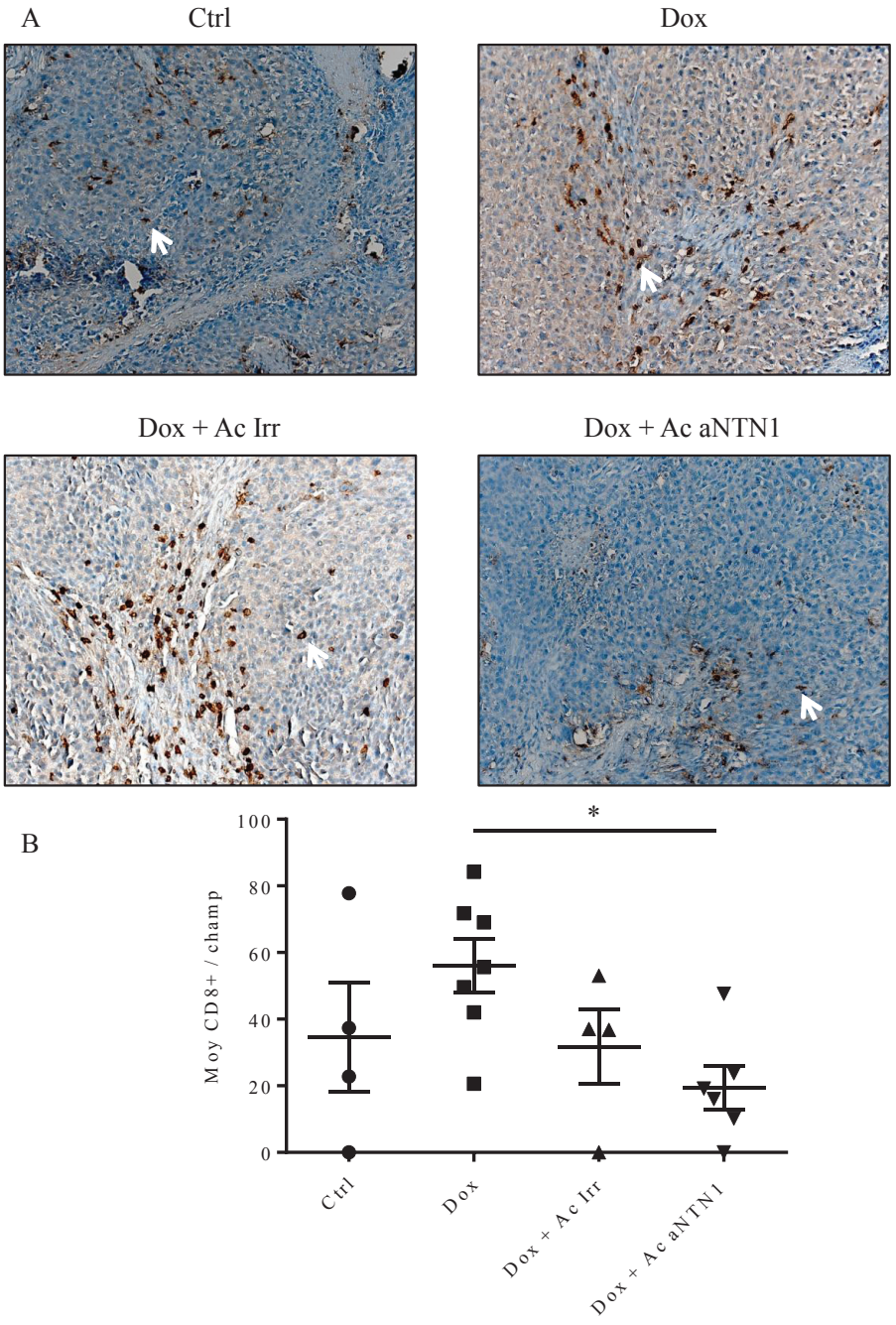


Figure 44 : Infiltrat lymphocytaire $CD8^+$ intra-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1

(A) Marquage $CD8^+$ intra-tumoral indique la présence d'une infiltration de lymphocytes (flèches blanches) dans tumeurs de tous groupes traitement. (B) Comptage des cellules $CD8^+$ dans environnement intra-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200.)(p=0.082)*

Ces analyses immunohistochimiques de l'infiltrat lymphocytaire péri et intra-tumoral montrent que si les traitements ne causent pas une diminution des lymphocytes T CD3 et CD8 péritumoraux, la présence lymphocytaire intra-tumorale est moindre en réponse à la combinaison Dox + Ac aNTN1. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'infiltrat macrophages type M2.

b. La combinsaison Dox + Ac aNTN1 modifie le recrutement des macrophages M2

De manière similaire à l'infiltrat des lymphocytes T, nous avons analysé l'infiltrat des macrophages de type M2 péri et intra-tumoral pour chaque animal inclus dans nos expérimentations. Une modification de l'infiltrat macrophagique intra-tumoral a été observée, aussi bien dans le modèle d'ostéosarcome progressif que dans le modèle de rechute tumorale. Aucune modification de l'infiltrat macrophagique péri-tumoral n'ayant été constatée ni dans le modèle de tumeur progressive ni dans le modèle de rechute seul ce dernier va être présenté.

Infiltration péri-tumorale des macrophages CD163$^+$

Aucun effet des traitements n'est noté au niveau de l'infiltrat de cellules CD163$^+$ peri-tumorales. Une moyenne de 55 à 70 cellules CD163$^+$ par champ est compté quel que soit le groupe de traitement considéré (Figure 45).

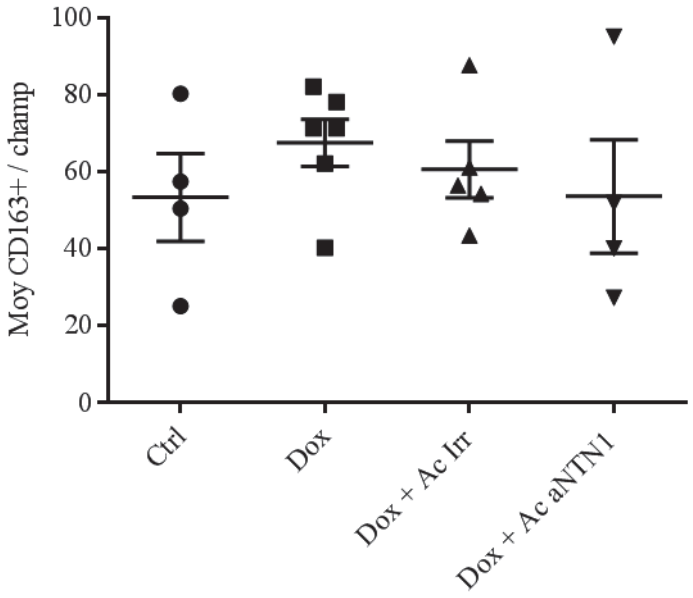


Figure 45 : Infiltrat macrophagique CD163$^+$ péri-tumoral de la récidive d'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1

Comptage des cellules CD163$^+$ dans environnement péri-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200) (p>0.05)

Infiltration intra-tumorale des macrophages CD163$^+$

- Modèle d'ostéosarcome progressif

Dans le modèle d'ostéosarcome progressif une moyenne de 40 cellules CD163$^+$ intra-tumorales / champ est observée dans le groupe contrôle. (Figure 46). La Dox réduit légèrement l'infiltration par rapport au groupe contrôle (25 cellules / champ), l'ajout de l'Ac Irr ne modifie pas cette infiltrat (Figure 46). A contrario, le traitement par l'Ac aNTN1 réduit cette infiltration à 15 cellules / champ. A fortiori, la combinaison Dox + Ac aNTN1 induit une diminution drastique de l'infiltrat de cellules CD163$^+$ puisque 5 cellules CD163$^+$/champ sont observées dans toutes les tumeurs (Figure 46) de ce groupe.

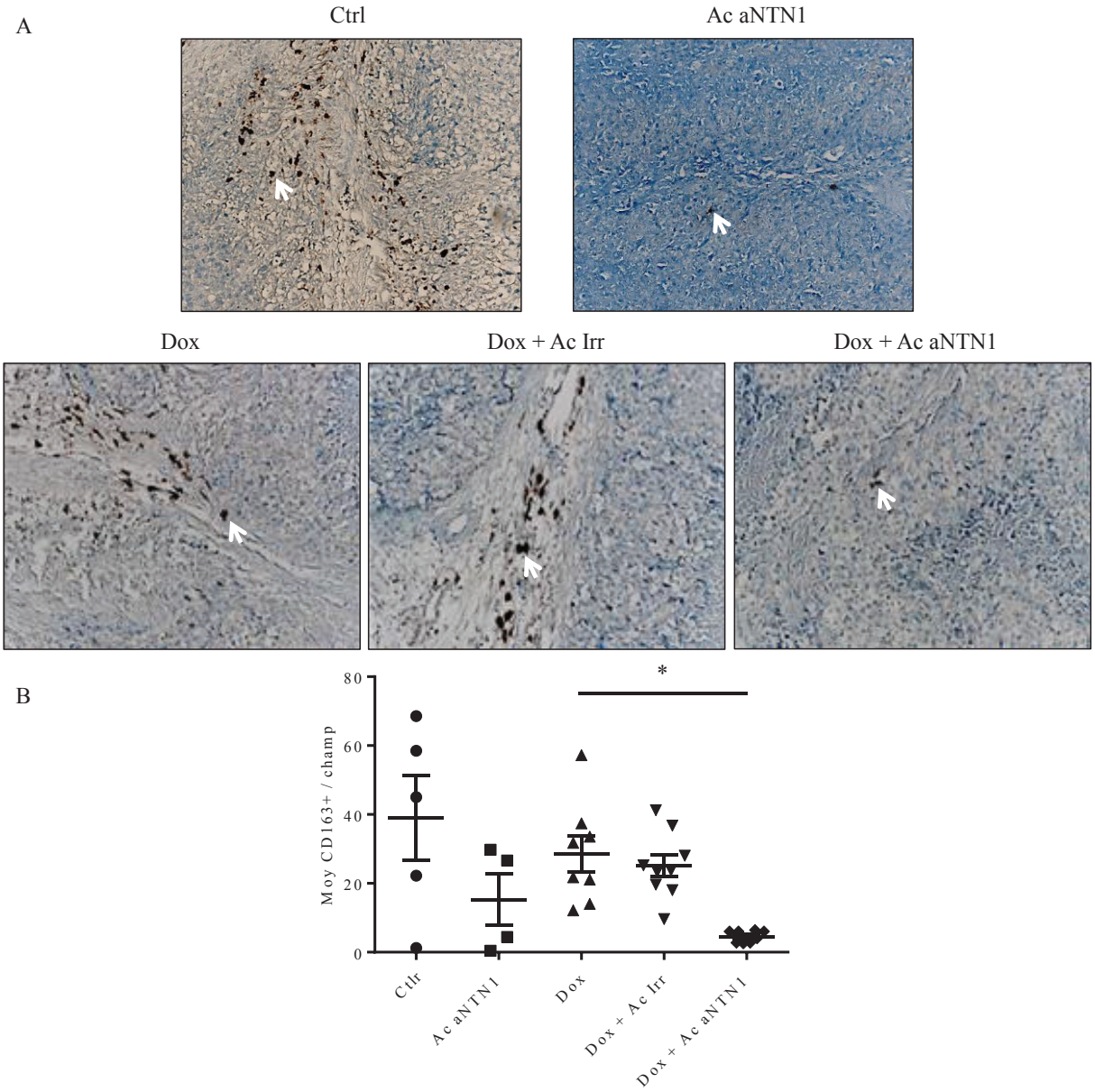


Figure 46 : Infiltrat macrophagique CD163$^+$ intramoral de l'ostéosarcome progressif en réponse à la combinaison de Dox +Ac aNTN1

*(A) Marquage C163$^+$ intra-tumoral indique la présence d'une infiltration de lymphocytes (flèches blanches) dans tumeurs de tous groupes traitement. (B) Comptage des cellules CD163$^+$ dans environnement intra-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200.) (** p=0.0071)*

- Modèle de récidive de l'ostéosarcome

De manière générale l'infiltrat des macrophages CD163$^+$ est plus faible dans ce modèle de rechute tumorale que dans le modèle d'ostéosarcome progressif. En effet, 6 cellules CD163$^+$ /champ sont comptées dans le groupe contrôle. La Dox induit une augmentation de cet infiltrat intra-tumoral avec 16 macrophages CD163$^+$ / champ (Figure 47). L'ajout de l'Ac Irr à la Dox ne modifie pas cette proportion.

Cependant en réponse à la combinaison Dox + Ac aNTN1 une absence de cellules CD163^{+} intra-tumorales est observée pour tous les animaux de ce groupe de traitement (Figure 47).

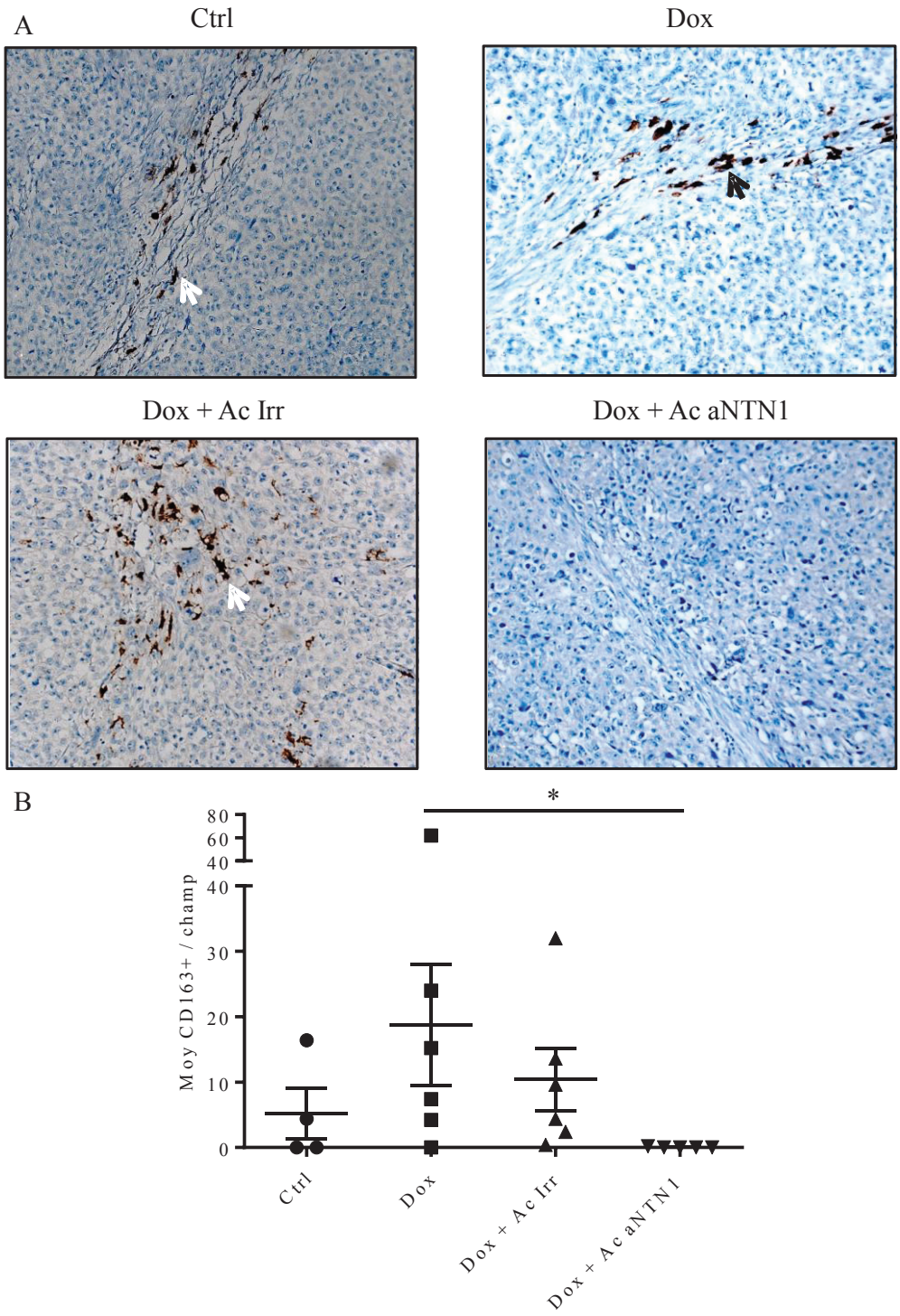


Figure 47 : Infiltrat macrophagique CD163^{+} intramoral de la récidive de l'ostéosarcome en réponse à la combinaison de Dox + Ac aNTN1

(A) Marquage C163^{+} intra-tumoral indique la présence d'une infiltration de lymphocytes (flèches blanches) dans tumeurs de tous groupes traitement. (B) Comptage des cellules CD163^{+} dans environnement intra-tumoral. Moyenne des cellules positives observées sur 5 champs non consécutifs par tumeur (grossissement x200.)

L'Ac aNTN1 seul ou combiné à la Dox cause une diminution importante de l'infiltrat intra-tumoral de macrophages M2 $CD163^+$. Nous avons souhaité confirmer cet effet par des études *in vitro* de l'effet de l'Ac aNTN1 sur la polarisation macrophagique.

c. Effet de l'Ac aNTN1 sur la polarisation des macrophages

Dans cette étude nous avons évalué la capacité de l'Ac aNTN1 à orienter la polarisation des macrophages M2 en M1. Plusieurs études montrent que la NTN1 joue un rôle dans la polarisation des macrophages en favorisant le phénotype M2 (pro-tumoral) [267,307]. Nous avons voulu vérifier si le blocage de l'interaction NTN1 à ses récepteurs à l'aide d'un anticorps spécifique (Ac aNTN1) pouvait inverser cette polarisation et permettre l'établissement d'un environnement immunitaire tumoral plus pro-inflammatoire. Cet essai a été réalisé *in vitro* à partir de macrophages extraits de la moelle osseuse de rat dont les phénotypes ont été analysés à différents temps par cytométrie de flux (FACS).

La polarisation des macrophages issus de la moelle osseuse en sous-type M1 ou M2 est induite respectivement par l'IFNγ ou le TGF-β. Les macrophages M1 et M2 sont caractérisés respectivement par marquage $CD86^+$ et $CD163^+$ sur la population de macrophages totaux $CD68^+$.

Obtentions des macrophages M1 et M2 après polarisation avec l'IFNγ et le TGF-β

Suite à une culture de 24 h en présence des facteurs induisant la différentiation, une proportion de cellules $CD86^+$ de 61 % est obtenue en réponse à l'IFNγ et une proportion de 65 % de cellules $CD163^+$ en réponse au TGF-β. Alors que cette proportion n'est que de 25.5 % et 82.3 % respectivement pour CD86 et CD163 pour macrophages n'ayant pas été soumis à l'une ou l'autre polarisation. (Figure 48).

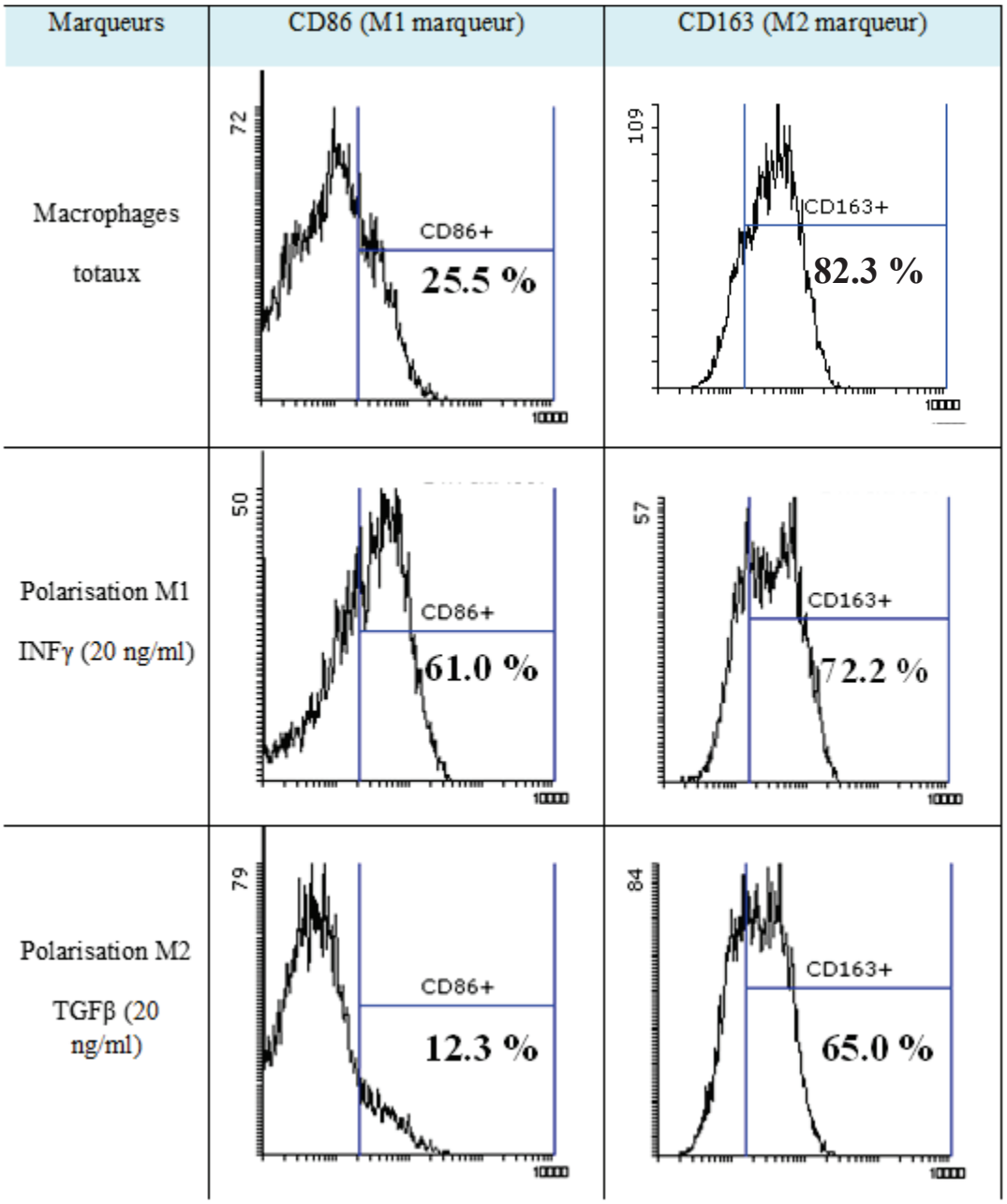


Figure 48 : Polarisation des macrophages par traitement à l'IFNγ et au TGF-β.
Les traitements à l'IFNγ et au TGF-β induisent respectivement les phénotypesM1 et M2 par l'expression de CD86 et CD163.

Les traitements à l'IFNγ et au TGF-β permettent d'orienter respectivement les populations de macrophages vers le phénotype M1 ou M2. Nous avons ensuite évalué la capacité de l'Ac aNTN1 à reverser ou non le phénotype d'origine.

Capacité de l'aNTN1 à polariser in vitro les macrophages M1 en M2

Le traitement par l'Ac aNTN1 des macrophages non polarisés ou polarisés M1 (IFNγ) ne cause pas de changement dans l'expression du marqueur M2 CD163 et du marqueur M1 CD86 (Tableau 21) à la surface de ces cellules. Dans la population de macrophages totaux, les taux de $CD86^+$ et $CD163^+$ sont de 5.96 % et 93.1 % avant traitement à l'Ac aNTN1 et sont de 3.58 % et 95.8 % après le traitement. Pour les macrophages orientés en sous-type M1, ses valeurs sont de 44.5 % et 87.8 % avant traitement à l'Ac aNTN1 et sont de 42.3 % et 89.4 % après le traitement.

Conditions		CD86 (M1 marqueur)	CD163 (M2 marqueur)
Macrophages totaux	Contrôle	5,96	93,1
	Ac aNTN1	3,58	95,8
Macrophages M1	Contrôle	44,5	87,8
	Ac aNTN1	42,3	89,4
Macrophages M2	Contrôle	1,73	90,4
	Ac aNTN1	2,47	30,0

Tableau 21 : Expression des marqueurs CD86 et CD163 dans la population de macrophages totale et M1 en réponse à l'Ac aNTN1

L'expression de CD86 et CD163 n'est pas modifié après traitement à l'Ac aNTN1 dans la population de macrophages totaux et M1. L'expression de CD163 à la surface des macrophages M2 est réduite réponse au traitement avec l'Ac aNTN1

Un effet de l'Ac aNTN1 est noté sur la population de macrophages polarisés M2 par TGF-β : en réponse à l'Ac aNTN1, une diminution de la proportion de cellules positives pour CD163 à la surface est observée. Le pourcentage de cellules CD163+ chute de 90.4 % à 30 % en présence de l'Ac aNTN1 (Figure 49).

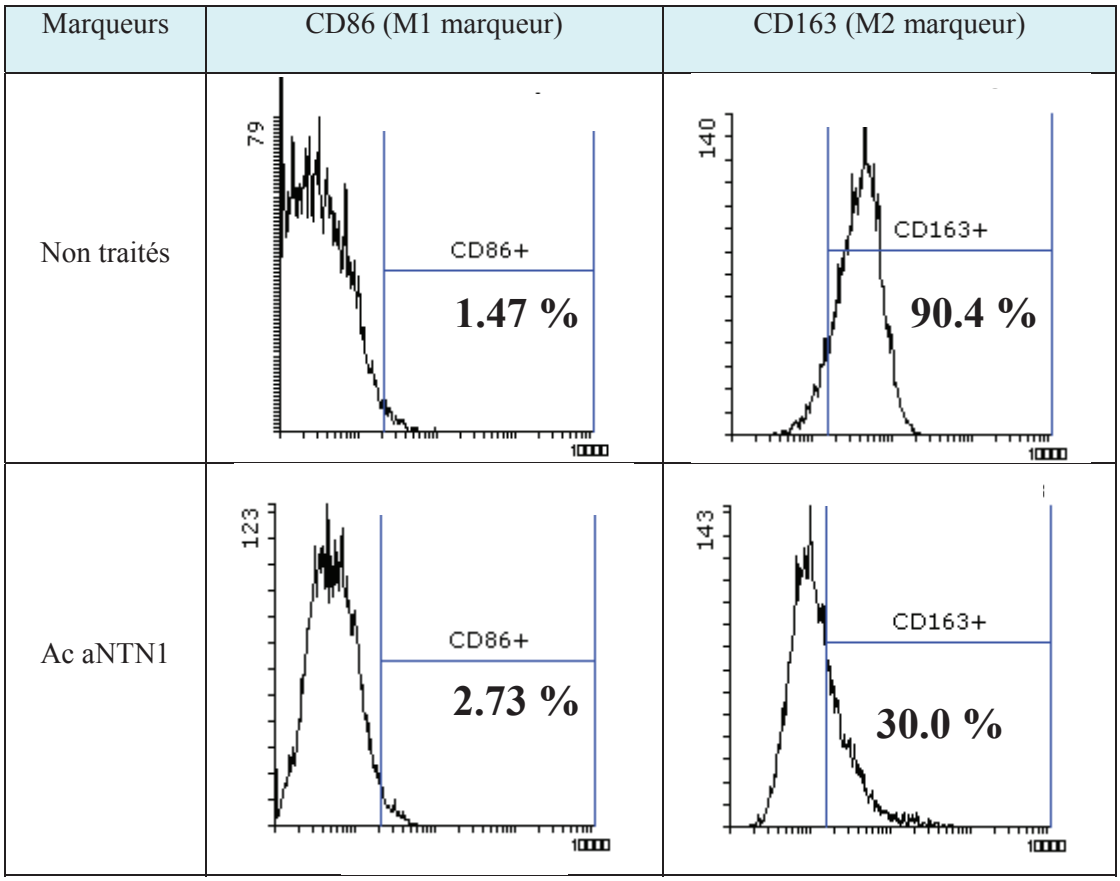


Figure 49 : Expression des marqueurs CD86 et CD163 dans la population de macrophages totale et M1 en réponse à l'Ac aNTN1

Une diminution de CD163 est notée dans la population de macrophages M2 suite au traitement par l'Ac aNTN1. CD86 reste inchangé suite à ce traitelent.

L'Ac aNTN1 est bien capable de diminuer l'expression CD163 indiquant l'effet possible sur la polarisation des macrophages de M2 en M1 qui permettrait de générer un microenvironnement tumoral pro-inflammatoire et anti-tumoral.

Récapitulatif des résultats – Axe III

Nous avons mis en avant dans cette partie les modes d'action de l'Ac aNTN1 sur les cellules d'ostéosarcome et sur l'environnement de la tumeur qui permettraient d'expliquer l'effet thérapeutique observé. Nos études montrent que :

- L'Ac aNTN1 seul ou combiné à la Dox diminue les capacités de migration des cellules de l'ostéosarcome, pouvant expliquer l'effet anti métastatique observé lors des expérimentations *in vivo*

- L'Ac aNTN1 seul ou combiné à la Dox a un effet sur la vascularisation de l'ostéosarcome qui peut expliquer également le ralentissement de la croissance de la tumeur primaire et de la dissémination métastatique

- L'Ac aNTN1 seul ou combiné à la Dox n'a pas d'effet majeur sur l'infiltrat cellules T mais diminue fortement la présence de macrophages $CD163^+$ dans le tissu intra-tumoral. L'Ac aNTN1 agit aussi sur la polarisation des M2 en M1 *in vitro*.

En conclusion : L'Ac aNTN1 agit directement sur la migration des cellules d'ostéosarcome. Il permet aussi d'induire une diminution de la densité vasculaire de la tumeur et de réduire l'infiltration intra-tumorale des macrophages pro-tumoraux $CD163^+$. Cette diminution de l'infiltrat $CD163^+$ semble être due à la capacité de l'Ac aNTN1 à polariser les macrophages M2 en M1.

Dans ce travail, nous avons montré que même si l'expression NTN1 ne possède pas de valeur pronostique pour l'ostéosarcome elle représente une cible thérapeutique intéressante pouvant potentialiser l'effet de la Dox. Nous décrivons ici un traitement combinant l'interférence de la NTN1 à la Dox capable de ralentir la progression et la récidive de l'ostéosarcome et capable de limiter la dissémination métastatique dans ce modèle d'ostéosarcome de rat. Nous montrons que ce traitement peut agir en inhibant la migration des cellules tumorales et qu'il possède aussi un effet immunomodulateur pouvant limiter le recrutement intra-tumoral des macrophages M2 ou permettant leur polarisation de M2 à M1.

DISCUSSION

Discussion

Depuis l'introduction des régimes de poly-chimiothérapies qui ont considérablement fait progresser la survie des patients atteints d'ostéosarcomes, très peu d'améliorations sont arrivées en clinique pour le traitement de ces tumeurs. Si les thérapies ciblées ont suscité beaucoup d'intérêt et beaucoup d'espoirs, elles n'ont cependant pas montré une grande efficacité pour le traitement des ostéosarcomes et les chimiothérapies restent la base des traitements de cette tumeur. Une approche thérapeutique d'intérêt pourrait être de combiner la chimiothérapie avec des thérapies ciblant l'environnement tumoral (osseux ou immunitaire) ou visant à restaurer des fonctions cellulaires telles que l'apoptose, la chimiosensibilité. Nous avons évalué une telle combinaison de chimiothérapie et d'interférence à la NTN1. Nous avons pu montrer l'efficacité thérapeutique de cette combinaison Dox + Ac aNTN1 dans un modèle d'ostéosarcome de rat. Nous mettons en évidence qu'en plus de retarder la progression de la tumeur primaire, la rechute locale et la dissémination métastatique, cette combinaison modifie l'infiltrat immunitaire intra-tumoral pour le rendre majoritairement pro-inflammatoire, condition montrée favorable dans le chondrosarcome [52].

La discussion qui suit est structurée en trois grands axes reprenant les trois parties du travail présenté. Premièrement nous discuterons de la valeur pronostique de la NTN1 pour l'ostéosarcome puis nous aborderons les effets anti-tumoraux de la combinaison Dox + Ac aNTN1 dans l'ostéosarcome de rat. En dernier lieu, nous traiterons des effets de cette combinaison sur l'environnement de l'ostéosarcome.

I- NTN1, cible thérapeutique pour l'ostéosarcome

Les techniques de séquençage ont permis d'améliorer les connaissances des voies de signalisation et des altérations moléculaires. Ces avancées permettent maintenant d'établir un profil moléculaire des tumeurs ou de certains patients et d'adapter le traitement en fonction des altérations mises en évidence. Certaines mutations ou surexpressions présentes dans l'ostéosarcome possèdent des valeurs pronostiques quant à l'évolution tumorale. En effet, une surexpression de Runx2 [177], de P-gp [308], de CCN3 [178] ou encore de CCL5 [309] sont associées à

une survie plus faible des patients. Aujourd'hui, de nouveaux marqueurs prédisant la réponse aux traitements sont identifiés grâce aux avancées pan-génomiques. Lors de ces travaux nous nous sommes intéressés aussi à la possible valeur pronostique du niveau d'expression de la NTN1 dans l'ostéosarcome.

La première étape de ce travail a été l'analyse du niveau d'expression de NTN1 dans les ostéosarcomes afin de vérifier si son niveau d'expression était un facteur pronostique ou d'agressivité pour cette tumeur. Nous avons aussi validé la présence de cette protéine dans la tumeur et vérifié son profil d'expression en réponse à la chimiothérapie, confirmant ainsi sa valeur de cible thérapeutique, comme cela a été observé dans des tumeurs de la vessie ou des ovaires [303,310]. Nous montrons que si l'expression de la NTN1 n'a pas de valeur pronostique pour l'ostéosarcome, elle est exprimée dans la tumeur et que l'administration de chimiothérapies augmente son expression. Ces analyses préliminaires valident la faisabilité de cette approche thérapeutique couplant une chimiothérapie à une interférence à la NTN1 dans la prise en charge de l'ostéosarcome ; comme cela a déjà été décrit dans les carcinomes pulmonaires et mamaires [298,303].

Le niveau d'expression de la NTN1 peut être un facteur de bon ou mauvais pronostic pour certains sous-types moléculaires du sarcome des tissus mous. Une expression de NTN1 supérieure à la moyenne est associée avec une survie sans métastase et sans rechute plus longue que chez les patients avec un niveau de NTN1 plus faible. La corrélation inverse est notée dans les SGC. Cette différence de la valeur pronostique reflète la grande hétérogénéité à la fois histologique mais aussi moléculaire de ces tumeurs [311].

Une grande hétérogénéité du niveau d'expression de la NTN1 a été mise en évidence dans une cohorte de 22 ostéosarcomes primaires. Cependant cette variabilité d'expression n'est associée ni au sexe, ni à l'âge des patients et n'est corrélée ni à la survie globale ou a la survie sans métastase. Cette absence de corrélation peut s'expliquer par la faible taille de notre cohorte qui ne comporte que 22 échantillons d'ostéosarcomes primaires. De plus, nos échantillons proviennent essentiellement d'ostéosarcomes adultes (14 cas sur les 22), une proportion qui ne reflète pas l'incidence la plus fréquente de l'ostéosarcome [3]. Il pourrait être intéressant de réaliser ces analyses sur une cohorte de patients plus jeunes qui est aujourd'hui en cours de constitution pour déterminer si dans l'ostéosarcome pédiatrique le niveau d'expression de la NTN1 a une valeur pronostique avec notamment la rechute locale et/ou métastatique.

Il est à souligner que nous avons analysé le niveau d'expression de la NTN1 par PCRq qui met en évidence la présence de l'ARNm dans une cohorte essentiellement constituée d'échantillons provenant de pièces de résection. Afin d'avoir une vision plus précise du profil moléculaire de l'ostéosarcome il apparait essentiel de pouvoir faire ces analyses à la fois sur biopsie au diagnostic et sur pièce opératoire et d'utiliser des techniques moléculaires plus discriminantes tel que le RNASeq. Une comparaison de l'analyse transcriptomique avant et après l'administration des chimiothérapies permettrait de voir l'évolution du niveau d'expression de la NTN1 et de le corréler à la réponse aux traitements ou à l'expression de facteurs/acteurs/effecteurs de la résistance. Une telle analyse a été réalisée dans la lignée cellulaire U2OS [312] avant et après traitement par un agent cytotoxique a permis une caractérisation complète de la réponse au traitement.

La comparaison des niveaux d'expression de la NTN1 associée au suivi clinique des patients permettrait vraiment de conclure quant à la valeur pronostique de l'expression de la NTN1 dans l'ostéosarcome et pourra prochainement être réalisée sur les données issues du protocole OS2006 dont le RNAseq est en cours de réalisation (Institut Gustave Roussy).

II- Effets anti-tumoral et anti-métastatique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 : modèle d'ostéosarcome de rat

Si le niveau d'expression de la NTN1 n'apparait pas comme facteur pronostique de l'ostéosarcome, nous avons validé sa valeur de cible thérapeutique dans l'ostéosarcome.

En effet les analyses effectuées montrent que la NTN1 est exprimée dans l'ostéosarcome alors que l'os sain ne l'exprime pas du tout. Dans le tissu adulte la NTN1 et ses récepteurs ne sont exprimés qu'à un faible niveau basal alors que leur surexpression est observée dans les cancers[263]. De plus, nous mettons en évidence, une augmentation du niveau expression de la NTN1 en réponse aux chimiothérapies. Cette augmentation d'expression confirme la possibilité de cibler la NTN1 en l'associant à une chimiothérapie lors d'une stratégie d'interférence de NTN1 et de ses récepteurs à dépendance. Cette augmentation de l'expression de la NTN1 après traitement par des chimiothérapies a été observée dans de

nombreuses lignées cellulaires de neuroblastome, de carcinome mammaire et pulmonaire [297,303,313] mais aussi sur des échantillons de carcinomes ovariens avant et après traitement par chimiothérapie [303]. Cette surexpression de la NTN1 en réponse aux chimiothérapies est probablement plus un mécanisme de survie des cellules en réponse au stress induit par ces agents cytotoxiques [303]. Perturber la signalisation induite par la NTN1 entraine l'apoptose des cellules cancéreuses, ainsi combiner l'interférence à la NTN1 avec des agents chimio-thérapeutiques permet d'obtenir un effet anti-tumoral accru de ces agents [298,303]. Si dans notre étude nous ne disposons pas de biopsie au diagnostic et de pièce de résection appariées nous avons cependant des échantillons d'ostéosarcome primaires traités ou non par poly-chimiothérapies. La différence d'expression de la NTN1 observée entre les tumeurs non traitées et tumeurs traitées par ces agents cytotoxiques indiquent cependant que coupler la chimiothérapie avec l'interférence à la NTN1 est une stratégie applicable à l'ostéosarcome comme il l'a été décrit dans le carcinome mammaire [298]. Dans ce modèle de carcinome mammaire l'ajout de l'Ac aNTN1 à la décitabine a permis de renforcer l'effet de la chimiothérapie entrainant alors une réduction de la progression tumorale. C'est un tel effet anti-tumoral accru de la chimiothérapie sans augmentation de sa toxicité que nous comptons pouvoir mettre en évidence dans l'ostéosarcome de rat.

Dans le modèle d'ostéosarcome de rat surexprimant la NTN1 par rapport à l'os sain, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de la NTN1 en réponse à la doxorubicine, comme cela a été décrit précédemment dans des lignées tumorales [303]. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Il est possible que les doses et fréquences d'administration de la doxorubicine n'ont peut-être pas été suffisantes pour causer un niveau de stress nécessaire pour augmenter l'expression de la NTN1. Hors cette induction de la NTN1 en réponse aux chimiothérapies est un processus de survie cellulaire qui résulte de plusieurs mécanismes notamment par l'activation du promoteur de la NTN1 via p53 [314,315]. Nous savons que p53 est couramment mutée ou délétée dans l'ostéosarcome et nous pouvons supposer que dans le modèle de l'ostéosarcome de rat la présence mutée de p53 empêche l'activation de la NTN1 par cette voie.

La doxorubicine ne diminuant pas l'expression de la NTN1 dans le modèle d'ostéosarcome de rat, nous avons pu tester une combinaison de la Dox à l'Ac aNTN1 dans ce modèle. Nous avons pu mettre en évidence un effet anti-tumoral et anti-métastatique accru de cette combinaison par rapport à chaque agent. Dans le modèle syngénique d'ostéosarcome de rat, la Dox ne présente qu'un effet minime sur la progression tumorale. Effectivement, ce

modèle est connu pour être similaire à la pathologie humaine en termes de dissémination métastatique et de chimiorésistance. Une forte vascularisation ainsi qu'une surexpression des MDR1 et MRP1, deux acteurs de la chimiorésistance sont observées dans l'ostéosarcome de rat [316].

Dans un modèle d'ostéosarcome de rat l'Ac aNTN1 seul ne présente pas d'effet anti-tumoral. Hors dans un modèle de lymphome, l'administration de Ac aNTN1 tous les deux jours à dose de 20 mg/kg a permis de ralentir la progression tumorale[317]. Hors dans nos expérimentations nous avons utilisé l'Ac aNTN1 à une dose de 4 mg/kg par injections réalisées deux fois par semaine [317]. La différence d'efficacité thérapeutique de Ac a NTN1 seul observée entre les deux modèles tumoraux peut s'expliquer par la différence de schéma et doses d'administration. Cette efficacité thérapeutique limitée de l'interférence avec la NTN1 a aussi été observée dans un modèle de xénogreffe de carcinome pulmonaire. Dans ce modèle l'administration bihebdomadaire d'un agent interférant avec la NTN1 et son récepteur n'a pas permis d'induire un retard de croissance tumorale [303]. Pour une administration de l'Ac aNTN1 optimale en monothérapie, ces résultats et les nôtres plaident en faveur d'une administration plus fréquente du traitement.

Si aucun agent administré en monothérapie n'a eu une efficacité anti-tumorale significative dans le modèle d'ostéosarcome de rat, l'addition de l'Ac aNTN1 à la doxorubicine résulte en un effet anti-tumoral accru de cette chimiothérapie, augmentant de 33 % l'action anti-tumorale de la chimiothérapie après 5 administrations sans effet toxique notoire. Un tel effet anti-tumoral de la combinaison d'une chimiothérapie (doxorubicine ou décitabine) et de l'interférence à la NTN1 - à l'aide d'Ac aNTN1 de première ou de seconde génération - a déjà été rapporté dans des modèles de xénogreffe d'adénocarcinome pulmonaire et de cancer du sein. Dans ces modèles le traitement combiné induit un ralentissement de la croissance tumorale de 50 % par rapport à la chimiothérapie seule [298,303]. Par rapport à ces modèles, celui d'ostéosarcome de rat possède l'avantage d'être établi en position orthotopique et chez des rats immunocompétents. Ces caractéristiques rendent les observations faites dans ce modèle d'autant plus intéressantes en termes de transfert à l'homme.

Des effets synergiques entre chimiothérapies et thérapies ciblées ont été décrits dans plusieurs modèles d'ostéosarcome de rats immunocompétents et immunodéprimés [318–320]. Notamment la combinaison de faibles doses de TNF, à la doxorubicine liposomale a permis

d'induire un ralentissement de la croissance tumorale presque totale chez la moitié des rats immunodéprimés [319].

L'addition d'oncostatine, cytokine impliquée dans la différenciation ostéosblastique [321], à la midostaurine, (pan-inhibiteur de kinases [322]), a aussi montré un effet anti-tumoral accru par rapport à l'action de l'oncostatine seule. Dans le même modèle d'ostéosarcome de rat immunocompétent dont nous disposons, cette combinaison induit un ralentissement de la progression tumorale [318].

Les résultats de notre expérimentation et de ces deux études montrent l'intérêt de combiner une chimiothérapie et une thérapie ciblée pour renforcer l'efficacité des chimiothérapies dans l'ostéosarcome. En plus d'avoir montré l'efficacité anti-tumorale de la combinaison Dox + Ac aNTN1 dans un modèle de tumeur progressive, l'originalité de notre projet a été de confirmer cette action dans un modèle de rechute tumorale. Les récidives de tumeurs osseuses sont caractérisées par une agressivité accrue et une progression tumorale plus rapide comme cela a été décrit dans un modèle de chondrosarcome de rat [323].

La prévention de la rechute tumorale chez 40 % des animaux ayant reçu la combinaison Dox + Ac aNTN1 dans ce modèle immunocompétent et chimiorésistant valide cette approche thérapeutique. À notre connaissance, un effet similaire sur la récidive d'ostéosarcome n'a été rapporté que pour la combinaison du zoledronate et de l'ifosfamide dans le même modèle d'ostéosarcome de rat [230]. Ces études avaient d'ailleurs permis la mise en place d'un essai clinique de phase II dans l'ostéosarcome.

Le modèle d'ostéosarcome de rat que nous avons utilisé métastase spontanément au niveau des poumons. Cette caractéristique offre la possibilité d'évaluer également les effets anti-métastatiques de nouveaux traitements, dans des conditions plus proches de la réalité clinique que dans les modèles métastasiques obtenus par injection de lignées cellulaires humaines par voie intraveineuse chez des animaux immunodéprimés.

Nous avons donc mis en évidence un effet anti métastatique de l'Ac aNTN1 qu'il soit administré seul ou en combinaison avec la doxorubicine. L'effet de l'Ac aNTN1 en monothérapie sur la dissémination métastatique alors qu'il n'a aucune action sur la tumeur primaire peut s'expliquer par l'implication de NTN1 dans la migration cellulaire [269,324]. L'interférence de l'Ac aNTN1 avec la NTN1 peut rétablir les voies de mort. Elle peut

également se traduire par une inhibition de la migration médiée par la NTN1 aboutissant à la limitation de la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. Nous reviendrons sur ce point dans le prochain paragraphe de cette discussion consacré aux mécanismes d'action combinaison Dox + Ac aNTN1.

L'effet anti-métastatique de l'Ac aNTN1 est renforcé par la combinaison avec la doxorubicine. Les animaux traités avec cette combinaison présentaient moins de métastases et les métastases étaient de diamètres plus petits que dans les autres groupes de traitement. Cette diminution de l'envahissement métastatique est similaire à celui qui a été rapporté pour la combinaison de zoledronate et d'ifosfamide dans un modèle d'ostéosarcome orthopique spontanément métastatique [229].

Après avoir mis en évidence des effets anti tumoraux et anti métastatique de la combinaison Dox + Ac aNTN1 nous avons analysé les mécanismes d'action de cette combinaison.

III- Mécanismes d'action de l'Ac aNTN1 sur l'ostéosarcome et son environnement

De précédents travaux ont montré que la combinaison d'une chimiothérapie et d'interférence avec la NTN1 à l'aide de SiRNA induisait notamment l'apoptose de carcinome pulmonaire *in vitro* [303]. *In vivo* dans un modèle de xenogreffe de carcinome mammaire l'interférence avec la NTN1 grâce à un Ac aNTN1 entraine aussi une activation de la capsase 3 puis de l'apoptose [298]. Dans notre étude *in vivo*, les analyses anatomopathologiques n'ont pas pu mettre en évidence une augmentation d'apoptose dans les tumeurs ayant été traitées par l'Ac aNTN1 seul ou par la combinaison Dox + Ac aNTN1.

Cette absence de l'induction de l'apoptose dans notre modèle peut s'expliquer par le fait que l'analyse ait été réalisée lors de la mise à mort des animaux soit 72 h après l'administration du dernier traitement. Afin de mettre en évidence une augmentation de l'apoptose dans les tumeurs des animaux recevant l'Ac aNTN1 seul ou combiné à la doxorubicine, il aurait fallu réaliser une cinétique de détection de l'apoptose et réaliser des mises à mort séquentielles s'étalant entre 4h et 24 h après administration des traitements. Par

ailleurs, lors de l'évaluation thérapeutique de la combinaison de la décytabine et de l'Ac aNTN1 dans le carcinome mammaire, il a été mis en évidence que la réinduction de l'apoptose était possible grâce à l'action déméthylante de la décytabine sur la NTN1 et ses partenaires apoptotiques rendant la voie de signalisation de mort de nouveau active [298]. Nous pourrions valider l'état de méthylation de la NTN1 et de ses partenaires apoptotiques dans l'ostéosarcome par PCR spécifique de la méthylation.

L'effet potentialisateur de la chimiothérapie joué par l'Ac aNTN1 peut s'expliquer par son implication dans l'apoptose, mais aussi par le rôle de la NTN1 dans d'autres processus cellulaires comme la migration cellulaire, l'angiogenèse et sur l'environnement immunitaire. Nous avons évalué l'effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur chacun de ces processus cellulaire afin de déterminer les mécanismes impliqués dans l'effet thérapeutique observé.

- Ac aNTN1 et migration des cellules d'ostéosarcome

La NTN1 a d'abord été décrite pour son rôle de chimioattractant, lors de la mise en place du système nerveux [261]. De nombreuses études ont depuis montré des capacités similaires dans la migration et l'invasion de cellules tumorales. Cette activation de la migration cellulaire se fait entre autres via l'activation de la voie PI3K/Akt [325]

Au cours de nos expérimentations, nous mettons en évidence les capacités de l'Ac aNTN1 seul ou en combinaison avec la Dox à diminuer drastiquement l'envahissement métastasique dans le modèle d'ostéosarcome progressif de rat. Nous avons confirmé *in vitro* par des tests de migration cellulaire que l'Ac aNTN1 ralentit la migration des cellules d'ostéosarcome. Des effets similaires ont été rapportés dans des lignées de mélanome où l'inhibition de NTN1 par un SiRNA anti NTN1 a permis de diminuer fortement la migration de ces cellules [326]. Si l'Ac aNTN1 peut ralentir la migration des cellules, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un autre processus impliquée dans la dissémination métastatique et dans lequel la NTN1 joue également un rôle [327]. En effet il a été montré qu'une surexpression de la NTN1 pouvait induire l'expression de Twist et Snail et réprimer l'expression de la E-cadhérine ; trois marqueurs de l'EMT. Ces données laissent penser que la NTN1 peut favoriser cette plasticité cellulaire et que son bloquage à l'aide de l'Ac aNTN1 pourrait empêcher cette étape de la dissémination métastatique.

- Ac aNTN1 et angiogenèse tumorale

L'angiogenèse joue un rôle essentiel dans l'osteosarcomagenèse : elle permet la croissance de la tumeur primaire et permet aux cellules tumorales de disséminer préférentiellement vers les poumons [70]. De nombreuses études pré-cliniques ont mis en évidence les effets anti-tumoraux et anti-métastatiques sur l'ostéosarcome d'inhibiteurs de l'angiogènese comme le bevacizumab (anticorps ciblant le VEGF), l'endostatine ou le sorafenib (pan inhibiteur deRTK) qui agissent directement sur l'angiogenèse [316,328,329].

Différentes études ont également montré le rôle de la NTN1 dans la mise en place de la vascularisation. L'interaction de la NTN1 avec CD146 exprimé à la surface des cellules endothéliales va permettre leur survie et leur prolifération [264,305]. De ce fait, nous avons souhaité analyser les effets de l'Ac aNTN1 sur la densité vasculaire des tumeurs l'ayant reçu combiné à la doxorubicine. Les analyses immunohistochimiques montrent qu'effectivement le blocage de l'interaction de la NTN1 avec ses récepteurs va se traduire par une modification du réseau vasculaire tumoral qui est alors formé de vaisseaux de diamètre plus petits.

Jusqu'à présent, nous avons mis en évidence deux mécanismes d'action de l'Ac aNTN1 permettant d'expliquer la potentialisation des effets de la chimiothérapie observée dans le modèle d'ostéosarcome de rat : la NTN1 est impliquée dans le recrutement et la polarisation de cellules immunitaires [267,330]. L'ostéosarcome étant une tumeur ayant un fort infiltrat immunitaire et l'implication de l'environnement immunitaire dans la réponse tumorale étant de plus en plus rapporté [52,53,331] nous avons dans un dernier temps analysé l'environnement immunitaire des ostéosarcomes en réponse aux différents traitements.

- Ac aNTN1 et macrophages associés à la tumeur (TAM)

La présence de populations pro-inflammatoires comme les lymphocytes effecteurs est nécessaire pour limiter le développement de l'ostéosarcome [332], elle est aussi associée au pronostic métastatique de la tumeur [331]. La présence de macrophages de type M2 est quant à elle associé à un mauvais pronostic [53,333].

Dans les modèles d'ostéosarcome progressif ou de rechute tumorale nous avons mis en évidence un effet de la combinaison Dox + Ac aNTN1 sur l'infiltrat des macrophages M2 $CD163^{+}$. Nos analyses immunohistochimiques montrent une diminution des macrophages

$CD163^+$ dans les tumeurs traitées par l'Ac aNTN1 seul ou combiné à la Dox. Cette diminution de macrophages M2 intra-tumoraux indique que l'infiltrat tumoral est alors moins anti-inflammatoire que dans les autres groupes de traitement. Il a par ailleurs été montré qu'un traitement permettant de modifier l'environnement immunitaire de l'ostéosarcome en le rendant plus pro-inflammatoire avait une action anti-tumorale [56,57,248]. Le mifamurtide permet la polarisation de macrophages M2 anti-inflammatoires en macrophages M1 pro-inflammatoires. Les essais précliniques dans des modèles d'ostéosarcome canins démontrent une nette amélioration de la survie des animaux traités avec le mifamurtide [334]. Chez l'homme, l'administration combinée de chimiothérapies (régime MAP – Dox, HDMTX et cisplatine) et de mifamurtide a permis d'améliorer significativement la survie à 6 ans des patients de 70 à 78 % [248].

Au cours de nos expérimentations, nous mettons en avant un effet immunomodulateur de l'Ac aNTN1 qui n'était pas décrit jusqu'à présent. La diminution de la présence de macrophages $CD163^+$ au sein de la tumeur peut s'expliquer par l'implication de la NTN1 dans la polarisation et le recrutement des macrophages. La NTN1 est en effet capable d'attirer les macrophages et de favoriser leur polarisation dans le phénotype M2 via son interaction avec UNC5B [307,335].

Nous avons confirmé *in vitro* les capacités l'Ac aNTN1 à moduler le phénotype M2 des macrophages issus de moelle osseuse de rat. Cette expérimentation a permis de montrer la capacité de l'Ac aNTN1 à réduire l'expression du marqueur CD163, exprimé par les macrophages M2 ; indiquant un rôle immunomodulateur rétablissant un environnement pro-inflammatoire et anti-tumoral. L'environnement tumoral et immunitaire contribue à un contrôle de progression tumorale, nous n'avons toutefois pas pu mettre en évidence avant une augmentation concomitante de marqueurs spécifiques du phénotype M1 comme CD86. Ces résultats restent à confirmer lors de la répétition de cette expérimentation. De même le potentiel effet de l'Ac aNTN1 sur le recrutement des macrophages sur le site tumoral reste à élucider afin de déterminer si l'absence de $CD163^+$ intra-tumoraux résulte plus de la polarisation macrophages ou de leur recrutement sur site.

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Dans ce travail nous avons montré que la NTN1 ne présente pas de valeur pronostique pour la progression de l'ostéosarcome, mais que son expression dans ces tumeurs en fait une cible potentielle pour thérapies ciblées. Nous avons alors mis en avant l'efficacité anti-tumorale et anti-métastatique de cette stratégie combinant la Dox + Ac aNTN1 dans un modèle d'ostéosarcome de rat immunocompétent et métastatique. Nous avons caractérisé certains mécanismes d'action induit par le traitement combiné de la Dox et l'Ac aNTN1. En effet nous avons démontré les capacités de l'Ac à réduire la migration cellulaire de lignées d'ostéosarcome, à diminuer la densité vasculaire de la tumeur et réinduire un environnement pro-inflammatoire. Ces conclusions permettent d'envisager la combinaison Dox + Ac aNTN1 comme potentiel traitement pour la prise en charge de l'ostéosarcome.

Nos expérimentations mettent en avant certains mécanismes d'action de l'Ac aNTN1 qui pourraient être approfondis. Il est indispensable de confirmer l'effet de cet anticorps sur la polarisation des macrophages. Il pourrait être intéressant de déterminer l'effet de l'Ac aNTN1 sur le chimiotaxisme des macrophages par un test de migration en temps réel (Xcelligence).

Concernant l'effet immunomodulateur de l'Ac aNTN 1 observé, des caractérisations de l'infiltrat immunitaire intra et péri-tumoral par FACS permettrait de mieux caractériser les cellules immunitaires présentes.

Nous pourrions par la suite confirmer l'effet anti-métastatique de l'Ac aNTN1 seul ou combiné dans un modèle de métastases induites par injection intraveineuse de cellules d'ostéosarcome.

ANNEXES

Annexes

Publication – Submission Clinical Cancer Research

Manuscript #	-2017-0XXXX
Current Revision #	0
Current Stage	Under consideration
Title	Anti Netrin 1 Ab exerts antitumor activity in combination with doxorubicin and modulates tumor immune environment in osteosarcoma models
Running Title	aNTN1 Ab+Dox exerts antitumor activity in OS model
Manuscript Type	Full Paper
Corresponding Author	Ms. Morgane Monchanin (Morgane.MONCHANIN@lyon.unicancer.fr) (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyo)
Contributing Authors	Ms. Iseulys Richert (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Dr. François Simard (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Mr. Paul Berchard (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Mr. Jean Baptiste Langlois (CERMEP - Imagerie du Vivant) , Ms. Margaux Vienne (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Dr. Agnes Bernet (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Mr. Gadot Nicolas (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) , Prof. Jean-Yves Blay (Centre Léon Bérard) , Dr. Aurélie Dutour (Centre de Recherche en Cancerologue de Lyon)
Abstract	Background: Despite the intensification of chemotherapies regimen, 5 years survival for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma (OsA) remains poor. The secreted factor netrin-1 (NTN1) is overexpressed in many human cancers as a survival factor. We investigated here the role of anti-NTN1 Ab in osteosarcoma. Methods: NTN1 expression was quantified by RT qPCR from human OsA cohort (n = 22). Anti-tumoral and anti-metastatic efficiency of anti NTN1 antibody alone or combined with doxorubicin was analyzed on a progressive and on a relapsed orthotopic and metastatic rat OsA model. Treatment effects on tumor microenvironment were performed by immuno-histological analyzes. Results: NTN1 mRNA is highly expressed in human OsA samples and in rat OsA model. Combined treatment (Dox + aNTN1 Ab) was found able to synergistically slow down tumor progression, prevent tumor dissemination, and delay OsA relapse. Dox + aNTN1 Ab decreased T effectors infiltration and inhibited M2 macrophages migration in the center of rat OsA. Conclusions: NTN1 blockade potentiates chemotherapy efficacy in rat OsA models by modifications of the tumor microenvironment.
Subject Editor	Not Assigned
Keywords	osteosarcoma relapse, chemotherapy, tumor microenvironment, metastases
Subject Terms	Biological sciences/Cancer/Bone cancer Biological sciences/Cancer/Metastasis
Conflict of interest	There is no conflict of interest
Applicable Funding Source	No Applicable Funding

Stage	Start Date
Under consideration	20th Nov 17
Author Approved Converted Files	20th Nov 17
Under submission	20th Nov 17

Anti Netrin 1 Ab exerts antitumor activity in combination with doxorubicin and modulates tumor immune environment in osteosarcoma models

Morgane MONCHANIN[1], Iseulys RICHERT[1], François SIMARD[1], Paul BERCHARD[1] Jean Baptiste LANGLOIS[3] Margaux VIENNE[1], Agnès BERNET[2], Nicolas GADOT[4], Jean Yves BLAY[1,5], Aurélie DUTOUR[1]

1: Apoptosis and pediatric sarcoma team, C R C L, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2: Nétris Pharma, Centre Léon Berard, Lyon, France

3: Animage imaging platform. CERMEP –Bron, France

4: Anatomopathology research platform, CRCL, Lyon France

5: Department of medicine, Centre Léon Bérard, Lyon, France

Abstract

Background: Despite the intensification of chemotherapies regimen, 5 years survival for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma (OsA) remains poor. The secreted factor netrin-1 (NTN1) is overexpressed in many human cancers as a survival factor. We investigated here the role of anti-NTN1 Ab in osteosarcoma.

Methods: NTN1 expression was quantified by RT qPCR from human OsA cohort (n = 22). Anti-tumoral and anti-metastatic efficiency of anti NTN1 antibody alone or combined with doxorubicin was analyzed on a progressive and on a relapsed orthotopic and metastatic rat OsA model. Treatment effects on tumor microenvironment were performed by immuno-histological analyzes.

Results: NTN1 mRNA is highly expressed in human OsA samples and in rat OsA model. Combined treatment (Dox+aNTN1 Ab) was found able to synergistically slow down tumor progression, prevent tumor dissemination, and delay OsA relapse. Dox+aNTN1 Ab decreased T effectors infiltration and inhibited M2 macrophages migration in the center of rat OsA.

Conclusion: NTN1 blockade potentiates chemotherapy efficacy in rat OsA models by modifications of the tumor microenvironment.

Key words: osteosarcoma relapse, metastases, tumor microenvironment, chemotherapy

Introduction

Osteosarcoma (OsA) is the most common primary malignant bone tumor affecting children and adolescents (Mirabello *et al*, 2009a, 2009b). It occurs mainly in the metaphysis of long bones and metastasizes to the lung (Kempf-Bielack *et al*, 2005; Mirabello *et al*, 2009b). OsA treatment relies on pre-operative chemotherapy, tumor surgical resection, and post-operative chemotherapy, adapted to tumor histological response. With this approach, progression–free survival (PFS) rate reaches 70% at 3 years in non-metastatic osteosarcoma patients. Nevertheless, the 3-year Event-Free Survival (EFS) for high-risk patients, i.e patients with metastases at diagnosis, non-operable disease and poor histological response, is around 40%, with no improvement in the last 20 years despite several clinical trials (Isakoff *et al*, 2015; Piperno-Neumann *et al*, 2016). For these patients in particular, new treatment strategies are needed (Bielack *et al*, 2009; Duchman *et al*, 2015).

OsA exhibit complex rearrangements, including structural and numerical aberrations and wide variability between cells. Thus, few conserved genetic changes indicating effective therapeutic targets have been identified. So far, targeted therapies did not prove strong efficacy for OsA (Chen *et al*, 2014). Many therapeutic options targeting OsA microenvironment have been tested–ranging from anti-angiogenesis to bone remodeling. If these approaches generated promising preclinical results causing a decrease in tumor progression and metastatic spreading in animal models (Fouladi *et al*, 2007; Pignochino *et al*, 2009), none of the drugs tested led to significant improvement of patient clinical outcome (Grignani *et al*, 2015). Among OsA microenvironment components, the TAMs (Tumor Associated Macrophages), appear more and more of prognostic ant therapeutic interest. A recent study showed that TAM intratumoral density is correlated with patients' survival; a high $CD14^+$ intratumoral density being associated with a favorable outcome of patients with OsA (Buddingh *et al*, 2011). If high infiltration of $CD14^+$ macrophages is associated with favorable outcome for patients with OsA (Han *et al*, 2016), the prognosis value of M1 and M2 TAM is still controversial. A study shown that high infiltration of M1 polarized macrophages is correlated with lower vascular density in primary OsA and better metastases free survival (Kurzman *et al*, 1994). In contrast another study reported that high CD163+ M2 TAMs was significantly correlated with better overall survival and longer metastasis progression-free survival (MPFS) independently of metastatic status (Gomez-Brouchet *et al*, 2017). Nevertheless, immunomodulation using Liposomal MTP (Mifamurtide, L-MTP-PE) an agent able to turn M2 macrophages to M1 macrophages has proven effective in OsA (Nardin *et al*,

2006; Pahl *et al*, 2014). Randomised studies in dogs with spontaneous OsA showed a significantly improved survival in dogs treated with mifamurtide (Kurzman *et al*, 1995; Vail *et al*, 2002). A prospective, randomised, phase III trial for newly diagnosed OsA reported a benefit of mifamurtide on overall survival validating therapeutic approach combining chemotherapy and targeted therapy. Thus, combining chemotherapies to agents targeting either OsA microenvironment or aiming at restoring mutated signaling pathways or cellular mechanisms (Dass & Choong, 2007a; Pignochino *et al*, 2009; Meyers *et al*, 2011) seems to be a promising approach for OsA that enables to enhance chemotherapy efficiency while limiting their side effects and dose levels. We investigated such an approach combining conventional chemotherapy (doxorubicin) and a strategy aiming at reinducing apoptosis by inhibiting Netrin-1 interaction with its receptors.

Netrin-1 (NTN1) and its receptors (DCC or UNC5H family) were first shown to be involved in neuronal navigation in embryogenesis (Serafini *et al*, 1994). More recently, NTN1 was described belonging to a family of Dependence Receptors (DRs) signaling pathway (Mehlen *et al*, 1998). In the presence of their ligand these DRs stimulate cell proliferation and migration while in the absence of the ligand they induce apoptosis rendering the cells dependent from their ligand to survive (Gibert & Mehlen, 2015). The fact that DRs trigger apoptosis in the absence of ligand was proposed to be a mechanism to negatively regulate tumorigenesis (Mazelin *et al*, 2004; Mehlen & Puisieux, 2006). As a consequence, tumors have to block DRs death pathway to survive, grow and disseminate (Mehlen & Bredesen, 2011). Recent results described that one way for the tumor cell to achieve this selective advantage is to up-regulate the ligand NTN1 expression. In animal models, it was shown that preventing the interaction between NTN1 and its DRs was associated with inhibition of tumor and metastasis growth, supporting the view that an original therapy could be to prevent NTN1 / DRs interaction in cancers (Fitamant *et al*, 2008a; Delloye-Bourgeois *et al*, 2009b; Broutier *et al*, 2016a). Of great interest, for therapeutic combination it was shown that conventional chemotherapies (doxorubicin, 5FU, Doxorubicin, Taxol) up-regulate NTN1 and its receptors expression in cell lines and human different cancers. Moreover, this effect is associated with a cooperative effect of conventional chemotherapies with NTN1 interference (Paradisi *et al*, 2013a; Grandin *et al*, 2016a).

These data, together with the need to design new therapeutic regimen for OsA prompted us to evaluate the antitumor and antimetastatic activity of a humanized anti NTN1 antibody, combined to chemotherapy in rodent OsA model. Indeed, a humanized anti-netrin-1 antibody

that disrupts the interaction between Netrin-1 and its DRs and triggers death of Netrin-1-expressing tumor cells *in vitro* has been generated and has been described has a promising drug candidate (Grandin *et al*, 2016b). Like in other solid tumors, we found that NTN1 is overexpressed in OsA and that this expression is upregulated in response to chemotherapies; OsA could be a tumor benefiting from NTN1 interference/chemotherapies combination. We tested this hypothesis in an orthotopic and metastatic OsA model. The combination of doxorubicin and anti-NTN1 antibody was able to significantly slow down primary tumor progression and relapse and dramatically reduced metastases dissemination. This combined treatment also caused a clear decrease in intratumoral $CD163^{+}$ macrophages indicating that in addition to its direct antitumoral activity, this combination acted also as immunomodulator inhibiting M2 macrophages recruitment at the tumor site or helping the conversion of M2 protumoral to M1 antitumoral macrophages. Thus, all these arguments indicate that doxorubicin combined with the aNTN1 Ab appears to be a potential treatment for OsA.

Materials and Methods

In vivo studies

Experiments were conducted in accordance with the European and French laws. The protocols were validated by the animal ethical evaluation committee (protocol number: APAFIS#2179-2015100614376259v2). All experiments were conducted in the pathogen-free animal facilities Animage (Agreement # A69-3830501). Rats were housed at a constant temperature (20°C−22°C) and humidity (45%–55%) on a 12-h light/ 12-h dark cycle. Animals had free access to food and water. Antitumor effects of aNTN1 Ab alone or combined with doxorubicin was tested in two different settings: on progressive and relapsed OsA. For each setting, in vivo assays data from one experiment out of three carried out are presented.

Progressive rat OsA model

Tumors fragments were grafted on the right posterior tibia of 4 weeks old male Sprague - Dawley rat (Charles River) after periosteal abrasion (Allouche *et al*, 1980). Eight days after tumor implantation animals were randomly divided into the following treatment groups: i) doxorubicin (Dox; 1 mg/kg) (TEVA) (n=20), ii) irrelevant antibody (4 mg/kg) (Irr Ab – anti-HIV IgG1 - Netris Pharma) (n=19), iii) anti NTN1 antibody (4 mg/kg) (aNTN1 Ab – Anti-NTN1 IgG1 Netris Pharma)((n=18), iv) Dox+Irr Ab (n=13) and v) Dox+aNTN1 Ab (n=25). A preliminary dose-escalation study was held and determined that the most effective dose of aNTN1 Ab was of 4 mg/kg (data not shown) Treatment schedule for progressive rat OsA is shown (Figure 2B).

Relapsed rat OsA model

To mimic OsA relapse, a “phase II like” experiment was designed. Tumors were transplanted as previously described and 8 days after tumor graft all tumor-bearing animals underwent 2 courses of chemotherapy (Dox at 1 mg/kg) before being submitted to R2 tumor surgery. Animals were then randomly divided in 3 treatment groups: Dox (n=20), Dox+Irr Ab (n=20) and Dox+aNTN1 Ab (n=21). Treatment schedule is shown Fig 4 A.

Treatments and follow-up

For both settings, all treatments were administered by IP injections twice a week over a period of 3 weeks or till tumor reached the end point of 2500 mm^3.

Tumor growth was monitored twice a week over the treatment period by measure of two perpendicular diameters. Tumor volume was calculated as previously described (Bousquet, 1995). At the completion of the experiment, primary tumor and lungs were collected and sampled for IHC and molecular analyses. Metastatic spreading was analyzed by counting lung metastases divided based on diameter (> or < 5mm). Relative mean tumor volume (RMTV) and tumor inhibition rate (IR) were calculated as previously described for each time point.

Tumors evolution was also monitored by RMI performed at the beginning of treatment, mid-treatment and at the last treatment administration. MRI acquisition was performed 15 min after intravenous administration of gadolinium on a Bruker 7T Biospec system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with 400 mT/m gradient set, using an emission/reception body coil.

RT qPCR

RT qPCR were performed on human and rat OsA RNA samples. First-strand cDNAs were generated by reverse transcription on 1 µg total RNA using the PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara) according to manufacturer instructions. Gene expression was quantified on a lightcycler 480 system (Roche) using SYBR® Premix Ex Taq™ kit (Takara) and Eurofins primers (sequences available upon request).

RT-PCR singleplex reaction was executed using 5 µL of SYBR Premix, 500 nM of each primer, 2 µL of cDNA diluted at 1/10 and sterile water (qsp 10 µl) Amplification conditions were set up to 95 °C (30 s) followed by 40 PCR cycles (95°C (15 s), 60°C (30 s)). NTN1 gene expression was normalized by 3 housekeeping genes: RPLP0, Cyc-1 and GAPDH.

Immunohistochemistry

Immunohistologic analyses were performed on paraffin embedded tumors sections from animals of all treatments groups using the automated system Discovery XT (Roche). Tumors sections (5 µm) were deparafinized rehydrated and underwent antigen retrieval step (EDTA pH 8 or protease 2) before being incubated with the following primary antibodies: CD3 (1/100), CD8 (1/100), CD163 (1/300), (respectively A0452 (Roche), AHP1706 (AbDSeroTech); AHP1703 (AbDSeroTech)). Primary antibodies were revealed using an unconjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody (respectively AI-9200, AI-1000; Vector lab, 1/100) followed by avidin-biotin complex and DAB peroxidase (OmniMap DAB, Roche). Counterstaining was performed with hematoxylin (Sigma-Aldrich). All slides were analyzed using the Axio Imager Upright Microscope (Zeiss) and ZEN software (Magnification 50 and 200). Positive immune cells were counted on five areas for each slide.

OsA cells migration assays

Effects of anti aNTN1 Ab on OsA cells migration was assessed using the xCelligence Real-Time Cell Analysis system (Acea Biosciences) and cell culture plates specifically designed for this apparatus (CIM plate 16 wells - Acea Biosciences). Briefly, MNNG/HOS cells were seeded at 20 000 cells/well in upper chamber in a medium deprived of serum and in which the "anti-migratory stimulus" (Dox at 3.5 µM, aNTN1 Ab at 10 ng/mL, or Dox+aNTN1 Ab) was added. The cells' migration through a 8 µm porous membrane toward the chamber lower compartment (containing complete medium) was recorded over time. Impedance was measured every 15 min for 35 hours and resulted in a migration curve which slope is indicative of cells migration capacity. Data presented are one experiment representative of two experiments.

Macrophages polarization assay

Bone marrow cells were collected from tibiae and femur of male Sprague Dawley rats, counted, and seeded at 4.10^6 cells/dish in non-tissue culture treated 10 cm petri dishes in 10 ml of differentiation medium (DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 20 ng/mL M-CSF (Bio Legend). Bone Marrow Derived Macrophages (BMDMs) were collected after 7 days by addition of

containing 2 mM EDTA in phosphate buffered saline (PBS) and gentle agitation. Cells were counted and replated in six wells plates at a density of 5.10^5 cells/well. The resulting BMDMs were analyzed by FACS to ensure a >90% macrophages purity. For *in vitro* polarization, BMDMs were stimulated with either 20 ng/ml recombinant IFNγ (R&D System) or 20 ng/ml TGF-β (Promega) for 24h. Polarized macrophages were then characterized by FACS before being incubated withaNTN1 Ab (10 ng/ml) for 24h. The effects of aNTN1 Abon macrophages polarization was analyzed by FACS. The following antibodies were used for FACS analyses: (CD68-APC (Milteny Biotec), CD86-PE (Milteny Biotec) and CD163-FITC (Biorad).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software package (GraphaPad Software). Data were expressed as the mean ± SEM, non-parametric t-tests (Mann Whitney) were used. Kaplan Meyer method was used to estimate survival probabilities. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

NTN1 gene expression in human sarcoma

It has been observed NTN1 and its receptors (DCC and UNC5H family) are overexpressed in numerous cancers (Fitamant *et al*, 2008b; Delloye-Bourgeois *et al*, 2009a). Thus we investigated whether NTN1 is overexpressed in OsA and asked whether this overexpression has a prognostic value for this tumor. We first interrogated TCGA (The Cancer Genome Atlas) and GEO (Gene Expression Omnibus) databases but these two databases do not contain specific bone sarcoma patients cohorts. We then investigated ATGsarc, a sarcoma specific database containing the expression data and genomic alteration of almost 1000 soft tissues sarcoma cases from the French Sarcoma Group. Within this database, we observed sarcoma with complex genomics expressing NTN1 at higher level presented a higher risk of metastatic relapse. More than 50% of patients with high NTN1 expression level had metastases occurring within 5 years after primary tumor diagnosis whereas 50% of patients with low NTN1 expression had a metastases-free survival rate of 15 years (p=0.0012) (Fig. 1A).

NTN1 expression is upregulated in OsA in response to chemotherapy

Based on this preliminary analysis, we examined NTN1 expression level and correlation with tumor progression in a small series of bone and soft tissue sarcoma samples from our institution (n=27 including chondrosarcoma (n=7), leiomyosarcoma (n=5), rhabdomyosarcoma (n=4), unclassified sarcoma (n=6) and OsA (n=5)). This study revealed if NTN1 is differently expressed between the sarcoma subtypes. Among the sarcoma histiotypes tested, OsA was the tumor with the highest expression level of NTN1 (Figure 1 B) (p = 0.0139). We then extended the OsA cohort and analyzed NTN1 expression on 22 osteogenic OsA. These data shown a great variability of NTN1 expression among OsA patients with only 2 patients having upregulation of NTN1 (Figure 1D). No correlation between NTN1 expression and patients' age, gender, 5 years survival and metastasis occurrence could be established (data not shown and Figure. 1C). However, and more importantly, NTN1 was found to be upregulated in most case in response to chemotherapies in OsA as it was previously described for other tumors (Paradisi *et al*, 2013b) while no NTN1 expression was detected in healthy bones (p=0.0003), NTN1's mean expression was 1.6 in only 2 OsA among 8 tested, not submitted to chemotherapies; and was increased to 17.12 in most OsA

that had been exposed to chemotherapies (p=0.0049) (Figure 1D) thus confirming the therapeutic potential of combining classical chemotherapy with anti-NTN1 treatment in most OsA patients.

Dox+aNTN1 Ab combination slows down OsA progression

The antitumor action of the aNTN1 Ab was tested in combination with doxorubicin (Dox) in a rat osteosarcoma model in which a relatively weak overexpression of 2.35 fold of NTN1 was observed in comparison to normal bone ($p<0.0001$) (Figure 2A). OsA bearing rats (n=26) were treated from day 8 post tumor implantation (mean tumor volume 150 mm^3) till tumor reached the endpoint or over a three weeks period. Treatments dose and schedule are described in material and methods section (Figure 2B).

The maximum inhibition of tumor progression is obtained at day 21 after tumor's implantation, ie after 5 of twice a week treatments. The tumor response to antibodies administered as monotherapy or in combination with Dox is assessed in comparison with the reference treatment Dox. No inhibition of tumor progression was observed in the Irr Ab and aNTN1 Ab treated groups (Figure 2C): The tumor responses were respectively +11.62% and +15.29% for Irr Ab and aNTN1 Ab treated group. The combination Dox+Irr Ab also showed no inhibitory effect on tumor progression (+14.81%). The combination Dox+aNTN1 Ab results in 37.21 % inhibition of tumor growth compared to conventional treatment (Figure 2C).

MRI monitoring was performed during the treatment on D8, D16 and D21 after tumor's implantation and confirmed the tumor growth inhibition in response to Dox+aNTN1 Ab. A significant tumor growth was observed between D8 and D21 for the Ctrl and Dox groups. Whereas a slower tumor progression was observed between D8 and D21 in rats treated by the combination Dox+aNTN1 Ab (Supp Data S1).

Consequently a significant animal survival improvement was observed in Dox+aNTN1 Ab treated animals compared to the other groups. Median survival was reached at D18 after tumor's implantation for groups receiving Dox alone or in combination with Irr Ab. The median survival wasn't reached at the end of the experiment in Dox+aNTN1 Ab treated group. At the completion of this experiment 67% of the animals receiving this combination did not reach the end point tumor volume (2500 mm^3) ($p = 0.0183$) (Figure 2D)

Dox+aNTN1 Ab combination decreases OsA metastatic spreading

One of the main challenges for OsA treatment is to prevent metastatic spreading. As NTN1 is known to be actively involved in cell's migration (Alcántara *et al*, 2000; Ko *et al*, 2014) and metastasis in breast cancer (Fitamant *et al*, 2008b) preventing NTN1 interaction with its receptors could delay the occurrence of OsA's lung metastases. As the rat osteosarcoma models spontaneously metastasizes to the lung, we were then able to assess effects of aNTN1 Ab and Dox on metastatic spreading. Measurements of lung metastases of tumor-bearing rats showed a slight reduction in the number of metastases in the Dox+aNTN1 Ab treated group after 3 weeks of treatment compared with Ctrl and Irr Ab group. In those groups an average of, 1 metastasis d > 5 mm was detected whereas an average of 3 to 6 lung metastases were counted in the other groups (Figure 3A). A synergic anti metastatic effect was noted in Dox+aNTN1 Ab treated rats.Indeed, in all group except Dox+aNTN1 Ab, 75% of animals presented lung metastases with d > 5 mm. Combination of Dox+aNTN1 Ab decrease this proportion to 17% (Figure 3B). Macroscopic counts was confirmed by histologic examination of lungs (Figure 3C). These data indicate that Dox+aNTN1 Ab combination prevents OsA cell's dissemination. To gain insight into the "anti-metastatic" effect of Anti NTN1 mAb, *in vitro* cell's migration assays were performed.

The effects of aNTN1 Ab on MNNG/HOS osteosarcoma cell line migration were assessed over a period of 30h using Xcelligence system. This system monitors in real time cell migration induced by FBS (fetal bovine serum) chemoattractivity. This assay showed that Irr Ab had no effect on OsA cells migration with a migration profile similar as untreated cells: slopes respectively at 0.048 and 0.047 (Figure 3D). aNTN1 Ab alone slows down OsA cells migration (1.5 fold decrease with cell index at 0.032) (Figure 3D).

Dox alone also caused a change in cell's migration profile and cell migration index only reached 0.017 in this condition. The addition of Irr Ab to Dox had no effect on cell's migration confirming the absence of effect of this control mAb (Figure 3E). A synergic effect of Dox+aNTN1 Ab combination was observed: the migration index being of 0.012 for cells submitted to this combined treatment (Figure 3E). This assay show aNTN1 Ab is able to inhibit OsA cells migration *in vitro* and potentially prevents OsA cells migration to the lungs *in vivo*.

Dox+aNTN1 Ab combination prevents OsA relapse

In second set of experiments, the effects of Dox+aNTN1 Ab combinations were examined on animals that had received neoadjuvant Dox and after intralesional curettage. The R2 surgery was performed at day 15, after animals had received 2 administrations of dox. The treatment groups received either Dox or aNTN1 Ab alone or the combination of Dox+aNTN1 Ab starting the day after surgery and until tumor relapsed and reached its endpoint or till day 19 (Figure 4A). Animals treated with Dox+aNTN1 Ab had a significant delay in tumor relapse compared with conventional chemotherapy. A significant delay in tumor progression was observed since day 18 after tumors' implantation. The mean tumor volume reached respectively 529±55 mm^3 , 629±97mm^3 and 349±60 mm^3 () in Dox, Dox+Irr Ab and Dox+aNTN1 Ab treated groups (Figure. 4B). This effect was maintained until the end of experiment (sacrifice of the animals in control groups) (Figure. 4B). At this time point, compared to conventional chemotherapy, the combination Dox+ aNTN1 Ab caused a 59.7±13% delay in tumor progression; while the combination Dox+Irr Ab had no effect compared to Dox and caused a 0.13 % delay in tumor growth index (p=0.057) (Figure. 4C). Consequently, a significant improvement of animal survival was observed only for the Dox+aNTN1 Ab treated animals. The median survival was of 24.5 days in the Dox treated group whereas it was of 33 days in Dox+aNTN1 Ab treated one (p=0.0117) (Figure. 4D). Moreover at the end of the experiment, only 10% of Dox treated rats showed no relapsed compared to 40% in the Dox+aNTN1 Ab treated group. These data indicate that combined treatment Dox+aNTN1 Ab can delayed OsA relapse (Figure. 4E)

Modulation of OsA immune environment upon Dox+ aNTN1 Ab treatment

To better understand the synergy between Dox+aNTN1 Ab we analyzed the effects of these treatments on OsA immune infiltrate. IHC staining for $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells as well as for $CD163^+$ M2 macrophages were performed on tumor samples collected from all animals included in the progressive and relapsed osteosarcoma models. Similar results have been obtained for all tumor models, data presented here are from the relapse study.

Immunochemistry staining showed the presence of $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells as well as of $CD163^+$ M2 macrophages located at the peritumoral and intratumoral areas of all tumors. As

neither Dox nor Dox.Irr Ab caused changes in peritumoral $CD3^+$ or $CD8^+$ T cells density with a mean number of $CD3^+$ T cells comprised between 84.5 and 87.9 per field (Figure 5A), the Dox+aNTN1 Ab combination caused a significant decrease in intratumoral $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells infiltrates (Figure 5A, 5B, C, D). While the mean number of $CD3^+$ T cells is comprised between 60 and 76 per field in the Dox-treated group, only 41.5 $CD3^+$ T cells per field were detected in Dox+aNTN1 Ab. The same observation could be made for $CD8^+$ T cells; with 19.7 cells/field in Dox+aNTN1Ab treated group representing a 46 % decrease in comparison to the Dox treated animals (p=0.0054) (Figure 5C).

Moreover, the most striking change caused by the combination of Dox+ anti Nt1 was a dramatic decrease in $CD163^+$ M2 macrophages. Indeed, the intratumoral infiltrates of Dox+aNTN1 Ab treated tumors were completely devoid of $CD163^+$ cells whereas between 16.7 and 9.4/field $CD163^+$ cells were observed in the tumors of other groups (Figure 5 A and D). M2 macrophages induce an anti inflammatory environment and are described to be pro-tumoral.

In vitro macrophages polarization assays confirmed the capacity of aNTN1 Ab to decrease CD163 expression on TNFα induced M2 macrophages (from 90% to 30%) (Figure 6) and in the meantime it caused a slight increase in CD86 expression on the same cells (from 1.4% to 2.7%) (Figure 6). These data seem to indicate the aNTN1 Ab could switch the polarization of macropahges from M2 protumoral phenotype to the M1 antitumoral phenotype. Here, we describe that a combined treatment targeting tumors cells, can also have a bystander immunomodulatory effect by preventing M2 macrophages recruitment at the tumoral site or by favoring M1 over M2 macrophages polarization. This immunomodulatory effect prevents the establishment of an anti inflammatory and pro tumoral environment reinforcing Dox+ aNTN1 antitumoral action.

Discussion

Since the introduction of multiregimen chemotherapies that dramatically improved OsA's patients survival, very few improvements in patients clinical management have been made. The emergence of numerous targeted agents did not benefit to OsA patients, as these agents did not prove strong efficacy for OsA and multiregimen chemotherapies are still the cornerstone for OsA treatments. Thus an innovative approach could be to combine

chemotherapy with targeted therapy restoring mutated signaling pathways or cellular fonctions like apoptosis. The addition of targeted agent should potentialize chemotherapy antitumoral activity while limiting its doses and side effects. We evaluated such an approach and shown additive effects of a new targeted therapy compound, a humanized monoclonal Ab that prevents the binding of the netrin-1 of its DRs, combined to Doxorubicin in a rat OsA model. We establish that in addition to delaying primary tumor progression, relapse and metastatsic dissemination, this combination leads to an intratumoral TAM infiltrates in which less CD8+ T cells and anti-inflammatory protumoral M2 macrophages are present.

In our syngeneic OsA model we found an absence of response to the aNTN1 Ab alone. This lack of anti-tumoral may be due to a dose of aNTN1 Ab administered was too low. Indeed it was recently shown in a murine lymphoma xenograft model that aNTN1 Ab administered at 20 mg/kg every second day reduced tumor progression (Broutier *et al*, 2016b). In our model the dose and schedules of aNTN1 Ab were lower: the treatments were administered twice a week at a lower dose (4 mg/kg). Whether this dose and schedule of administration was to weak to cause an inhibition of osteosarcoma progression, the addition of aNTN1 Ab to Dox was sufficient to improve chemotherapy antitumor activity.

Antitumoral activity of Dox was enhanced by it combination with aNTN1 Ab. We shown that the combination of Dox+aNTN1 Ab caused a 33% inhibition of tumor's growth compared to conventional chemotherapy. Such an effect of a combination of chemotherapy and NTN1 interference had already been reported in xenograft models (Ory *et al*, 2005; Dumars *et al*, 2016). In these models, tumor volumes were around 2 fold smaller compared to control groups. If the efficiency of NTN1 interference on tumor progression had already been reported (Paradisi *et al*, 2013b; Broutier *et al*, 2016a; Grandin *et al*, 2016a), our study first established the relevance of this treatment in settings closer to the clinical situation. Indeed we were able to evaluate the effect of this combination on OsA relapse. In this model in the combination of Dox+aNTN1 Ab showed a dramatic effect as it prevented OsA relapse in 40% of the animals. To our knowledge, a similar effect on OsA relapse had only been reported for the combination of zoledronate and ifosfamide that prevented relapse in 28% of the animals. This combination of zoledranote and ifosfamide was also able to inhibit OsA metastases in 2 different models: one obtained by iv injections of OsA cell line (Ory *et al*, 2005) and the other being a spontaneous metastatic OsA model established in imunodeficient mice (Dass &

Choong, 2007b). Similarly we found the new combination of Dox+aNTN1 Ab dramatically decreases the incidence of lung metastases.

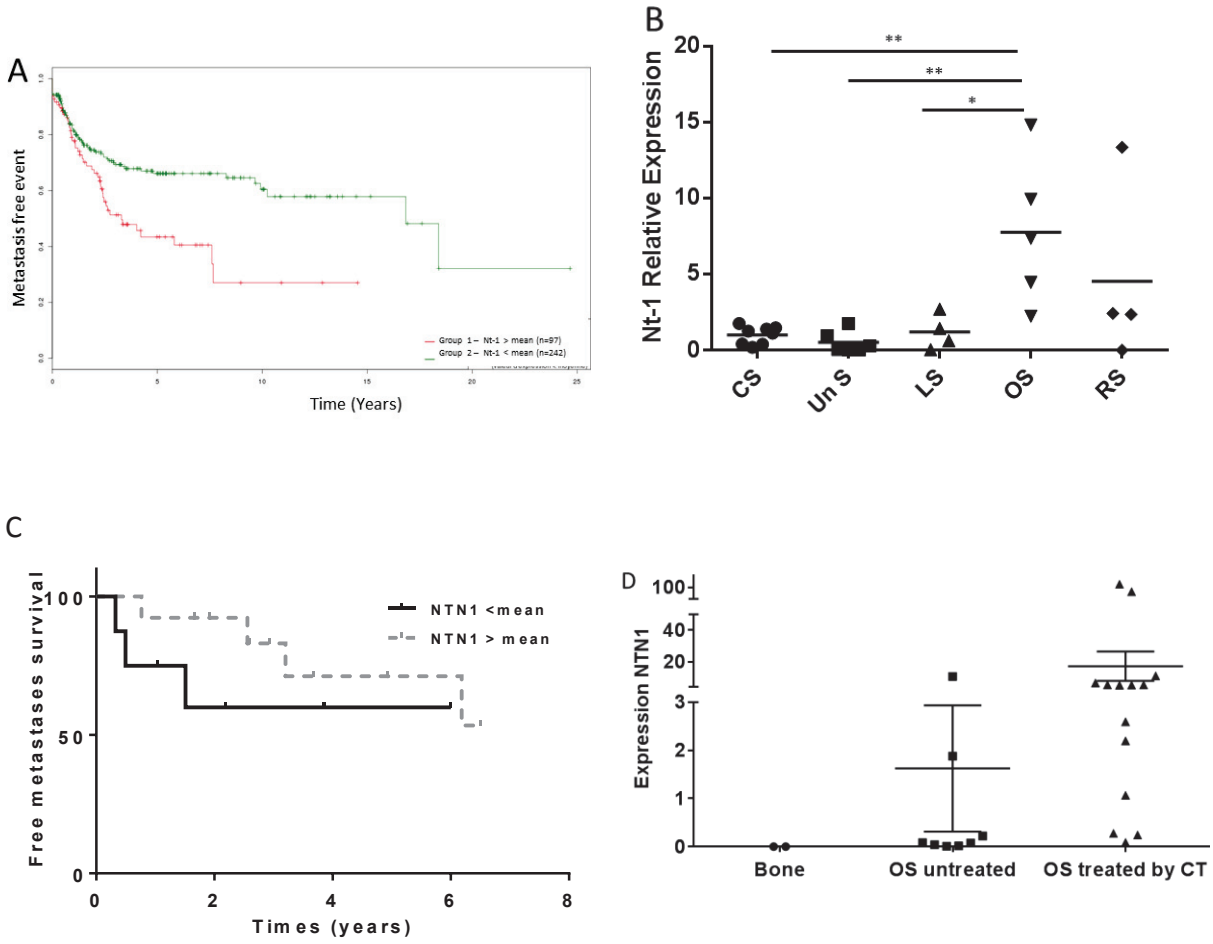
It was shown that high expression level of NTN1 or up regulation of NTN1 expression is associated with higher metastatic capacity of tumors cells in breast cancer (Fitamant *et al*, 2008a) and in colon adenocarcinoma cell line. Indeed among the sarcoma we evaluated that OsA was the one with the highest NTN1 expression level and is also the one with the higher metastatic capacity. Thus blocking NTN1 interaction with its RD in OsA could reduce cells migration capacity like it was shown in hepatocellular carcinoma and prostate carcinoma cell lines (Han *et al*, 2015). The decrease in lungs metastases we observed in animals receiving the aNTN1 ab alone or in combination could be due to an inhibition of OsA cells migration caused by its prevention of NTN1/DR interaction. A hypothesis that was validated by in vitro migration assays. Similar effects were reported with the use of NTN1 specific siRNA that was able to decrease the migration of melanoma cell lines (Fitamant *et al*, 2008b). The metastatic spreading is a complex multistep process involving EMT. It is known that overexpression of NTN1 could induce the expression of Twist and Snail while suppressing E Cadherin expression; three markers of the EMT (Yan *et al*, 2014).These data suggest that NTN1 can promote this cellular plasticity, thus blocking NTN1 interaction with its receptors could also limit OsA cells involvement in EMT and prevent metastatic dissemination.

Because our syngeneic rat OsA model recapitulates OsA complex biology and interactions with its osseous and immunologic environment, we were able to observe the "bystander effect" of Dox and aNTN1 ab combination on intratumoral TAM infiltrate. Macrophages appear to be a critical immune population in OsA.

The role of immune environment, in particular of TAM, in tumor response has been shown to be important for osteosarcoma. Indeed it was shown TAM can exert a dual influence on the activity of chemotherapy and radiotherapy, either antagonizing their anti-tumor efficacy, instead, enhancing the overall antitumor effect (Mantovani, 2012). The role of M1 and M2 macrophages in this tumor response is still controversial for OsA. But recent studies showed M2-type ($CD68^+$ $CD163^+$) macrophages seem to exacerbate T-cell immunosuppression in the osteosarcoma microenvironment (Han *et al*, 2016). Thus a treatment or combination that enables to reduce intratumoral $CD163^+$ TAMS would at the same time enable the establishment of a more antitumoral proinflammatory immune environment. In all our *in vivo* assays we observed such a response after Dox+aNTN1 Ab treatment: tumors from this

treatment group were almost devoid of $CD163^+$ macrophages. NTN1 implication in macrophages recruitment and polarization toward M2 phenotype has been described (Ranganathan *et al*, 2013). And for the first time, we report here the immunomodulatory action of blocking NTN1/DR interaction with an NTN1 monoclonal antibody. In this work, we report NTN1 interference can potentiate chemotherapies and can prevent OsA metastatic spreading and relapse, the two major therapeutic challenges of this sarcoma. Moreover, we established one of the mechanism by which aNTN1 antibody potentiates chemotherapy is by modulating tumor immune environment. As immunotherapy for sarcoma becomes more and more advanced, this last point is of outmost interest in particular because if anti NTN1 caused a more proinflamatorry tumor environment it did not affect TIL: the same proportion of CD3, CD8 T cells were found within the tumor environment of NTN1 treated or control groups. In a recent study, it was shown therapies based on these tumour-infiltrating T cells could be an efficient strategy in osteosarcoma (Théoleyre *et al*, 2005). Thus combining Anti-NTN1 antibody to a T-cell-based immunotherapy could be envisioned for a disease for which limited therapeutic options are currently available.

Figure 1: NTN1expression in sarcoma



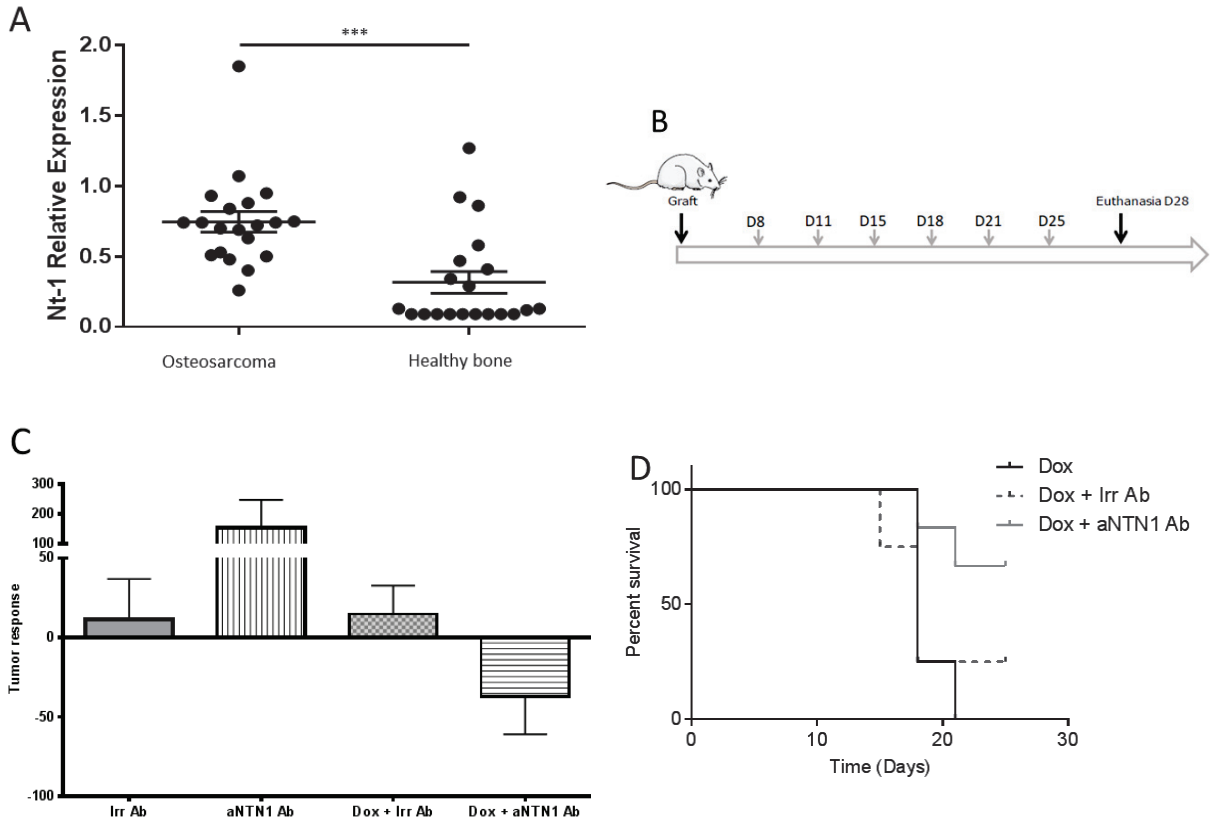
(A) Correlation between NTN1 expression and metastatic relapse in soft tissue sarcomas with complex genomics. A high NTN1 expression is associated with a higher risk of metastatic relapse (p = 0.0012)–ATGSarc database

(B) NTN1 expression is higher in OsA than in other sarcomas. NTN1 expression is analyzed in CS (Chondrosarcoma) – Un S (Unclassified Sarcoma) – LS (Leiomyosarcoma) – OsA (Osteosarcoma) – RS (Rhabdomyosarcoma).

(C) Kaplan Meier analysis of OsA relapse failed to establish a correlation between NTN1 expression level and metastatic relapse in OsA

(D) NTN1 expression is upregulated in response to chemotherapies in OsA (p=0.0049). Rt qPCR analysis of NTN1 expression level in a cohort of OsA without and with chemotherapies (n = 22).

Figure 2: Dox+aNTN1 Ab combination delays OsA progression



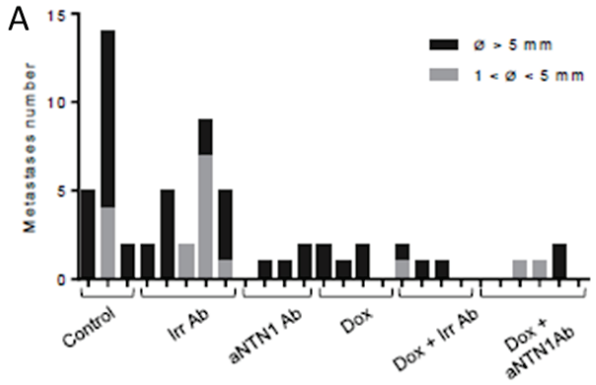
(A) NTN1 expression primary rat OsA model. NTN1 is overexpressed in primary OsA compared to normal bone ($p>0.001$) (n=20; RTqPCR)

(B) Treatment schedule of progressive rat OsA model. Treatments are administered from D8 after tumor implantation twice a week (arrow) for 20 days or till tumor reached the endpoint ($2500mm^3$)

(C) Treatment response is evaluated toward conventional chemotherapy (Dox) at the time of the strongest inhibition (D21). none of the antibody given as monotherapy affects tumor progression, the combination Dox+aNTN1 Ab is the only treatment inhibiting tumor growth.

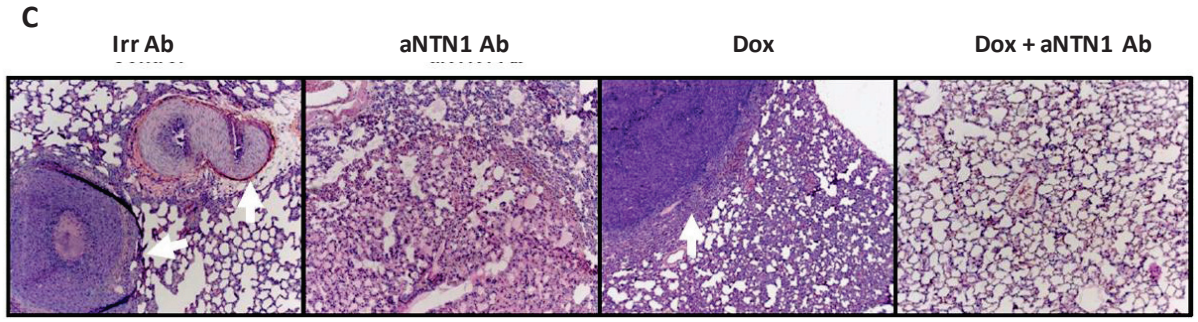
(D) Survival analysis of rats with progressive OsA in the different treatment groups. Dox+aNTN1 Ab combination improved animals survival compared to Dox and Dox+Irr Ab combination ($p=0.0183$)

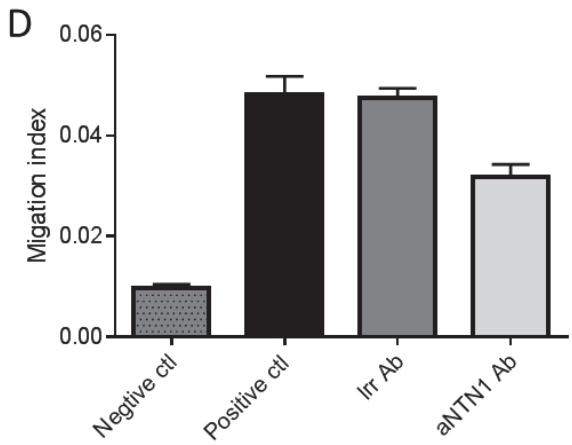
Figure 3:Dox+aNTN1 Ab combination prevents OsA metastases spreading

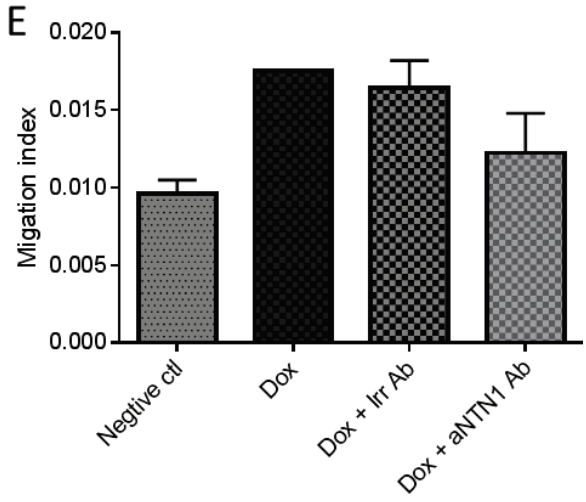


B

	% of rats with lung metastases (d > 5 mm)
Irr Ab	80
aNTN1 Ab	75
Dox	75
Dox + Irr Ab	75
Dox + aNTN1 Ab	50







(A) Lung metastases count reported for each animal of the study. Each bar represents the total number of lung metastases for each animal. The dark grey bar represents thenumber of metastases with di > 5 mm, the light grey bar the number of metastases with d< 5 mm

(B) Percentage of animals presenting macroscopic metastases (diameter > 5 mm) in each treatment group.pas de groupe Ctrl

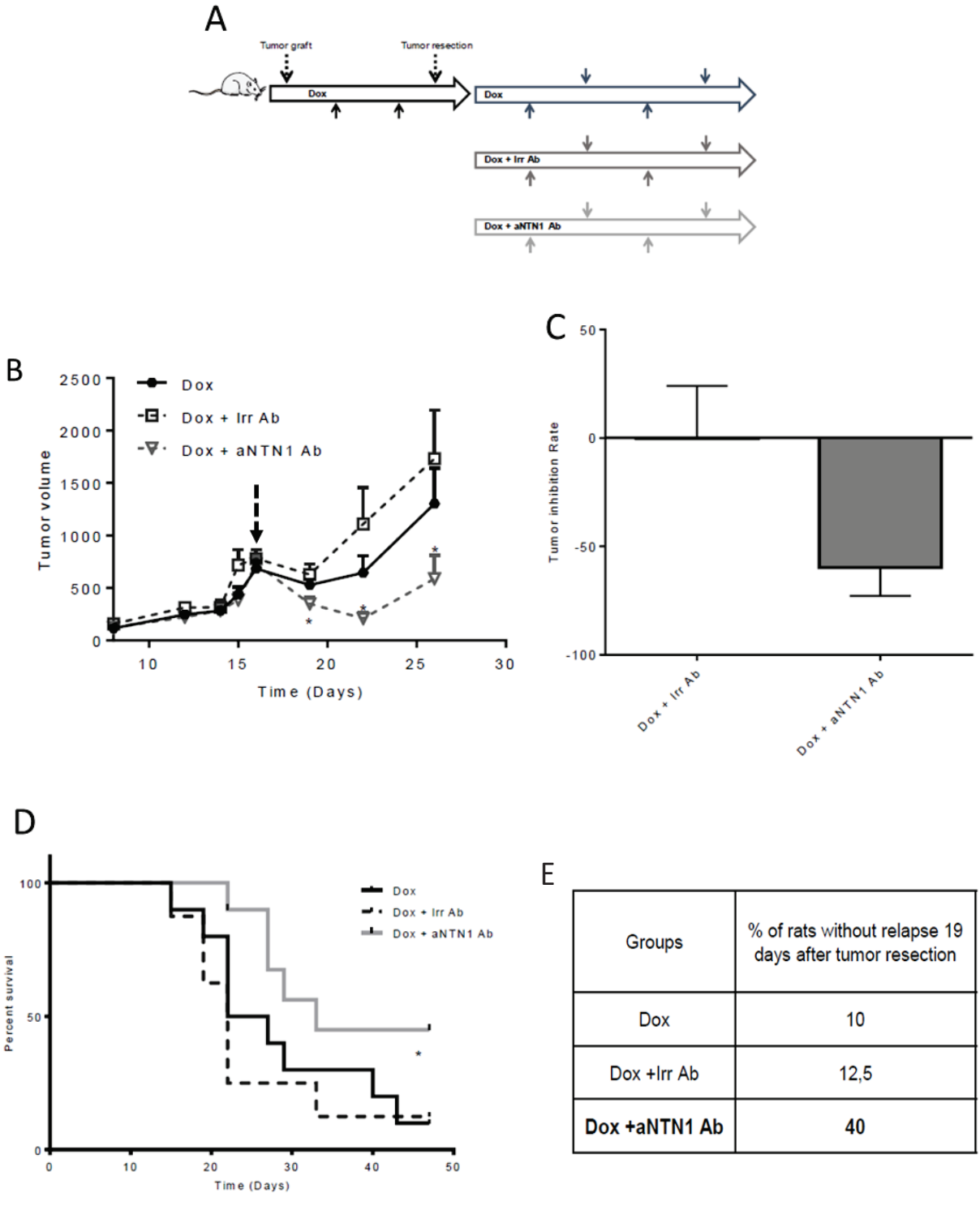
(C) HPS pas d'abreviation staining of representative lungs for each treatment group shown the presence of metastases in control and Dox treated animals (White arrows) (Magnification x50)

Cells migration was using the xCelligence apparatus. MNNH/HOS cells migration is induced by an FBS gradient in the lower chamber (positive control). Migration index was report for each treatment.

(D) Migration index for cells treated with Irr Ab or aNTN1 Ab. The addition of aNTN1 Ab in the upper chamber diminishes MNNG/HOS cells migration (Irr Ab)

(E) Migration index for cells treated with Dox-based combinations. The addition of Dox+aNTN1 Ab in the upper chamber causes a net decrease in cells migration compared to Dox alone.

Figure 4: Dox+aNTN1 Ab combination delays OsA relapse



E

Groups	% of rats without relapse 19 days after tumor resection
Dox	10
Dox +Irr Ab	12,5
Dox +aNTN1 Ab	**40**

(A) Treatment schedule of relapsed rat OsA model. All OsA bearing rats received 2 injections of Dox before undergoing R2 tumor resection. They are then randomly divided into the treatments groups. Treatments are administered from D9 after tumor implantation twice a week (arrow) for 20 days or till tumor reaches the endpoint ($2500mm^3$).

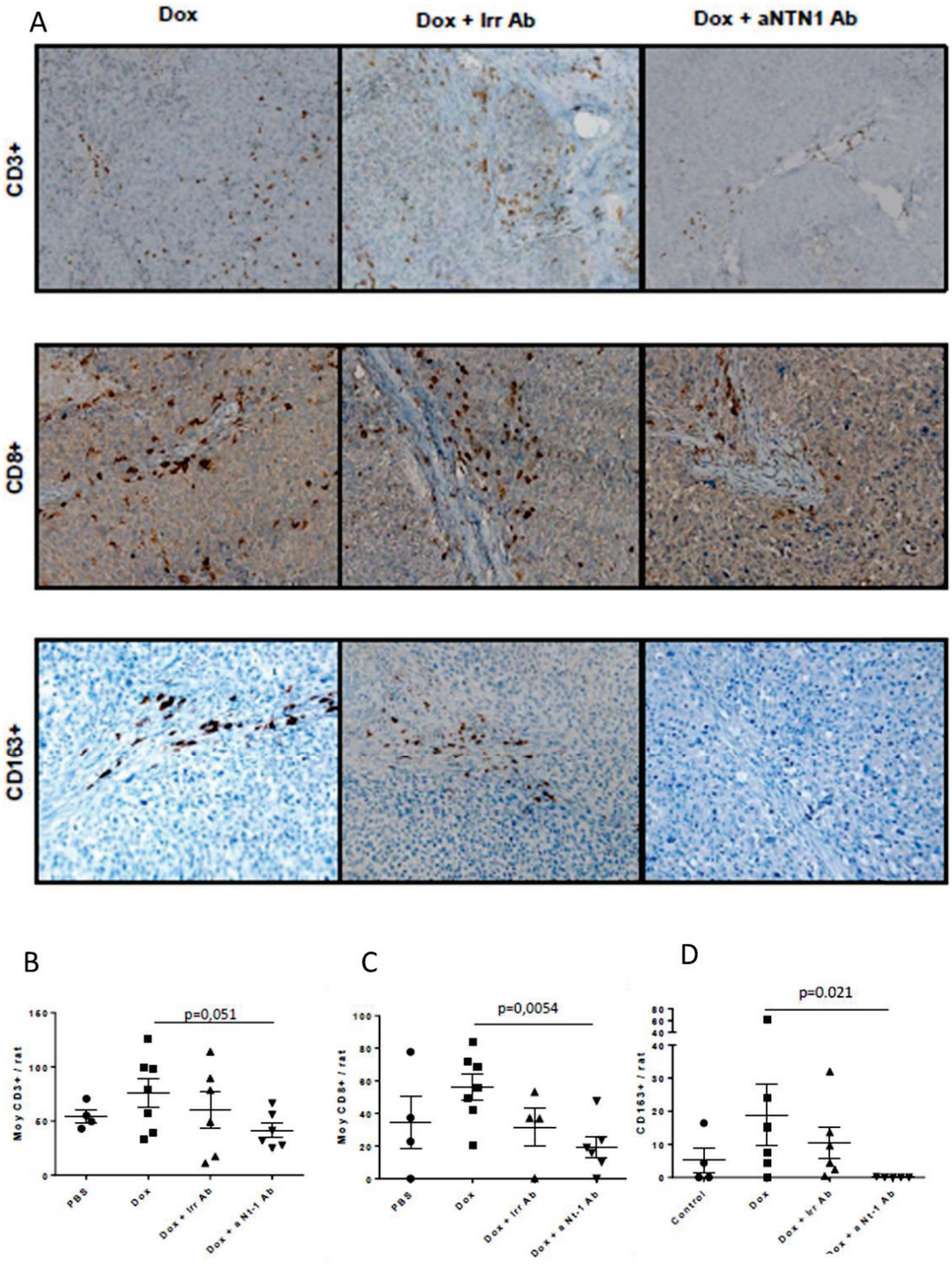
(B) Tumor progression over treatment period (28 days). Tumor progression is slowed down in Dox+aNTN1 Ab since the 1st injection post R2 surgery (Arrow) this slower progression is maintained till the end of the experimentation ($p<0.03$).

(C) Percentage of animals not relapsing at the end of the study for each treatment group.

(D) Tumor inhibition rate for combined treatment in comparison to Dox at day 15 after tumor resection. Dox+aNTN1 Ab combination tends to significantly inhibit tumor progression compared to conventional chemotherapy. $p = 0.057$

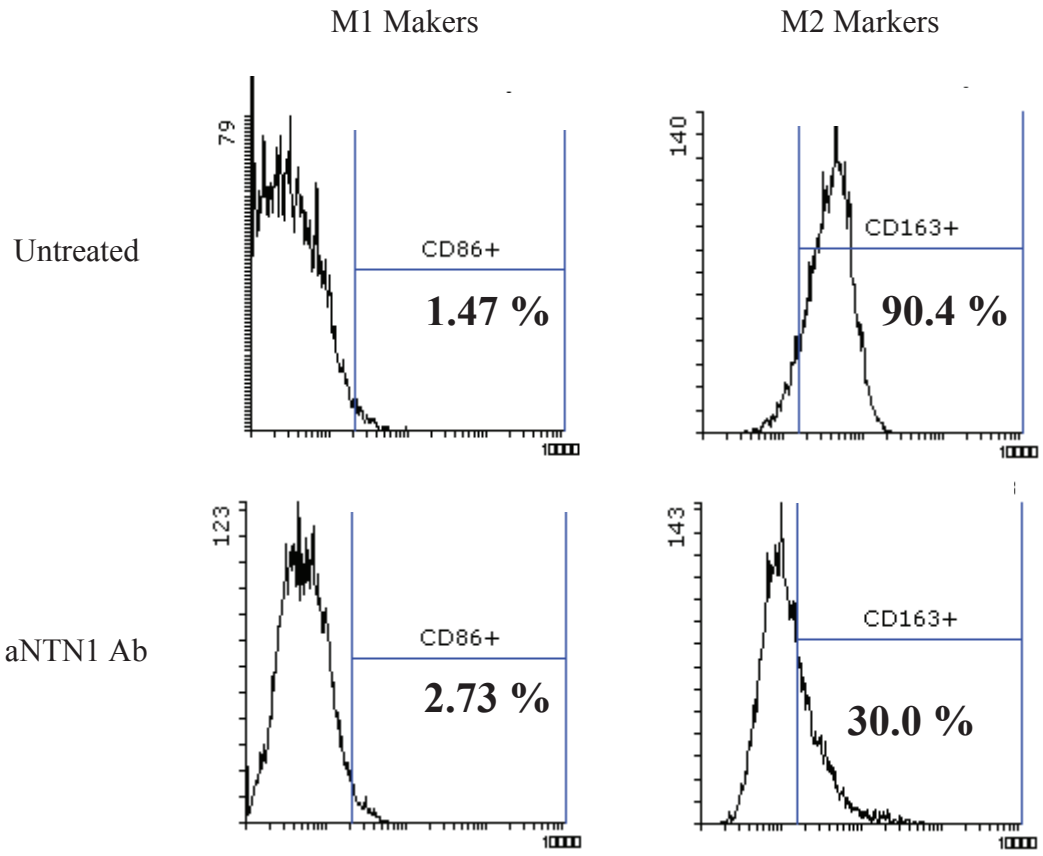
(E) Kaplan meyer analysis of relapsed OsA rats survival. The Dox+aNTN1 Ab combination significantly improved animals survival ($p=0.0103$)

Figure 5: Dox+aNTN1 Ab combination decreased intratumoral M2 macrophages infiltration



(A) Representative pictures of $CD3^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes (Brown arrow) and $CD163^+$ macrophages (Brown arrow) tumor infiltrates for each treatment groups Mean counts of intratumoral effectors **(B)** $CD3^+$ T cells**, (C)** $CD8^+$ T cells **(D)** and $CD163^+$ M2 macrophages show a net decrease in $CD163^+$ macrophages of Dox +aNTN1 Ab treated group.

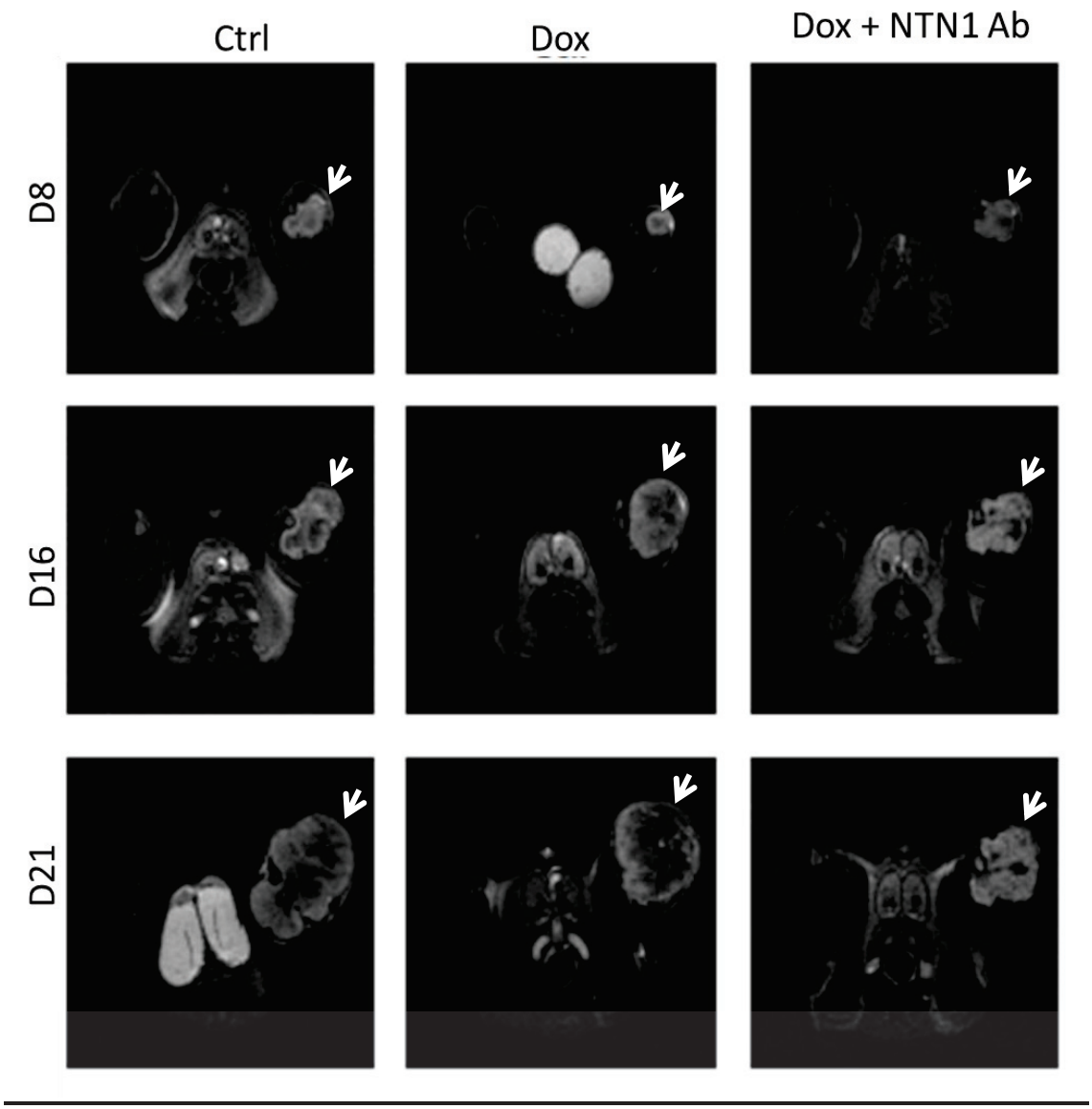
Figure 6: aNTN1 Ab decrease CD163 expression rat macrophages *in vitro*



After TGF-β M2 induced polarization macrophages were incubated with aNTN1 Ab. aNTN1 Ab decrease CD163 expression at the surface of rats macrophages, while slightly increasing CD86 (M1 macrophage marker) expression

Supplementary Data S1

Axial MRI follow up of tumor (white arrow) evolution throughout the study shows a constant evolution of Control and Dox-treated animals whereas tumor progression is slowed down in the Dox+aNTN1 Ab treatment group



Alcántara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127**: 1359–1372.

Allouche M, Delbrück HG, Klein B, Masse R, Matar A, Morin M, Lafuma J, Jasmin C (1980) Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive 144Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int J Cancer* **26**: 777–782.

Bielack S, Jürgens H, Jundt G, Kevric M, Kühne T, Reichardt P, Zoubek A, Werner M, Winkelmann W, Kotz R (2009) Osteosarcoma: The COSS Experience. pp. 289–308.

Broutier L, Creveaux M, Vial J, Tortereau A, Delcros J-G, Chazot G, McCarron MJ, Leon S, Pangault C, Gadot N, Colombe A, Boulland M-L, Blachier J, Marie JC, Traverse-Glehen A, Donze O, Chassagne-Clement C, Salles G, Tarte K, Mehlen P, Castets M (2016a) Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol Med* **8**: 96–104, doi:10.15252/emmm.201505480.

Broutier L, Creveaux M, Vial J, Tortereau A, Delcros J-G, Chazot G, McCarron MJ, Leon S, Pangault C, Gadot N, Colombe A, Boulland M-L, Blachier J, Marie JC, Traverse-Glehen A, Donze O, Chassagne-Clement C, Salles G, Tarte K, Mehlen P, Castets M (2016b) Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol Med* **8**: 96–104, doi:10.15252/emmm.201505480.

Buddingh EP, Kuijjer ML, Duim RAJ, Bürger H, Agelopoulos K, Myklebost O, Serra M, Mertens F, Hogendoorn PCW, Lankester AC, Cleton-Jansen A-M (2011) Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin Cancer Res An Off J Am Assoc Cancer Res* **17**: 2110–2119, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2047.

Chen X, Bahrami A, Pappo A, Easton J, Dalton J, Hedlund E, Ellison D, Shurtleff S, Wu G, Wei L, Parker M, Rusch M, Nagahawatti P, Wu J, Mao S, Boggs K, Mulder H, Yergeau D, Lu C, Ding L, Edmonson M, Qu C, Wang J, Li Y, Navid F, Daw N, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Dyer MA (2014) Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Rep* **7**: 104,

doi:10.1016/j.celrep.2014.03.003.

Dass CR, Choong PFM (2007a) Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol Cancer Ther* **6**: 3263–3270, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0546.

Dass CR, Choong PFM (2007b) Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol Cancer Ther* **6**: 3263–3270, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0546.

Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P (2009a) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* **206**: 833–847, doi:10.1084/jem.20082299.

Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P (2009b) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* **206**: 833–847, doi:10.1084/jem.20082299.

Duchman KR, Gao Y, Miller BJ (2015) Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol* **39**: 593–599, doi:10.1016/j.canep.2015.05.001.

Dumars C, Ngyuen J-M, Gaultier A, Lanel R, Corradini N, Gouin F, Heymann D, Heymann M-F (2016) Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.13055.

Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux M-M, Guix C, Treilleux I, Scoazec J-Y, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P (2008a) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4850–4855, doi:10.1073/pnas.0709810105.

Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux M-M, Guix C, Treilleux I, Scoazec J-Y, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P (2008b) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 4850–4855, doi:10.1073/pnas.0709810105.

Fouladi M, Laningham F, Wu J, O'Shaughnessy MA, Molina K, Broniscer A, Spunt SL, Luckett I, Stewart CF, Houghton PJ, Gilbertson RJ, Furman WL (2007) Phase I study of

everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **25**: 4806–4812, doi:10.1200/JCO.2007.11.4017.

Gibert B, Mehlen P (2015) Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res* **75**: 5171–5175, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3652.

Gomez-Brouchet A, Illac C, Gilhodes J, Bouvier C, Aubert S, Guinebretiere J-M, Marie B, Larousserie F, Entz-Werlé N, de Pinieux G, Filleron T, Minard V, Minville V, Mascard E, Gouin F, Jimenez M, Ledeley M-C, Piperno-Neumann S, Brugieres L, Rédini F (2017) CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies fromthe French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **6**: e1331193, doi:10.1080/2162402X.2017.1331193.

Grandin M, Mathot P, Devailly G, Bidet Y, Ghantous A, Favrot C, Gibert B, Gadot N, Puisieux I, Herceg Z, Delcros J, Bernet A, Mehlen P, Dante R (2016a) Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin- 1 interference. *EMBO Mol Med* **8**: 863–877, doi:10.15252/emmm.201505945.

Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Boussouar A, Abes R, Dean Y, Neves D, Bernet A, Depil S, Schneiders F, Poole K, Dante R, Koch M, Mehlen P, Stetefeld J (2016b) Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell* **29**: 173–185, doi:10.1016/j.ccell.2016.01.001.

Grignani G, Palmerini E, Ferraresi V, D'Ambrosio L, Bertulli R, Asaftei SD, Tamburini A, Pignochino Y, Sangiolo D, Marchesi E, Capozzi F, Biagini R, Gambarotti M, Fagioli F, Casali PG, Picci P, Ferrari S, Aglietta M, Italian Sarcoma Group (2015) Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol* **16**: 98–107, doi:10.1016/S1470-2045(14)71136-2.

Han P, Fu Y, Liu J, Wang Y, He J, Gong J, Li M, Tan Q, Li D, Luo Y, Han J, Liu J, Tu W, Wang Y, Tian D, Yan W (2015) Netrin-1 promotes cell migration and invasion by down-regulation of BVES expression in human hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* **5**: 1396–1409.

Han Q, Shi H, Liu F (2016) CD163(+) M2-type tumor-associated macrophage support the suppression of tumor-infiltrating T cells in osteosarcoma. *Int Immunopharmacol* **34**: 101–106, doi:10.1016/j.intimp.2016.01.023.

Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R (2015) Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J Clin Oncol* **33**: 3029–3035, doi:10.1200/JCO.2014.59.4895.

Kempf-Bielack B, Bielack SS, Jürgens H, Branscheid D, Berdel WE, Exner GU, Göbel U, Helmke K, Jundt G, Kabisch H, Kevric M, Klingebiel T, Kotz R, Maas R, Schwarz R, Semik M, Treuner J, Zoubek A, Winkler K (2005) Osteosarcoma Relapse After Combined Modality Therapy: An Analysis of Unselected Patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J Clin Oncol* **23**: 559–568, doi:10.1200/JCO.2005.04.063.

Ko SY, Blatch GL, Dass CR (2014) Netrin-1 as a potential target for metastatic cancer: focus on colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **33**: 101–113, doi:10.1007/s10555-013-9459-z.

Kurzman ID, Cheng H, MacEwen EG (1994) Effect of liposome-muramyl tripeptide combined with recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on canine monocyte activity. *Cancer Biother* **9**: 113–121.

Kurzman ID, MacEwen EG, Rosenthal RC, Fox LE, Keller ET, Helfand SC, Vail DM, Dubielzig RR, Madewell BR, Rodriguez CO (1995) Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin. *Clin Cancer Res An Off J Am Assoc Cancer Res* **1**: 1595–1601.

Mantovani A (2012) MSCs, Macrophages, and Cancer: A Dangerous Ménage-à-Trois. *Cell Stem Cell* **11**: 730–732, doi:10.1016/j.stem.2012.11.016.

Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec J-Y, Mehlen P (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* **431**: 80–84, doi:10.1038/nature02788.

Mehlen P, Bredesen DE (2011) Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* **4**: mr2, doi:10.1126/scisignal.2001521.

Mehlen P, Puisieux A (2006) Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**: 449–458, doi:10.1038/nrc1886.

Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**: 801–804, doi:10.1038/27441.

Meyers PA, Healey JH, Chou AJ, Wexler LH, Merola PR, Morris CD, Laquaglia MP, Kellick MG, Abramson SJ, Gorlick R (2011) Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* **117**: 1736–1744, doi:10.1002/cncr.25744.

Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009a) International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* **125**: 229–234, doi:10.1002/ijc.24320.

Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009b) Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* **115**: 1531–1543, doi:10.1002/cncr.24121.

Nardin A, Lefebvre ML, Labroquere K, Faure O, Abastado JP (2006) Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma. *Curr Cancer Drug Targets* **6**: 123–133.

Ory B, Heymann M-F, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F (2005) Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **104**: 2522–2529, doi:10.1002/cncr.21530.

Pahl JH, Kwappenberg KM, Varypataki EM, Santos SJ, Kuijjer ML, Mohamed S, Wijnen JT, van Tol MJ, Cleton-Jansen A-M, Egeler RM (2014) Macrophages inhibit human osteosarcoma cell growth after activation with the bacterial cell wall derivative liposomal muramyl tripeptide in combination with interferon-γ. *J Exp Clin Cancer Res* **33**: 27.

Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleyssac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G, Cassier PA, Bernet A, Mehlen P (2013a) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* **5**: 1821–1834, doi:10.1002/emmm.201302654.

Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleyssac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G, Cassier PA, Bernet A, Mehlen P (2013b) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* **5**: 1821–1834, doi:10.1002/emmm.201302654.

Pignochino Y, Grignani G, Cavalloni G, Motta M, Tapparo M, Bruno S, Bottos A, Gammaitoni L, Migliardi G, Camussi G, Alberghini M, Torchio B, Ferrari S, Bussolino F, Fagioli F, Picci P, Aglietta M (2009) Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol Cancer* **8**: 118, doi:10.1186/1476-4598-8-118.

Piperno-Neumann S, Le Deley M-C, Rédini F, Pacquement H, Marec-Bérard P, Petit P, Brisse H, Lervat C, Gentet J-C, Entz-Werlé N, Italiano A, Corradini N, Bompas E, Penel N, Tabone M-D, Gomez-Brouchet A, Guinebretière J-M, Mascard E, Gouin F, Chevance A, Bonnet N, Blay J-Y, Brugières L, Sarcoma Group of UNICANCER, French Society of Pediatric Oncology (SFCE), French Sarcoma Group (GSF-GETO) (2016) Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **17**: 1070–1080, doi:10.1016/S1470-2045(16)30096-1.

Ranganathan P V., Jayakumar C, Ramesh G (2013) Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization. *AJP Ren Physiol* **304**: F948–F957, doi:10.1152/ajprenal.00580.2012.

Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. *Cell* **78**: 409–424.

Théoleyre S, Mori K, Cherrier B, Passuti N, Gouin F, Rédini F, Heymann D (2005) Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. *BMC Cancer* **5**: 123, doi:10.1186/1471-2407-5-123.

Vail DM, Kurzman ID, Glawe PC, O'Brien MG, Chun R, Garrett LD, Obradovich JE, Fred RM, Khanna C, Colbern GT, Working PK (2002) STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* **50**: 131–136, doi:10.1007/s00280-002-0469-8.

Yan W, Han P, Zhou Z, Tu W, Liao J, Li P, Liu M, Tian D, Fu Y (2014) Netrin-1 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness. *Dig*

Dis Sci **59**: 1213–1221, doi:10.1007/s10620-013-3016-z.

Poster - Symposium du CRCL (Lyon, France – Septembre 2015

NETRIN-1 INTERFERENCE TO PREVENT OSTEOSARCOMA PROGRESSION AND METASTATIC DISSEMINATION.

Morgane MONCHANIN[1], Benjamin DUCAROUGE[2], Benjamin GIBERT[3], Agnes BERNET[2], Anne Valerie DECOUVELAERE[4], Jean Yves BLAY[5], Aurélie DUTOUR [1,6]

1:Tumor Targeting and Immune environement, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon France

2: Nétris Pharma, Lyon, France

3 : Apoptosis, Cancer and Development laboratory Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon France

4: Department of Biopathology and Cytology, Centre Léon Bérard, Lyon France

5: Centre Léon Bérard, Lyon, France

6: Department of Clinical Science, Centre Léon Bérard, Lyon France

Osteosarcoma is the main malignant primary bone tumor in children and adolescents. Current therapies incorporate surgical resection and combinatory chemotherapy which cure around 70 % of patients with localized disease (at 5 years). However, survival for patients with metastatic disease at diagnosis or for relapsed patients remains unchanged over the past 4 decades with an overall 5-year survival rate of 20 %. Thus new therapeutic approaches must be developed. The secreted factor netrin-1 is upregulated in a fraction of human cancers as a mechanism to block apoptosis induced by netrin-1 dependence receptors DCC and UNC5H. It was recently shown that chemotherapies treatments increase netrin-1 and netrin-1 receptors expressions in cell lines. These data suggested that combining conventional chemotherapies with Nt-1 interference could be a promising therapeutic approach, thus we tested the combination of anti- Nt-1 monoclonal antibody and doxorubicin, in a rat syngenic and metastatic osteosarcoma model. Osteosarcoma-bearing rats received 2 IP administrations of anti-nt1 antibody + doxorubicin / week over a period of three weeks. Tumor progression was monitored throughout the treatment period. At the end of the experiment, treatment induced necrosis, apoptosis and mitotic index were analyzed; expression of Nt-1 and dependence receptors were analyzed by RT-qPCR by immunohistochemistry. Tumor immune infiltrate (CD3, CD8 and CD163) were analyzed by immunohistochemistry and flow cytometry. Preliminary results showed that anti-nt1/doxorubicin combination slowed down osteosarcoma progression compared to reference treatment (doxorubicin). Moreover, an effect of the combination treatment on osteosarcoma metastases spreading was observed. Furthermore, the administration of doxorubicin tends to upregulate Nt-1 and UNC5H expression in rat osteosarcoma. We are now planning to evaluate the effect of anti-nt1/doxorubicin combination on osteosarcoma relapse. We expect that the combination anti-nt1/ doxorubicin slow down osteosarcoma relapse and metastases dissemination and maybe a promising therapeutic approach in osteosarcoma.

Mots clés : osteosarcoma, dependence receptors, metastases, netrin, chemotherapy

Présentation oral - EMSOS (La Baule, France, Mai 2016)

NETRIN-1 INTERFERENCE TO PREVENT OSTEOSARCOMA PROGRESSION AND METASTATIC DISSEMINATION

Morgane MONCHANIN[1], Jean-Baptiste LANGLOIS[2], Clémentine FAVROT[3], Agnès BERNET[4], Perrine MAREC BERARD[5], Anne Valérie DECOUVELAERE[6], Jean Yves BLAY[7], Aurélie DUTOUR [1]

1: Team 11, C R C L, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2 : Animage plateforme d'imagerie du vivant. CERMEP –Bron, France

3: Nétris Pharma, Lyon, France

4 : Apoptosis, Cancer and Development laboratory C R C L, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon France

5 : Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrie - Lyon, France

6: Department of Biopathology and Cytology, Centre Léon Bérard, Lyon France

7: Department of medicine Centre Léon Bérard, Lyon, France

Despite the intensification of chemotherapy regimen, 5 years survival for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma remains of 20 %. Many signaling pathways are deregulated in osteosarcoma thus targeted therapies are investigated for osteosarcoma treatment. The secreted factor netrin 1 (Nt1) is overexpressed in many human cancers as a mechanism to block apoptosis. Recent studies showed that chemotherapies induce Nt1 overexpression in tumors and that blocking Nt1 interaction with its receptors potentiates chemotherapy efficacy. These data suggest that combining chemotherapies with Nt1 interference could be a promising therapeutic approach for resistant tumors like osteosarcoma. Thus we evaluated the antitumoral and antimetastatic effects of anti- Nt1 monoclonal antibody (Anti-Nt1) combined to doxorubicin in a rat syngeneic and metastatic osteosarcoma model.

Doxorubicin and Anti-Nt1 were tested as single agent or in combination in rat osteosarcoma model in two settings: as curative treatment or in a phase-II like relapsed models. In both settings, treatments were administered twice a week over a period of 3 to 4 weeks. Tumor progression was monitored throughout treatment by caliper measures and MRI imaging. At the end of the experiments tumors and lung were collected for molecular and immunohistological analyses. To confirm Nt1 induction by chemotherapies, the expression of Nt1 and dependence receptors were analyzed by RT-qPCR. Effect of treatments on osteosarcoma progression was examined conventional histological analyses (HPS and TRAP staining). Moreover treatment's impact on tumor vasculature and immune infiltrate were analyzed by immunohistochemistry using primary antibodies specific for CD3, CD8, CD163 and CD31.

In progressive tumor model, the combination of Anti-Nt1 and doxorubicin caused a marked delay in tumor progression, and increased animals survival (median end point was reached at day 17 in doxorubicin-treated group and at day 22 in doxorubicin + Anti-Nt1 group, $p = 0.0183$). Moreover, this combination dramatically

slowed down metastatic spreading. At the end of the study 75 % animals treated with doxorubicin and 17 % treated with doxorubicin and Anti-Nt1 had lung metastases ≥5 mm diameter. A 2.2 fold increase in Nt1 expression was observed in the doxorubicin +/- Anti Nt1 treated tumors ($p = 0.0483$). In the "phase II like" settings, the combination of doxorubicin and Anti-Nt1 caused a delay in tumor relapse and increased animals survival (median end point was reached at day 15 in doxorubicin group and at day 21 in Anti-Nt1 group; $p = 0.0159$). This treatment slowed down metastatic spreading: 75 % animals treated with doxorubicin had lung metastases versus 25 % of the animals treated with doxorubicin and Anti-Nt1.

Combination of doxorubicin and Anti-Nt1 showed both antitumor and anti metastatic activities, either in progressive or relapsed tumor. These data indicate that this combination could be a way to overcome osteosarcoma chemoresistance and could benefit osteosarcoma patients. The mechanisms of action of this new drugs combination are currently being investigated, more precisely its effect on chemoresistance effectors and on tumor immune microenvironment.

Poster - CETOS (Lisbonne, Portugal – Novembre 2016)

NETRIN-1 INTERFERENCE TO PREVENT OSTEOSARCOMA PROGRESSION AND METASTATIC DISSEMINATION

Morgane MONCHANIN[1], Margaux VIENNE[1], Jean-Baptiste LANGLOIS[2], Agnès BERNET[3], Perrine MAREC BERARD[4], Anne Valérie DECOUVELAERE[5], Jean Yves BLAY[6], Aurélie DUTOUR[1]

1: Team 11, C R C L, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2: Animage plateforme d'imagerie du vivant. CERMEP –Bron, France

3: Apoptosis, Cancer and Development laboratory C R C L, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon France

4: Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrie - Lyon, France

5: Department of Biopathology and Cytology, Centre Léon Bérard, Lyon France

6: Department of medicine Centre Léon Bérard, Lyon, France

Despite the intensification of chemotherapy regimen, 5 years survival for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma remains of 20 %. Many signaling pathways are deregulated in osteosarcoma thus targeted therapies are investigated for osteosarcoma treatment. The secreted factor netrin 1 (Nt1) is overexpressed in many human cancers as a mechanism to block apoptosis. Recent studies showed that chemotherapies induce Nt1 overexpression in tumors and that blocking Nt1 interaction with its receptors potentiates chemotherapy efficacy. These data suggest that combining chemotherapies with Nt1 interference could be a promising therapeutic approach for resistant tumors like osteosarcoma. Thus we evaluated the antitumoral and antimetastatic effects of anti- Nt1 monoclonal antibody (Anti-Nt1) combined to doxorubicin in a rat syngeneic and metastatic osteosarcoma model.

Doxorubicin and Anti-Nt1 were tested as single agent or in combination in rat osteosarcoma model in two settings: as curative treatment or in a phase-II like relapsed models. In both settings, treatments were administered twice a week over a period of 3 to 4 weeks. Tumor progression was monitored throughout treatment by caliper measures and MRI imaging. At the end of the experiments tumors and lung were collected for molecular and immunohistological analyses. To confirm Nt1 induction by chemotherapies, the expression of Nt1 and dependence receptors were analyzed by RT-qPCR. Treatment's effects on osteosarcoma progression, vascularization and immune infiltration was examined by histological analyzes.

In progressive tumor model, the combination of Anti-Nt1 and doxorubicin caused a marked delay in tumor progression, and increased animals survival compared to reference treatment ($p = 0.0183$). Moreover, this combination dramatically slowed down metastatic spreading. At the end of the study 75 % animals treated with doxorubicin and 17 % treated with doxorubicin and Anti-Nt1 had lung metastases ≥5 mm diameter. In the "phase II like" settings, the combination of doxorubicin and Anti-Nt1 caused a delay in tumor relapse and

increased animals survival : 19 days after tumor resection 10 % of rats didn't relapse in doxorubicin group whereas 40 % of animals didn't relapse in combined treatment ($p = 0.0159$).

Combination of doxorubicin and Anti-Nt1 showed both antitumor and anti metastatic activities, either in progressive or relapsed tumor. These data indicate that this combination could be a way to overcome osteosarcoma chemoresistance and could benefit osteosarcoma patients. The mechanisms of action of this new drugs combination are currently being investigated, more precisely its effect on chemoresistance effectors and on tumor immune microenvironment.

Poster - ESMO (Madrid, Espagne – Septembre 2017)

A NEW CHEMOTHERAPY-BASED COMBINATION TO PREVENT OSTEOSARCOMA PROGRESSION.

Morgane MONCHANIN[1], Paul BERCHARD[1], Margaux VIENNE[1], Jean-Baptiste LANGLOIS[2], Nicolas GADOT[3], Agnès BERNET[4] Jean Yves BLAY[1-5], Aurélie DUTOUR [1]

1: Apoptosis and sarcoma team, CRCL, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2: Animage – *In vivo* imaging plateform. CERMEP –Bron, France

3: Anipath plateform, Centre Léon Bérard, Lyon, France

4: Apoptosis and cancer team, CRCL, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

5: Department of medicine Centre Léon Bérard, Lyon, France

Despite the intensification of chemotherapy regimen, 5 years survival rates for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma (OS) remains of 20 %. The secreted factor netrin 1 (Nt1) is overexpressed in many human cancers to block apoptosis. Recent studies showed that blocking Nt1 interaction with its receptors potentiates chemotherapy efficacy suggesting that combining chemotherapies with Nt1 interference could be a promising approach for chemoresistant tumors like OS.Analyses of the ATGSarc database (http://atg-sarc.sarcomabcb.org/), indicate that Sarcoma with complex genomic (SCG) with a higher expression of Nt1 have a poorer outcome ($p<0.002$). In addition, qPCR performed on human sarcomas samples showed that Nt1 is higher expressed in OS compared to other SCG (7.75 fold increase - $p <0.02$). These data indicated that Nt1 could be a potential target for OS treatment.

Thus, we evaluated the antitumoral effects of anti Nt1 monoclonal antibody (aNt1) combined to doxorubicin (Dox) in a rat syngeneic and metastatic OS model. In this model, treatments were administered either on progressive OS or post operatively to prevent OS relapse. At the end of the experiments tumors and lung were collected for IHC analyses.

As pre operative treatment, Dox / aNt1 combination caused a marked delay in OS progression (median end point reached at day 17 and day 22 respectively in Dox and Dox / aNt1 group, ($p <0.02$) and dramatically slowed down metastatic spreading: lung metastases ($d> 5mm$) were found respectively in 75 % and 17 % of Dox and Dox / aNt1 treated rats

As post operative treatment, Dox /aNt1combination significantly increased animals survival (median end point reached at day 15 and day 21 respectively in Dox and in Dox / aNt1 group; ($p <0.02$). Moreover, 19 days after

tumor resection, 10 % of the Dox treated tumors hadn't relapsed versus 40 % in the Dox / aNt1 treated group. A variation in tumor vascular density caused by the treatment was found in the Anti Nt1 treated groups as shown by CD146 staining.

Our study reporting the antiproliferative and antimetastatic effects and of Dox / aNt1 Combination in OS indicate that this combined treatment could be a way to overcome OS chemoresistance.

Poster – Symposium CRCL (Lyon, France – Septembre 2017)

A NEW CHEMOTHERAPY-BASED COMBINATION TO PREVENT OSTEOSARCOMA PROGRESSION.

Morgane MONCHANIN[1], Paul BERCHARD[1], Margaux VIENNE[1], Jean-Baptiste LANGLOIS[2], Nicolas GADOT[3], Agnès BERNET[4] Jean Yves BLAY[1-5], Aurélie DUTOUR [1]

1: Apoptosis and sarcoma team, CRCL, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

2: Animage – *In vivo* imaging plateform. CERMEP –Bron, France

3: Anipath plateform, Centre Léon Bérard, Lyon, France

4: Apoptosis and cancer team, CRCL, UMR, INSERM, U1052, Centre Léon Bérard, Lyon, France

5: Department of medicine Centre Léon Bérard, Lyon, France

Despite the intensification of chemotherapy regimen, 5 years survival rates for patients with metastatic or relapsed osteosarcoma (OS) remains of 20 %. The secreted factor netrin 1 (Nt1) is overexpressed in many human cancers to block apoptosis. Recent studies showed that blocking Nt1 interaction with its receptors potentiates chemotherapy efficacy suggesting that combining chemotherapies with Nt1 interference could be a promising approach for chemoresistant tumors like OS.Analyses of the ATGSarc database (http://atg-sarc.sarcomabcb.org/), indicate that Sarcoma with complex genomic (SCG) with a higher expression of Nt1 have a poorer outcome ($p<0.002$). In addition, q PCR performed on human sarcomas samples showed that Nt1 is higher expressed in OS compared to other SCG (7.75 fold increase - $p <0.02$). These data indicated that Nt1 could be a potential target for OS treatment.

Thus, we evaluated the antitumoral effects of anti Nt1 monoclonal antibody (aNt1) combined to doxorubicin (Dox) in a rat syngeneic and metastatic OS model. In this model, treatments were administered either on progressive OS or post operatively to prevent OS relapse. At the end of the experiments tumors and lung were collected for IHC analyses.

As pre operative treatment, Dox / aNt1 combination caused a marked delay in OS progression (median end point reached at day 17 and day 22 respectively in Dox and Dox / aNt1 group, ($p <0.02$) and dramatically slowed down metastatic spreading: lung metastases ($d> 5mm$) were found respectively in 75 % and 17 % of Dox and Dox / aNt1 treated rats

As post operative treatment, Dox /aNt1combination significantly increased animals survival (median end point reached at day 15 and day 21 respectively in Dox and in Dox / aNt1 group; ($p <0.02$). Moreover, 19 days after

tumor resection, 10 % of the Dox treated tumors hadn't relapsed versus 40 % in the Dox / aNt1 treated group. A variation in tumor vascular density caused by the treatment was found in the Anti Nt1 treated groups as shown by CD146 staining.

Our study reporting the antiproliferative and antimetastatic effects and of Dox / aNt1 Combination in OS indicate that this combined treatment could be a way to overcome OS chemoresistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Hui, J. Y. C. Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surg. Clin. North Am.* **96,** 901–914 (2016).

2. Longhi, A., Errani, C., De Paolis, M., Mercuri, M. & Bacci, G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: State of the art. *Cancer Treat. Rev.* **32,** 423–436 (2006).

3. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* **115,** 1531–1543 (2009).

4. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* **125,** 229–234 (2009).

5. Linabery, A. M. & Ross, J. A. Childhood and adolescent cancer survival in the US by race and ethnicity for the diagnostic period 1975-1999. *Cancer* **113,** 2575–2596 (2008).

6. Hansen, M. F., Seton, M. & Merchant, A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J. Bone Miner. Res.* **21 Suppl 2,** P58-63 (2006).

7. PRICE, C. H. Primary bone-forming tumours and their relationship to skeletal growth. *J. Bone Joint Surg. Br.* **40–B,** 574–93 (1958).

8. Murphey, M. D. *et al.* The many faces of osteosarcoma. *Radiographics* **17,** 1205–31 (1997).

9. Dorfman, H. D. & Czerniak, B. Bone cancers. *Cancer* **75,** 203–10 (1995).

10. Fox, M. & Trotta, B. Osteosarcoma: Review of the Various Types with Emphasis on Recent Advancements in Imaging. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* **17,** 123–136 (2013).

11. Savage, S. A. & Mirabello, L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma* **2011,** 548151 (2011).

12. Jo, V. Y. & Doyle, L. A. Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013

World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **25,** 621–643 (2016).

13. Dahlin, D. C. Pathology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 23–32 (1975).

14. Kim, M. S. *et al.* Initial tumor size predicts histologic response and survival in localized osteosarcoma patients. *J. Surg. Oncol.* **97,** 456–61 (2008).

15. Klein, M. J. & Siegal, G. P. Osteosarcoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **125,** 555–581 (2006).

16. Dönmez, F. Y. *et al.* MRI findings in parosteal osteosarcoma: correlation with histopathology. *Diagn. Interv. Radiol.* **14,** 142–52 (2008).

17. Jelinek, J. S. *et al.* Parosteal osteosarcoma: value of MR imaging and CT in the prediction of histologic grade. *Radiology* **201,** 837–42 (1996).

18. Azura, M. *et al.* Parosteal osteosarcoma dedifferentiating into telangiectatic osteosarcoma: importance of lytic changes and fluid cavities at imaging. *Skeletal Radiol.* **38,** 685–690 (2009).

19. Kaya, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **6,** 572–7 (2000).

20. Bielack, S. *et al.* Osteosarcoma: The COSS Experience. in 289–308 (2009). doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_15

21. Scully, S. P., Ghert, M. A., Zurakowski, D., Thompson, R. C. & Gebhardt, M. C. Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **84–A,** 49–57 (2002).

22. Meyer, J. S. *et al.* Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: A report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr. Blood Cancer* **51,** 163–170 (2008).

23. Kayton, M. L. *et al.* Computed tomographic scan of the chest underestimates the number of metastatic lesions in osteosarcoma. *J. Pediatr. Surg.* **41,** 200–206 (2006).

24. Ciccarese, F. *et al.* The many faces of pulmonary metastases of osteosarcoma: Retrospective study on 283 lesions submitted to surgery. *Eur. J. Radiol.* **84,** 2679–2685

(2015).

25. Gulia, A., Puri, A., Pruthi, M. & Desai, S. Oncological and functional outcome of periosteal osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* **48,** 279–84 (2014).

26. Grignani, G. *et al.* Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncol.* **16,** 98–107 (2015).

27. Meazza, C. & Scanagatta, P. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **16,** 543–556 (2016).

28. Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I. & Juergens, H. Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat. Rev.* **40,** 523–532 (2014).

29. Kempf-Bielack, B. *et al.* Osteosarcoma Relapse After Combined Modality Therapy: An Analysis of Unselected Patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J. Clin. Oncol.* **23,** 559–568 (2005).

30. Geller, D. S. *et al.* Targeted therapy of osteosarcoma with radiolabeled monoclonal antibody to an insulin-like growth factor-2 receptor (IGF2R). *Nucl. Med. Biol.* **43,** 812–817 (2016).

31. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The Epidemiology of Osteosarcoma. in *Cancer treatment and research* **152,** 3–13 (2009).

32. Meyers, P. A. *et al.* Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J. Clin. Oncol.* **11,** 449–453 (1993).

33. Ferguson, W. S. & Goorin, A. M. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest.* **19,** 292–315 (2001).

34. Bielack, S. S. *et al.* Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J. Clin. Oncol.* **20,** 776–790 (2002).

35. Briccoli, A. *et al.* Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer* **104,** 1721–1725 (2005).

36. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The Etiology of Osteosarcoma. in *Cancer treatment and*

research **152,** 15–32 (2009).

37. Modèles de conception PowerPoint | Servier. Available at: http://www.servier.fr/smart/modeles-de-conception-powerpoint. (Accessed: 19th October 2017)

38. Kingsley, L. A., Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M. & Guise, T. A. Molecular biology of bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **6,** 2609–17 (2007).

39. Lee, Y. *et al.* DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells. *Oncol. Lett.* **14,** 171–179 (2017).

40. Tu, B. *et al.* Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3. *Oncotarget* **7,** 48296–48308 (2016).

41. Tang, N., Song, W.-X., Luo, J., Haydon, R. C. & He, T.-C. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466,** 2114–30 (2008).

42. Kuchimaru, T. *et al.* Bone resorption facilitates osteoblastic bone metastatic colonization by cooperation of insulin-like growth factor and hypoxia. *Cancer Sci.* **105,** 553–9 (2014).

43. Lamoureux, F. *et al.* Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **67,** 7308–18 (2007).

44. Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S. R. & Wei, Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* **313,** 129–136 (2011).

45. Alfranca, A. *et al.* Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* **72,** 3097–113 (2015).

46. Theoleyre, S. *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15,** 457–475 (2004).

47. Grimaud, E. *et al.* Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am. J. Pathol.* **163,** 2021–31 (2003).

48. Lamoureux, F. *et al.* Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **67,** 7308–18 (2007).

49. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **14,** 722–735 (2014).

50. Hagemann, T. *et al.* Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J. Immunol.* **176,** 5023–32 (2006).

51. Lissbrant, I. F. *et al.* Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int. J. Oncol.* **17,** 445–51 (2000).

52. Simard, F. A. *et al.* Description of the immune microenvironment of chondrosarcoma and contribution to progression. *Oncoimmunology* **6,** e1265716 (2017).

53. Dumars, C. *et al.* Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* **7,** 78343–78354 (2016).

54. Buddingh, E. P. *et al.* Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL-15-activated allogeneic and autologous NK cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **60,** 575–586 (2011).

55. Gomez-Brouchet, A. *et al.* CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies fromthe French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **6,** e1331193 (2017).

56. Chou, A. J. *et al.* Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma. *Cancer* **115,** 5339–5348 (2009).

57. Anderson, P. M. *et al.* Mifamurtide in metastatic and recurrent osteosarcoma: a patient access study with pharmacokinetic, pharmacodynamic, and safety assessments. *Pediatr. Blood Cancer* **61,** 238–44 (2014).

58. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-.).* **331,** 1565–1570 (2011).

59. Lu, S. *et al.* Prevalent expression of MHC class I chain-related molecule A in human osteosarcoma. *Neoplasma* **55,** 266–72 (2008).

60. Aldinucci, D., Celegato, M. & Casagrande, N. Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Lett.* **380,** 243–52 (2016).

61. Wojtowicz-Praga, S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J. Immunother.* **20,** 165–77 (1997).

62. Urakawa, H. *et al.* Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in high grade osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis* **26,** 1005–1012 (2009).

63. Fritzsching, B. *et al.* $CD8^+/FOXP3^+$-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non-survivors: a multicenter validated retrospective study. *Oncoimmunology* **4,** e990800 (2015).

64. Adachi, K. & Tamada, K. Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Sci.* **106,** 945–50 (2015).

65. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12,** 252–264 (2012).

66. Zheng, W., Xiao, H., Liu, H. & Zhou, Y. Expression of programmed death 1 is correlated with progression of osteosarcoma. *APMIS* **123,** 102–107 (2015).

67. Ge, W., Li, J., Fan, W., Xu, D. & Sun, S. Tim-3 as a diagnostic and prognostic biomarker of osteosarcoma. *Tumor Biol.* **39,** 101042831771564 (2017).

68. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82,** 4–6 (1990).

69. Rini, B. I. & Rathmell, W. K. Biological aspects and binding strategies of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13,** 741s–746s (2007).

70. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1,** 27–31 (1995).

71. Jain, R. K. & Munn, L. L. Leaky vessels? Call Ang1! *Nat. Med.* **6,** 131–2 (2000).

72. Zhao, Y. & Adjei, A. A. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* **20,** 660–673 (2015).

73. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5,** 378–389 (2015).

74. Ribatti, D. Tumor refractoriness to anti-VEGF therapy. *Oncotarget* **7,** 46668–46677 (2016).

75. Arjaans, M. *et al.* VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Oncotarget* **7,** 21247–58 (2016).

76. Kaya, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **6,** 572–7 (2000).

77. Zhou, Q. *et al.* VEGF and EMMPRIN expression correlates with survival of patients with osteosarcoma. *Surg. Oncol.* **20,** 13–9 (2011).

78. Chen, D., Zhang, Y.-J., Zhu, K. & Wang, W.-C. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumor Biol.* **34,** 1895–1899 (2013).

79. Rastogi, S. *et al.* Role of vascular endothelial growth factor as a tumour marker in osteosarcoma: a prospective study. *Int. Orthop.* **36,** 2315–2321 (2012).

80. Cho, H.-J. *et al.* Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40,** 1069–76 (2007).

81. Mohseny, A. B. *et al.* An osteosarcoma zebrafish model implicates Mmp-19 and Ets-1 as well as reduced host immune response in angiogenesis and migration. *J. Pathol.* **227,** 245–53 (2012).

82. NAGASE, H., VISSE, R. & MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69,** 562–573 (2006).

83. Radisky, D. C. *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436,** 123–7 (2005).

84. Kunz, P. *et al.* Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer* **16,** 223 (2016).

85. Hatakeyama, M. & Weinberg, R. A. The role of RB in cell cycle control. *Prog. Cell Cycle Res.* **1,** 9–19 (1995).

86. Giacinti, C. & Giordano, A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25,** 5220–5227 (2006).

87. Wadayama, B. *et al.* Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res.* **54,** 3042–8 (1994).

88. Chauveinc, L. *et al.* Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* **22,** 77–88 (2001).

89. Feugeas, O. *et al.* Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.* **14,** 467–472 (1996).

90. Shlien, A. *et al.* A common molecular mechanism underlies two phenotypically distinct 17p13.1 microdeletion syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **87,** 631–42 (2010).

91. Bougeard, G. *et al.* Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. *Oncogene* **22,** 840–6 (2003).

92. Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y. A., Hao, Z. M. & Chang, E. H. Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res.* **53,** 4452–5 (1993).

93. Pflaum, J., Schlosser, S. & MÃ¼ller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front. Oncol.* **4,** (2014).

94. Chène, P. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3,** 102–109 (2003).

95. Valdez, J. M., Nichols, K. E. & Kesserwan, C. Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition. *Br. J. Haematol.* **176,** 539–552 (2017).

96. Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P. & Gorlick, R. Osteosarcoma: Current

Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol.* **33,** 3029–35 (2015).

97. Helman, L. J. & Meltzer, P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat. Rev. Cancer* **3,** 685–694 (2003).

98. Jo, V. Y. & Doyle, L. A. Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013 World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **25,** 621–643 (2016).

99. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).

100. Safa, A. R. *et al.* Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185----Val-185 substitution in P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87,** 7225–9 (1990).

101. Liu, T. *et al.* Targeting <i>ABCB1 (MDR1)</i> in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.13148

102. Pauli-Magnus, C. & Kroetz, D. L. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm. Res.* **21,** 904–13 (2004).

103. Brambilla, D. *et al.* P-glycoprotein binds to ezrin at amino acid residues 149-242 in the FERM domain and plays a key role in the multidrug resistance of human osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **130,** 2824–2834 (2012).

104. Limtrakul, P., Khantamat, O. & Pintha, K. Inhibition of P-Glycoprotein Function and Expression by Kaempferol and Quercetin. *J. Chemother.* **17,** 86–95 (2005).

105. Gillet, J.-P. & Gottesman, M. M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. in 47–76 (2010). doi:10.1007/978-1-60761-416-6_4

106. Keppler, D. Multidrug Resistance Proteins (MRPs, ABCCs): Importance for Pathophysiology and Drug Therapy. in 299–323 (2011). doi:10.1007/978-3-642-14541-4_8

107. Rajkumar, T. & Yamuna, M. Multiple pathways are involved in drug resistance to doxorubicin in an osteosarcoma cell line. *Anticancer. Drugs* **19,** 257–65 (2008).

108. Serra, M. & Hattinger, C. M. The pharmacogenomics of osteosarcoma. *Pharmacogenomics J.* **17,** 11–20 (2017).

109. Serra, M. *et al.* May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int. J. Oncol.* **29,** 1459–68 (2006).

110. Belkov, V. M. *et al.* Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood* **93,** 1643–50 (1999).

111. van der Heijden, J. W., Dijkmans, B. A. C., Scheper, R. J. & Jansen, G. Drug Insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs--from bench to bedside. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3,** 26–34 (2007).

112. Goldman, I. D. & Matherly, L. H. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther.* **28,** 77–102 (1985).

113. Bertino, Göker, Gorlick, Li & Banerjee. Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1,** 223–226 (1996).

114. Jabeen, S. *et al.* Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J.* **15,** 385–390 (2015).

115. Patiño-García, A., Zalacaín, M., Marrodán, L., San-Julián, M. & Sierrasesúmaga, L. Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J. Pediatr.* **154,** 688–93 (2009).

116. Errani, C. *et al.* Palliative therapy for osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11,** 217–227 (2011).

117. Semenza, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* **8,** S62-7 (2002).

118. Meijer, T. W. H., Kaanders, J. H. A. M., Span, P. N. & Bussink, J. Targeting Hypoxia, HIF-1, and Tumor Glucose Metabolism to Improve Radiotherapy Efficacy. *Clin. Cancer Res.* **18,** 5585–5594 (2012).

119. Yang, Q.-C. *et al.* Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor-1α in Human Osteosarcoma: Correlation with Clinicopathological Parameters and Survival Outcome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **37,** 127–134 (2007).

120. Feng, H. *et al.* Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. bone Oncol.* **5,** 67–73 (2016).

121. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387,** 296–9 (1997).

122. Chen, Z., Guo, J., Zhang, K. & Guo, Y. TP53 Mutations and Survival in Osteosarcoma Patients: A Meta-Analysis of Published Data. *Dis. Markers* **2016,** 4639575 (2016).

123. Fu, H.-L. *et al.* A systematic review of p53 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma. *Tumor Biol.* **34,** 3817–3821 (2013).

124. Duhamel, L. A. E. *et al.* Frequency of Mouse Double Minute 2 (MDM2) and Mouse Double Minute 4 (MDM4) amplification in parosteal and conventional osteosarcoma subtypes. *Histopathology* **60,** 357–9 (2012).

125. Lorenz, S. *et al.* Unscrambling the genomic chaos of osteosarcoma reveals extensive transcript fusion, recurrent rearrangements and frequent novel TP53 aberrations. *Oncotarget* **7,** 5273–5288 (2016).

126. Xie, C. *et al.* Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells by regulation of the MDM2-p53 signaling. *Onco. Targets. Ther.* **9,** 4005–13 (2016).

127. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 455–65 (2013).

128. O'Neill, K. L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y. & Luo, X. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev.* **30,** 973–988 (2016).

129. Strasser, A., Cory, S. & Adams, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* **30,** 3667–3683 (2011).

130. Ouyang, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis,

autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* **45,** 487–498 (2012).

131. Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* **39,** 615–47 (2003).

132. Billard, C. BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments. *Mol. Cancer Ther.* **12,** 1691–1700 (2013).

133. Delbridge, A. R. D. & Strasser, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* **22,** 1071–1080 (2015).

134. Wu, X., Cai, Z., Lou, L. & Zhu, Y. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* **36,** 212–6 (2012).

135. Wang, Z.-X. *et al.* Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone* **47,** 445–54 (2010).

136. Lie, D.-C. *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437,** 1370–5 (2005).

137. Logan, C. Y. & Nusse, R. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20,** 781–810 (2004).

138. Boras-Granic, K. & Wysolmerski, J. J. Wnt signaling in breast organogenesis. *Organogenesis* **4,** 116–22 (2008).

139. Baron, R. & Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* **19,** 179–192 (2013).

140. Bain, G., Müller, T., Wang, X. & Papkoff, J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301,** 84–91 (2003).

141. Hu, H. *et al.* Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* **132,** 49–60 (2004).

142. Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. & Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* **8,** 739–50 (2005).

143. Hill, T. P., Später, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. & Hartmann, C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* **8,** 727–38 (2005).

144. Rodda, S. J. & McMahon, A. P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* **133,** 3231–44 (2006).

145. Hoang, B. H. Wnt, osteosarcoma, and future therapy. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **20,** 58–9 (2012).

146. Bjornsti, M.-A. & Houghton, P. J. The tor pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 335–348 (2004).

147. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129,** 1261–74 (2007).

148. Engelman, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* **9,** 550–62 (2009).

149. Lodish, H. F. *Molecular cell biology*. (W.H. Freeman, 2000).

150. Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V. & Tabernero, J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **13,** 1021–31 (2014).

151. Perry, J. A. *et al.* Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** E5564-73 (2014).

152. Freeman, S. S. *et al.* Copy number gains in *EGFR* and copy number losses in *PTEN* are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer* **113,** 1453–1461 (2008).

153. Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front. Oncol.* **4,** 64 (2014).

154. Zhou, Q. *et al.* mTOR/p70S6K signal transduction pathway contributes to osteosarcoma progression and patients' prognosis. *Med. Oncol.* **27,** 1239–45 (2010).

155. Guo, Y. *et al.* Insulin-like growth factor-1 promotes osteogenic differentiation and

collagen I alpha 2 synthesis via induction of mRNA-binding protein LARP6 expression. *Dev. Growth Differ.* **59,** 94–103 (2017).

156. Yakar, S. *et al.* Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* **110,** 771–781 (2002).

157. Li, Z., Miard, S., Laplante, M., Sonenberg, N. & Picard, F. Insulin stimulates IGFBP-2 expression in 3T3-L1 adipocytes through the PI3K/mTOR pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **358,** 63–68 (2012).

158. Robl, B., Fuchs, B., Husmann, M., Bode-Lesniewska, B. & Jentzsch, T. Worse prognosis of osteosarcoma patients expressing IGF-1 on a tissue microarray. (2014). doi:10.5167/UZH-98588

159. Behjati, S. *et al.* Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nat. Commun.* **8,** 15936 (2017).

160. Kappel, C. C., Velez-Yanguas, M. C., Hirschfeld, S. & Helman, L. J. Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for in vitro growth. *Cancer Res.* **54,** 2803–7 (1994).

161. Burrow, S., Andrulis, I. L., Pollak, M. & Bell, R. S. Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **69,** 21–7 (1998).

162. Seyedin, S. M., Thomas, T. C., Thompson, A. Y., Rosen, D. M. & Piez, K. A. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82,** 2267–71 (1985).

163. Matsumoto, T. & Abe, M. TGF-β-related mechanisms of bone destruction in multiple myeloma. *Bone* **48,** 129–134 (2011).

164. Heldin, C.-H. & Moustakas, A. Signaling Receptors for TGF-β Family Members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8,** a022053 (2016).

165. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming Growth Factor-β1 to the Bone. *Endocr. Rev.* **26,** 743–774 (2005).

166. Juárez, P. & Guise, T. A. TGF-β in cancer and bone: Implications for treatment of bone

metastases. *Bone* **48,** 23–29 (2011).

167. Wang, C.-Y., Ren, J.-B., Liu, M. & Yu, L. Targeting miR-29 induces apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells via regulation of TGF-β1/PUMA signal. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20,** 3552–60 (2016).

168. Piccolo, S., Dupont, S. & Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **94,** 1287–312 (2014).

169. Mortus, J. R., Zhang, Y. & Hughes, D. P. M. Developmental Pathways Hijacked by Osteosarcoma. in 93–118 (2014). doi:10.1007/978-3-319-04843-7_5

170. Chan, L. H. *et al.* Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression. *Oncogene* **33,** 4857–66 (2014).

171. Bouvier, C. *et al.* Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* **7,** 64702–64710 (2016).

172. Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Dev. Cell* **19,** 491–505 (2010).

173. Yu, F.-X., Zhao, B. & Guan, K.-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163,** 811–828 (2015).

174. Wang, D.-Y. *et al.* Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance. *Chin. J. Cancer* **35,** 47 (2016).

175. Cates, J. M. M. Reporting Surgical Resection Margin Status for Osteosarcoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **41,** 633–642 (2017).

176. Bertrand, T. E., Cruz, A., Binitie, O., Cheong, D. & Letson, G. D. Do Surgical Margins Affect Local Recurrence and Survival in Extremity, Nonmetastatic, High-grade Osteosarcoma? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **474,** 677–83 (2016).

177. Won, K. Y., Park, H.-R. & Park, Y.-K. Prognostic implication of immunohistochemical Runx2 expression in osteosarcoma. *Tumori* **95,** 311–6

178. Ivkovic, S. *et al.* Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* **130,** 2779–91 (2003).

179. Perbal, B. *et al.* Prognostic Value of CCN3 in Osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **14,** 701–709 (2008).

180. Kitajima, S. & Takahashi, C. Intersection of retinoblastoma tumor suppressor function, stem cells, metabolism, and inflammation. *Cancer Sci.* **108,** 1726–1731 (2017).

181. Link, M. P. Adjuvant therapy in the treatment of osteosarcoma. *Important Adv. Oncol.* 193–207 (1986).

182. Collins, M. *et al.* Benefits and Adverse Events in Younger Versus Older Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma: Findings From a Meta-Analysis. *J. Clin. Oncol.* **31,** 2303–2312 (2013).

183. Meyers, P. A. *et al.* Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* **117,** 1736–1744 (2011).

184. Punzalan, M. & Hyden, G. The role of physical therapy and occupational therapy in the rehabilitation of pediatric and adolescent patients with osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152,** 367–84 (2009).

185. Choong, P. F. & Sim, F. H. Limb-sparing surgery for bone tumors: new developments. *Semin. Surg. Oncol.* **13,** 64–9

186. Khan, F. A., Lipman, J. D., Pearle, A. D., Boland, P. J. & Healey, J. H. Surgical Technique: Computer-generated Custom Jigs Improve Accuracy of Wide Resection of Bone Tumors. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **471,** 2007–2016 (2013).

187. Ma, L. *et al.* 3D-printed guiding templates for improved osteosarcoma resection. *Sci. Rep.* **6,** 23335 (2016).

188. Dutour, A. *et al.* Targeted imaging of αvβ3 expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: A potential tool to reduce incomplete surgical resection. *Bone* **62,** 71–78 (2014).

189. Panagopoulos, G. N. *et al.* Intercalary reconstructions after bone tumor resections: a review of treatments. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **27,** 737–746 (2017).

190. Su, W. T. *et al.* Surgical management and outcome of osteosarcoma patients with unilateral pulmonary metastases. *J. Pediatr. Surg.* **39,** 418-23-23 (2004).

191. Pfannschmidt, J., Egerer, G., Bischof, M., Thomas, M. & Dienemann, H. Surgical intervention for pulmonary metastases. *Dtsch. Arztebl. Int.* **109,** 645–51 (2012).

192. Szafrański, A., Woźniak, W. & Rychłowska-Pruszyńska, M. [Pulmonary metastases in osteosarcoma patients--treatment results]. *Przegl. Lek.* **61 Suppl 2,** 24–8 (2004).

193. Link, M. P. *et al.* Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 8–14 (1991).

194. Bruland, O. S., Høifødt, H., Saeter, G., Smeland, S. & Fodstad, O. Hematogenous Micrometastases in Osteosarcoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **11,** 4666–4673 (2005).

195. Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer. France. *Sarcomes des tissus mous et ostéosarcomes*. (Arnette Blackwell, 1995).

196. Kalifa, C., Brugières, L. & Le Deley, M.-C. [Neoadjuvant treatment in osteosarcomas]. *Bull. Cancer* **93,** 1115–20 (2006).

197. Riggi, M. *et al.* Cisplatin and continuous infusion vindesine and 5-fluorouracil in non-small cell lung cancer (NSCLC) (ATTIT 002). ATTIT (Association pour le Traitment des Tumeurs Intra-Thoraciques). *Eur. J. Cancer* **29A,** 1914–5 (1993).

198. Chaudhry, A. A. *et al.* Utility of positron emission tomography-magnetic resonance imaging in musculoskeletal imaging. *World J. Radiol.* **8,** 268 (2016).

199. Eselgrim, M. *et al.* Dose intensity of chemotherapy for osteosarcoma and outcome in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS) trials. *Pediatr. Blood Cancer* **47,** 42–50 (2006).

200. Schwarz, R., Bruland, O., Cassoni, A., Schomberg, P. & Bielack, S. The Role of Radiotherapy in Oseosarcoma. in 147–164 (2009). doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_7

201. Ozaki, T. *et al.* Osteosarcoma of the Pelvis: Experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* **21,** 334–341 (2003).

202. DeLaney, T. F. *et al.* Radiotherapy for local control of osteosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61,** 492–8 (2005).

203. Anderson, P. & Salazar-Abshire, M. Improving outcomes in difficult bone cancers

using multimodality therapy, including radiation: physician and nursing perspectives. *Curr. Oncol. Rep.* **8,** 415–22 (2006).

204. Anderson, P. Samarium for osteoblastic bone metastases and osteosarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **7,** 1475–1486 (2006).

205. Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. & Komano, T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268,** 6077–80 (1993).

206. Lourda, M., Trougakos, I. P. & Gonos, E. S. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of clusterin/apolipoprotein J. *Int. J. Cancer* **120,** 611–622 (2007).

207. Perez, J. *et al.* Anti-MDR1 siRNA restores chemosensitivity in chemoresistant breast carcinoma and osteosarcoma cell lines. *Anticancer Res.* **31,** 2813–20 (2011).

208. Susa, M. *et al.* Inhibition of ABCB1 (MDR1) Expression by an siRNA Nanoparticulate Delivery System to Overcome Drug Resistance in Osteosarcoma. *PLoS One* **5,** e10764 (2010).

209. Chen, G. *et al.* MicroRNA-133a Inhibits Osteosarcoma Cells Proliferation and Invasion via Targeting IGF-1R. *Cell. Physiol. Biochem.* **38,** 598–608 (2016).

210. Daqian, W., Chuandong, W., Xinhua, Q., Songtao, A. & Kerong, D. Chimaphilin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines through insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling. *Chem. Biol. Interact.* **237,** 25–30 (2015).

211. Geller, D. S. *et al.* Targeted therapy of osteosarcoma with radiolabeled monoclonal antibody to an insulin-like growth factor-2 receptor (IGF2R). *Nucl. Med. Biol.* **43,** 812–817 (2016).

212. Guo, Y., Rubin, E. M., Xie, J., Zi, X. & Hoang, B. H. Dominant Negative LRP5 Decreases Tumorigenicity and Metastasis of Osteosarcoma in an Animal Model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466,** 2039–2045 (2008).

213. Kansara, M. *et al.* Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **119,** 837–51 (2009).

214. Rubin, E. M. *et al.* Wnt Inhibitory Factor 1 Decreases Tumorigenesis and Metastasis in Osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **9,** 731–741 (2010).

215. Tovar, C. *et al.* MDM2 Small-Molecule Antagonist RG7112 Activates p53 Signaling and Regresses Human Tumors in Preclinical Cancer Models. *Cancer Res.* **73,** 2587–2597 (2013).

216. Vassilev, L. T. *et al.* In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science (80-.).* **303,** 844–848 (2004).

217. Gonzalez, A. Z. *et al.* Novel Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction Featuring Hydrogen Bond Acceptors as Carboxylic Acid Isosteres. *J. Med. Chem.* **57,** 2963–2988 (2014).

218. Wang, B., Fang, L., Zhao, H., Xiang, T. & Wang, D. MDM2 inhibitor Nutlin-3a suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **44,** 685–691 (2012).

219. Zhang, F. *et al.* ABT-737 potentiates cisplatin-induced apoptosis in human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol. Rep.* **38,** 2301–2308 (2017).

220. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).

221. Scharf, V. F. *et al.* Effect of bevacizumab on angiogenesis and growth of canine osteosarcoma cells xenografted in athymic mice. *Am. J. Vet. Res.* **74,** 771–778 (2013).

222. Zhao, Z. *et al.* Inhibition of Growth and Metastasis of Tumor in Nude Mice after Intraperitoneal Injection of Bevacizumab. *Orthop. Surg.* **8,** 234–240 (2016).

223. Pignochino, Y. *et al.* Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol. Cancer* **8,** 118 (2009).

224. Dutour, A. *et al.* Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol. Ther.* **11,** 311–9 (2005).

225. KIM, H.-S., LIM, S.-J. & PARK, Y.-K. Anti-angiogenic factor endostatin in osteosarcoma. *APMIS* **117,** 716–723 (2009).

226. Basappa *et al.* Anti-tumor activity of a novel HS-mimetic-vascular endothelial growth factor binding small molecule. *PLoS One* **7,** e39444 (2012).

227. Gobin, B. *et al.* Imatinib Mesylate Exerts Anti-Proliferative Effects on Osteosarcoma Cells and Inhibits the Tumour Growth in Immunocompetent Murine Models. *PLoS One* **9,** e90795 (2014).

228. Bond, M. *et al.* A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr. Blood Cancer* **50,** 254–8 (2008).

229. Ory, B. *et al.* Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **104,** 2522–2529 (2005).

230. Heymann, D. *et al.* Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **37,** 74–86 (2005).

231. Omer, N. *et al.* Phase-II trials in osteosarcoma recurrences: A systematic review of past experience. *Eur. J. Cancer* **75,** 98–108 (2017).

232. Zion, O. *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas* **38,** 427–35 (2009).

233. Lamora, A. *et al.* Anticancer activity of halofuginone in a preclinical model of osteosarcoma: inhibition of tumor growth and lung metastases. *Oncotarget* **6,** 14413–27 (2015).

234. Boyce, B. F. & Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **473,** 139–46 (2008).

235. Armstrong, A. P. *et al.* RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* **68,** 92–104 (2008).

236. Canon, J. R. *et al.* Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin. Exp.*

Metastasis **25,** 119–129 (2008).

237. Heymann, D. Anti-RANKL therapy for bone tumours: Basic, pre-clinical and clinical evidences. *J. bone Oncol.* **1,** 2–11 (2012).

238. Stopeck, A. T. *et al.* Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J. Clin. Oncol.* **28,** 5132–5139 (2010).

239. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3,** 991–8 (2002).

240. Bielack, S. S. *et al.* Second and subsequent recurrences of osteosarcoma: presentation, treatment, and outcomes of 249 consecutive cooperative osteosarcoma study group patients. *J. Clin. Oncol.* **27,** 557–65 (2009).

241. Penn, I. Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation* **60,** 1485–1491 (1995).

242. Swann, J. B. *et al.* Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 652–656 (2008).

243. Guillou, L. & Aurias, A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch. An Int. J. Pathol.* **456,** 201–217 (2010).

244. Mackall, C. L., Merchant, M. S. & Fry, T. J. Immune-based therapies for childhood cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11,** 693–703 (2014).

245. Gorlick, R. *et al.* Biology of Childhood Osteogenic Sarcoma and Potential Targets for Therapeutic Development. *Clin. Cancer Res.* **9,** 5442–5453 (2003).

246. Ishida, H. *et al.* Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in human osteosarcomas. *Int. J. Oncol.* **17,** 29–61 (2000).

247. Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 in musculoskeletal tumors and induction of HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by SART3-derived peptides. *ResearchGate* (2017).

248. Meyers, P. A. *et al.* Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to

Chemotherapy Improves Overall Survival—A Report From the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **26,** 633–638 (2008).

249. Chou, A. J. *et al.* Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma. *Cancer* **115,** 5339–5348 (2009).

250. Biteau, K. *et al.* L-MTP-PE and zoledronic acid combination in osteosarcoma: preclinical evidence of positive therapeutic combination for clinical transfer. *Am. J. Cancer Res.* **6,** 677–89 (2016).

251. Berger, K. N. & Pu, J. J. PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD - 1 gene. *Gene* **638,** 20–25 (2018).

252. Koirala, P. *et al.* Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **6,** 30093 (2016).

253. Lussier, D. M. *et al.* Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *J. Immunother.* **38,** 96–106 (2015).

254. Paoluzzi, L. *et al.* Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* **6,** 24 (2016).

255. Duffaud, F. *et al.* A phase II trial of second-line pemetrexed in adults with advanced/metastatic osteosarcoma. *Eur. J. Cancer* **48,** 564–70 (2012).

256. Zhu, X. *et al.* C6 ceramide sensitizes pemetrexed-induced apoptosis and cytotoxicity in osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452,** 72–78 (2014).

257. Rousseau, J. *et al.* Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res.* **26,** 2452–62 (2011).

258. Paradisi, A. *et al.* Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol. Med.* **5,** 1821–1834 (2013).

259. Broutier, L. *et al.* Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol. Med.* **8,** 96–104 (2016).

260. Mazelin, L. *et al.* Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* **431,** 80–4 (2004).

261. Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. *Cell* **78,** 409–24 (1994).

262. Nakashiba, T., Nishimura, S., Ikeda, T. & Itohara, S. Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. *Mech. Dev.* **111,** 47–60 (2002).

263. Thiebault, K. *et al.* The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 4173–8 (2003).

264. Liu, Y. *et al.* Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis. *Curr. Biol.* **14,** 897–905 (2004).

265. Park, K. W. *et al.* The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101,** 16210–16215 (2004).

266. Tu, T. *et al.* CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res.* **25,** 275–287 (2015).

267. Mao, X. *et al.* Netrin-1 attenuates cardiac ischemia reperfusion injury and generates alternatively activated macrophages. *Inflammation* **37,** 573–80 (2014).

268. Paradisi, A. *et al.* Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106,** 17146–17151 (2009).

269. Delloye-Bourgeois, C. *et al.* Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* **206,** 833–847 (2009).

270. Goldschneider, D. & Mehlen, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* **29,** 1865–82 (2010).

271. Nikoletopoulou, V. *et al.* Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* **467,** 59–63 (2010).

272. Delloye-Bourgeois, C. *et al.* Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON Pro-Apoptotic Activity. *PLoS Biol.* **11,** e1001623 (2013).

273. Luchino, J. *et al.* Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell* **24,** 673–85 (2013).

274. Delcros, J.-G. & Mehlen, P. Dependence receptors: life or death choices. *doi.org* **100,** 1261–1274 (2013).

275. Kolodziej, P. A. *et al.* frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* **87,** 197–204 (1996).

276. Geisbrecht, B. V, Dowd, K. A., Barfield, R. W., Longo, P. A. & Leahy, D. J. Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J. Biol. Chem.* **278,** 32561–8 (2003).

277. Kruger, R. P., Lee, J., Li, W. & Guan, K.-L. Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. *J. Neurosci.* **24,** 10826–34 (2004).

278. Barallobre, M. J., Pascual, M., Del Río, J. A. & Soriano, E. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **49,** 22–47 (2005).

279. Wang, W., Reeves, W. B. & Ramesh, G. Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor. *AJP Ren. Physiol.* **296,** F723–F729 (2009).

280. Leonardo, E. D. *et al.* Guidance of developing axons by netrin-1 and its receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62,** 467–78 (1997).

281. Takemoto, M. *et al.* Laminar and areal expression of unc5d and its role in cortical cell survival. *Cereb. Cortex* **21,** 1925–34 (2011).

282. Lu, X. *et al.* The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* **432,** 179–86 (2004).

283. Buddingh, E. P. *et al.* Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin. Cancer Res. An Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17,** 2110–2119 (2011).

284. Mehlen, P. *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395,** 801–4 (1998).

285. Serafini, T. *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87,** 1001–14 (1996).

286. Masuda, T. *et al.* Netrin-1 acts as a repulsive guidance cue for sensory axonal projections toward the spinal cord. *J. Neurosci.* **28,** 10380–5 (2008).

287. Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G. C. & Hinck, L. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev. Cell* **4,** 371–82 (2003).

288. Mehlen, P. & Tauszig-Delamasure, S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* **63,** 1821–1829 (2014).

289. Goldschneider, D. & Mehlen, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* **29,** 1865–1882 (2010).

290. Bernet, A. *et al.* Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* **133,** 1840–8 (2007).

291. Fazeli, A. *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dec) gene. *Nature* **386,** 796–804 (1997).

292. Llambi, F. *et al.* The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J.* **24,** 1192–201 (2005).

293. Guenebeaud, C. *et al.* The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol. Cell* **40,** 863–76 (2010).

294. Cohen, O. *et al.* DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J. Cell Biol.* **146,** 141–8 (1999).

295. Wang, R. *et al.* Autoinhibition of UNC5b Revealed by the Cytoplasmic Domain Structure of the Receptor. *Mol. Cell* **33,** 692–703 (2009).

296. Guenebeaud, C. *et al.* The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. *Mol. Cell* **40,** 863–876 (2010).

297. Delloye-Bourgeois, C. *et al.* Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* **206,** 833–47 (2009).

298. Grandin, M. *et al.* Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference. *EMBO Mol. Med.* **8,** 863–877 (2016).

299. Delloye-Bourgeois, C. *et al.* Interference With Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non–Small Cell Lung Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **101,** 237–247 (2009).

300. Castets, M. & Mehlen, P. Netrin-1 role in angiogenesis: To be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle* **9,** 1466–1471 (2010).

301. Grandin, M. *et al.* Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell* **29,** 173–185 (2016).

302. Allouche, M. *et al.* Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive 144Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int. J. Cancer* **26,** 777–782 (1980).

303. Paradisi, A. *et al.* Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol. Med.* **5,** 1821–1834 (2013).

304. Fitamant, J. *et al.* Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105,** 4850–4855 (2008).

305. Tu, T. *et al.* CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res.* **25,** 275–287 (2015).

306. Lettieri, C. K. *et al.* Progress and opportunities for immune therapeutics in osteosarcoma. *Immunotherapy* **8,** 1233–44 (2016).

307. Ranganathan, P. V., Jayakumar, C. & Ramesh, G. Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization. *AJP Ren. Physiol.* **304,** F948–F957 (2013).

308. Serra, M. *et al.* May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int. J. Oncol.* **29,** 1459–68 (2006).

309. Sun, K. *et al.* High CCL5 expression is associated with osteosarcoma metastasis and poor prognosis of patients with osteosarcoma. *Mol. Med. Rep.* (2017). doi:10.3892/mmr.2017.7458

310. Liu, J., Kong, C., Gong, D., Zhang, Z. & Zhu, Y. PKC α regulates netrin-1/UNC5B-mediated survival pathway in bladder cancer. *BMC Cancer* **14,** 93 (2014).

311. Ducimetière, F. *et al.* Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One* **6,** e20294 (2011).

312. Chen, B., Liu, Z., Zhang, J., Wang, H. & Yu, B. RNA sequencing identifies gene expression profile changes associated with β-estradiol treatment in U2OS osteosarcoma cells. *Onco. Targets. Ther.* **Volume 10,** 3421–3427 (2017).

313. Gibert, B. & Mehlen, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Res.* **75,** 5171–5175 (2015).

314. Ozmadenci, D. *et al.* Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat. Commun.* **6,** 7398 (2015).

315. Krimpenfort, P. *et al.* Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours. *Nature* **482,** 538–541 (2012).

316. Dutour, A. *et al.* Non-invasive imaging correlates with histological and molecular characteristics of an osteosarcoma model: application for early detection and follow-up of MDR phenotype. *Anticancer Res.* **27,** 4171–8

317. Broutier, L. *et al.* Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol. Med.* **8,** 96–104 (2016).

318. Brounais, B. *et al.* Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin. Cancer Res.* **14,** 5400–9 (2008).

319. Hoving, S., van Tiel, S. T., Eggermont, A. M. M. & ten Hagen, T. L. M. Effect of low-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with STEALTH liposomal cisplatin (SPI-077) on soft-tissue- and osteosarcoma-bearing rats. *Anticancer Res.* **25,** 743–50

320. Hoving, S., Seynhaeve, A. L. B., van Tiel, S. T., Eggermont, A. M. M. & ten Hagen, T. L. M. Addition of low-dose tumor necrosis factor-alpha to systemic treatment with STEALTH liposomal doxorubicin (Doxil) improved anti-tumor activity in osteosarcoma-bearing rats. *Anticancer. Drugs* **16,** 667–74 (2005).

321. Wong, P. K. K., Campbell, I. K., Egan, P. J., Ernst, M. & Wicks, I. P. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum.* **48,** 1177–1189 (2003).

322. Fabbro, D. *et al.* PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer. Drug Des.* **15,** 17–28 (2000).

323. Perez, J. *et al.* Inhibition of Chondrosarcoma Growth by mTOR Inhibitor in an In Vivo Syngeneic Rat Model. *PLoS One* **7,** e32458 (2012).

324. Fitamant, J. *et al.* Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 4850–4855 (2008).

325. Han, P. *et al.* Netrin-1 promotes cell migration and invasion by down-regulation of BVES expression in human hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **5,** 1396–1409 (2015).

326. Kaufmann, S., Kuphal, S., Schubert, T. & Bosserhoff, A. K. Functional implication of Netrin expression in malignant melanoma. *Cell. Oncol.* **31,** 415–22 (2009).

327. Yan, W. *et al.* Netrin-1 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness. *Dig. Dis. Sci.* **59,** 1213–21 (2014).

328. Yang, J. & Zhang, W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **25,** 398–406 (2013).

329. Fleuren, E. D. G. *et al.* Temsirolimus combined with cisplatin or bevacizumab is active in osteosarcoma models. *Int. J. Cancer* **135,** 2770–2782 (2014).

330. Ranganathan, P. V., Jayakumar, C. & Ramesh, G. Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization. *AJP Ren. Physiol.* **304,** F948–F957 (2013).

331. Gomez-Brouchet, A. *et al.* CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies fromthe French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **6,** e1331193 (2017).

332. Lussier, D. M., Johnson, J. L., Hingorani, P. & Blattman, J. N. Combination immunotherapy with α-CTLA-4 and α-PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma. *J. Immunother. Cancer* **3,** 21 (2015).

333. Buddingh, E. P. *et al.* Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL-15-activated allogeneic and autologous NK cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **60,** 575–586 (2011).

334. Kurzman, I. D. *et al.* Adjuvant therapy for osteosarcoma in dogs: results of randomized clinical trials using combined liposome-encapsulated muramyl tripeptide and cisplatin. *Clin. Cancer Res. An Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1,** 1595–1601 (1995).

335. Tadagavadi, R. K., Wang, W. & Ramesh, G. Netrin-1 Regulates Th1/Th2/Th17 Cytokine Production and Inflammation through UNC5B Receptor and Protects Kidney against Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Immunol.* **185,** 3750–3758 (2010).

336. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* **115,** 1531–1543 (2009).

337. Piperno-Neumann, S. *et al.* Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **17,** 1070–1080 (2016).

338. Duchman, K. R., Gao, Y. & Miller, B. J. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* **39,** 593–599 (2015).

339. Chen, X. *et al.* Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Rep.* **7,** 104 (2014).

340. Fouladi, M. *et al.* Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25,** 4806–4812 (2007).

341. Vail, D. M. *et al.* STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **50,** 131–

136 (2002).

342. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* **6,** 449–458 (2006).

343. Mehlen, P. & Bredesen, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci. Signal.* **4,** mr2 (2011).

344. Alcántara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E. & Sotelo, C. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127,** 1359–1372 (2000).

345. Ko, S. Y., Blatch, G. L. & Dass, C. R. Netrin-1 as a potential target for metastatic cancer: focus on colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **33,** 101–113 (2014).

346. Dass, C. R. & Choong, P. F. M. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol. Cancer Ther.* **6,** 3263–3270 (2007).

347. Rodrigues, S., De Wever, O., Bruyneel, E., Rooney, R. J. & Gespach, C. Opposing roles of netrin-1 and the dependence receptor DCC in cancer cell invasion, tumor growth and metastasis. *Oncogene* **26,** 5615–5625 (2007).