

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Geoffroy DANIEAU

« Implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 14 novembre 2019

Unité de recherche : UMR1238, PhyOS, Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés

Rapporteurs avant soutenance :

Annie SCHMID-ALLIANA, DR, Université de Côte d'Azur, INSERM Institut de Biologie de Valrose
Olivier PEYRUCHAUD, DR, Faculté de Médecine Lyon Est, INSERM UMR1033 LysBone

Composition du Jury :

Président : Olivier PEYRUCHAUD, DR, Faculté de Médecine Lyon Est, INSERM UMR1033 LysBone

Examineurs :

Dominique MODROWSKI, CR, Hôpital Lariboisière, INSERM U 1132 Bioscar
François LAMOUREUX, CR, Université de Nantes, INSERM UMR1238 PhyOS

Directeur de thèse :

Françoise REDINI, DR, Université de Nantes, INSERM UMR1238 PhyOS

Co-encadrant de thèse :

Bénédicte BROUNAIS-LE ROYER, MCU, Université de Nantes, INSERM UMR1238 PhyOS

Invitée

Livia GARZIA, Professeure Adjointe, Université de McGill, Montréal, RI-MUHC

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier du
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Au sein du Laboratoire
Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés – Phy-OS
Unité INSERM UMR1238

Faculté de Médecine, Université de Nantes
1 Rue Gaston Veil
44 000 Nantes

Au sein de l'équipe 1
Microenvironnement des tumeurs osseuses primitives :
Signalisation et ciblage thérapeutique



Et le soutien financier des institutions et des associations de patients



Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse : les docteurs **Olivier PEYRUCHAUD** et **Annie SCHMID-ALLIANA** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux de thèse, ainsi que les docteurs **Dominique MODROWSKI** et **François LAMOUREUX** qui m'ont apporté leur expertise lors des comités de suivi de thèse et qui ont accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je souhaite remercier la docteur **Livia GARZIA** pour avoir accepté l'invitation à ma soutenance de thèse. C'est un honneur de vous compter parmi mon jury de thèse.

Je souhaite remercier les docteurs **Françoise RÉDINI** et **Bénédicte BROUNAIS-LE ROYER** pour m'avoir encadré pendant ces trois années de thèse.

Bénédicte, je me souviens avec émotion de notre premier entretien dans la salle de TP à la faculté des sciences, où tu m'as montré des graphes de qPCR avec le screening de la voie Wnt. Je n'ai pas tout compris à ces noms barbares de gènes, que j'aime entendre ou lire à présent. Cette évolution, c'est grâce à la chance que tu m'as donné d'intégrer tes projets de recherche. Je n'oublie pas que tu es la première à m'avoir donné cette opportunité, merci. Je n'oublie pas non plus la formation complète que tu m'as prodiguée, toujours bienveillante et attentive dans mes premières heures tremblantes de culture cellulaire. Merci de m'avoir soutenu tout au long de ces nombreuses heures de rédaction (M1, M2, thèse, article), avec parfois des rédactions de nuit... C'est ce qui m'a permis de poursuivre en thèse dans ce laboratoire que j'apprécie tant, et de pouvoir la mener à son terme. Merci pour les répétitions avant les oraux, tu es toujours de bons conseils dans le discours et sur la forme des diapositives. Merci de m'avoir intégré à l'équipe d'enseignement de Biochimie, ce fut une expérience fabuleuse grâce à toi. Le voyage scientifique d'un étudiant est toujours ponctué de moments difficiles et de moments d'euphorie. J'ai toujours pu compter sur toi pour m'aider à me relever dans les moments compliqués, et pour m'élever encore plus haut dans les moments de réussite ! Je pourrai continuer, mais cela ferait mauvais genre si mes remerciements finissaient par être plus long que mon introduction ! Alors du fond du cœur, merci.

Françoise, merci pour votre indéfectible soutien. Votre porte m'a toujours été ouverte, malgré votre emploi du temps surchargé. Vous avez toujours su trouver du temps pour m'écouter et m'encourager. Nos discussions m'ont toujours renforcé et réconforté dans les moments de doutes. Vos qualités humaines sont exceptionnelles. C'est pourquoi lorsque je suis venu vers vous en août 2018, pour discuter de mon avenir, et de mes envies de post-doctorat, vous avez immédiatement réagi, et tout de suite eu l'idée d'une équipe de recherche formidable à Montréal. Ce n'était peut-être pas grand-chose pour vous, mais pour moi ce fut une marque de confiance énorme. Je suis très conscient de l'opportunité que vous m'avez offerte, et j'espère vous rendre fière de ce choix. Merci pour votre confiance.

Franck, merci beaucoup pour tous tes conseils sur les voies de signalisation cellulaire et pour l'opportunité que tu m'as donné de travailler avec toi sur tes projets de recherche. Tu m'as énormément apporté scientifiquement. Et en plus, tu es toujours partant pour les pizzas surtout pour tenir jusqu'à 22h en manip !

Merci **Fred** (L) pour tous tes conseils avisés sur la minéralisation. Merci de m'avoir associé à tes projets de recherche, ce fut un plaisir de collaborer avec toi. Je n'ai pas oublié ton soutien moral et scientifique lorsqu'un article a été publié sur mon projet de recherche, mais par une autre équipe...

Régis le couteau suisse (au plutôt vendéen) du laboratoire ! Merci. Tu es un homme formidable, le sauveur de nos nombreuses, très nombreuses, trop nombreuses petites questions ! Ce fut un plaisir de faire le ménage à tes côtés dans la salle 122, par chance nous avons chacun des spécialités différentes. Ton soutien m'a aidé à surmonter de nombreuses épreuves. Merci de m'avoir aidé pour les expériences en fin de thèse, ça compte beaucoup pour moi. Ton humour va me manquer...

Merci **Kevin**, tu as changé de laboratoire trop rapidement à mon goût, mais nous avons eu le temps d'échanger et de partager. Nous aurons au moins eu le temps de faire un foot dans les couloirs !

Sarah (R) et **Julien**, je suis très heureux de vous connaître. Merci Sarah pour ta joie de vivre quotidienne, ça file la pêche à tout le monde ! Je n'ai pas oublié ton aide et expertise très précieuses pour la coupe en histologie ! A bientôt.

Merci **Steven** d'avoir partagé ton expérience avec moi. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés en 122, bien que nous ayons le même PSM fétiche... Je te souhaite le meilleur, tes futurs élèves seront chanceux !

Merci **Isabelle**, ce fut un plaisir de te rencontrer et de discuter de l'angiogenèse tumoral depuis ton arrivée au laboratoire. J'ai énormément appris à ton contact.

Merci **François** pour tes conseils avisés lors de mes comités de suivi de thèse. Ce fut un plaisir et une chance de pouvoir évoluer quelques années dans le même laboratoire que toi. Merci.

Merci **Benjamin** et **Marc** pour vos questions et vos remarques lors de mes réunions du jeudi, elles furent toujours pertinentes et d'une grande aide dans ma réflexion. Merci pour vos sourires et votre bonne humeur !

Merci à **Dominique** et à **Marie** pour l'accès au xCELLigence, j'adore cet appareil !

Merci **Jérôme**, pour tes conseils en histologie, et pour tes blagues potaches ! Ton rire me fait toujours autant sourire même avec plusieurs années de pratique. Nous avons bien profité des moments partagés en salle 121, quand tu as commencé la "vraie science" selon ton expression consacrée !

Merci **Céline** pour ton sourire communicatif. Ce fut un plaisir d'avoir tes conseils en culture primaire, ainsi qu'au microscanner !

Merci **Fred** (B) pour ces discussions enrichissantes sur l'après-thèse, elles ont fait progresser ma réflexion. Merci beaucoup pour toutes tes remarques et questions lors des réunions de laboratoire. Ce fut un honneur de partager ton bureau pendant ces 3 années de thèse !

Merci à la team rhumato que j'ai eu la chance de côtoyer, **Aurélié, Christelle, Thomas, Pauline, Paul**.

Merci **Thibaut**, pour tes conseils avisés sur le déroulement d'une thèse et sur l'utilisation de certains logiciels !

Merci **Catherine**, pour ces débats sur la rigueur scientifique, l'éthique, l'assurance et le management par la qualité. Ces discussions m'ont assurément fait réfléchir et ont fait évoluer mes pratiques de sauvegarde de données, notamment. La seule expérience que j'ai réalisée à tes côtés fut un régal !

Merci **Bénédicte** (B) pour m'avoir confié ton badge à de nombreuses reprises pour que je puisse aller faire de la cytométrie en flux !

Merci **Valérie** et merci **Pierre** pour vos questions lors des réunions de laboratoire, ça fait du bien d'avoir les retours de personnes en dehors du projet.

Merci beaucoup à l'équipe dynamique et souriante de l'UTE Médecine, **Fredérique J, Amandine** et **Alexis**, ce fut très agréable de pouvoir apprendre à vous connaître lors de mes quelques passages. Je commence à oublier le goût des cannelés d'Amandine, il va falloir que je repasse par votre bureau !

Merci **Laurent** pour avoir su me dépanner dès que je cherchais des outils ou des erlenmeyers de milieu LB (non, non je t'assure que je ne les buvais pas...). Bonne route dans ta nouvelle aventure !

Merci **Luciano**, j'ai vraiment eu de la chance de faire ta connaissance en master 2. Et je crois que la biostatistique nous a rapproché ! Merci pour ta bonne humeur, et pour toutes ces bises ! Nous allons nous éloigner un peu, mais peut-être que la science nous réunira prochainement.

Merci **Jorge**, j'ai pu pratiquer un peu mon anglais avec toi (je ne parle pas un mot d'espagnol). J'aurai énormément apprécié te revoir en juillet. Je vais être obligé de débarquer en Colombie !

Merci la promo de M2, **Maryne, Adèle, Emilien, Alexandre, François-Marie**, la dream team, 100% de nouveaux thésards ! Merci d'avoir égayer encore un peu plus la vie du laboratoire au cours de vos 6 mois de stage. Félicitations pour avoir commencé vos thèses, vous le méritez !

Merci **Mathias**, j'ai dû apprendre quelques mots avec tes blagues salaces. Enfin, je crois merci...

Merci **Robel** pour tes explications en bio-informatique. Ce fut un plaisir de te rencontrer !

Merci **Paul**, tu as bien souvent réussi à me sortir de mon bureau pour aller manger ou pour aller boire un verre le soir, même si tu diras que ce n'était pas encore assez ! Je me souviendrai longtemps de nos discussions sur la macro ImageJ pour la migration. Merci pour ta collaboration !

Merci **Julien**, pour tes apparitions dans le bureau 145 du milieu. Ce fut toujours un plaisir de voir dépasser ta tête par la porte !

Merci **Sévérine** pour ta bonne humeur, et pour m'avoir formé à l'utilisation du microscanner et aux logiciels d'analyse associés !

Merci **Marie-Hélène**, pour ces voyages organisés en Angleterre, au Canada. Mais aussi à Vannes, et oui tu fais aussi la France métropolitaine !

Merci **Sandrine**, pour ton aide pour les commandes de consommable plastique. Tu vas voir la nouvelle team plastique est top ! Je n'oublie pas ta réactivité lorsque je venais avec un problème administratif à régler, toujours prête à dégainer le téléphone ! Merci aussi pour les impressions des posters, toujours au plus rapide.

Merci, pour les thésards des générations précédentes **Romain, Marie-Astrid, Benjamin, Nathalie, Camille, Pierre**, partis beaucoup trop vite, j'aurai aimé profiter un peu plus de vos expertises et de vos astuces de thésards !!!

Merci **Louise**, membre à vie du bureau 145 de milieu. Plus d'une fois tu as été capable de me redonner le sourire, merci. Tu es une femme de caractère et persévérante, tu viendras à bout de chaque épreuve ! Ne l'oublie pas.

Merci **Mélanie**, un vent de fraîcheur venu du Limousin. J'ai énormément apprécié travailler à tes côtés en 122, je suis sûre que le trio avec Régis (ne) va (pas) te manquer (du tout). Merci d'avoir été à mon écoute lorsque j'en ai eu besoin. Tu es une femme exceptionnelle ! (Bon je dis peut-être ça car tu es notre fournisseur de madeleines Bijou, qui sait !)

Merci **Sarah (M)**, je n'oublie pas notre premier congrès ensemble. Nous avons bien profité de la piscine et du petit-déjeuner malgré le stress de nos premières présentations orales. Nous avons vécu nos thèses en même temps, ce fut un plaisir de partager tous ces bons moments avec toi, notamment les organisations de repas, ou lorsque vive le beaujolais est devenu vive la raclette !

Brice, merci mon frère de bureau, nous avons vécu comme des voisins pendant 3 ans. Tu vas me manquer, j'avais l'impression de me réveiller avec toi certains matins tellement tu arrivais tôt ! J'ai beaucoup apprécié notre complicité pour allumer les PSM le matin !!! A bientôt.

Mathilde et Théo et Malo, je ne connais pas très bien Malo pour l'instant. Mais je vous connais, ce jeune homme va être chéri autant qu'il le mérite, voire même un peu plus ! J'ai eu de la chance de vous rencontrer. Merci. Nous nous reverrons.

Vous l'aurez compris, merci aux personnes de l'**unité UMR1238**. J'ai eu de la chance d'évoluer parmi vous. Merci. Merci au **Bureau 145 du milieu**, mais quel bureau ! Les braves se reconnaîtront !

Antonin, merci pour ces repas partagés malgré nos emplois du temps chargés. Je te souhaite le meilleur à New-York. Je me rapproche de ta future ville, mais dorénavant il faudra peut-être prendre un peu plus d'une heure pour manger ensemble le midi !

Mes amis, ils sont peu nombreux mais ils sont extraordinaires. **Damien, Valentin, Martin, Franck**, je pense que je vais me souvenir longtemps de ce voyage à 5 en Islande. Je suis fier de vous compter parmi mes proches. Merci de faire partie de ma vie.

A ma famille, maman, papa, petite sœur (je vous ai épargné les surnoms, c'est quand même un document officiel !), merci pour votre soutien et tout l'amour que vous me donnez.

Je vous aime.

Melody, toi qui as vécu cette thèse en coulisse. Toi qui connais mes aspirations et mes peurs mieux que personne. Toi qui me protèges depuis que nous nous sommes déclaré notre amour. Toi qui me rends meilleur. Toi auprès de qui je me sens apaisé et heureux. Je t'aime.

C'est toi...

Sommaire

Remerciements.....	3
Sommaire	9
Liste des figures.....	13
Tableaux	14
Abréviations	15
Introduction	19
1. Les ostéosarcomes : pathologies de l'os en croissance	19
1.1. Définition et épidémiologie	19
1.2. Caractérisation clinique et histologique	20
1.3. Etiologie des ostéosarcomes.....	21
1.4. Diagnostic.....	23
1.5. Prise en charge thérapeutique	24
1.6. Aspects cellulaires et moléculaires, marqueurs du cancer.....	28
1.6.1. Origine cellulaire des ostéosarcomes	28
1.6.2. Génétique complexe des ostéosarcomes.....	29
1.6.3. Dérégulations des voies de signalisation.....	31
2. Détournement du microenvironnement tumoral au profit du développement de l'ostéosarcome.....	32
2.1. Remodelage osseux physiologique.....	32
2.2. Cercle vicieux entre l'ostéosarcome et le remodelage osseux.....	33
2.3. Autres acteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans le développement des ostéosarcomes	34
3. Les essais cliniques en cours dans l'ostéosarcome	36
3.1. Le ciblage de la cellule tumorale	36
3.2. Le ciblage du microenvironnement osseux	37
3.3. Le ciblage du microenvironnement immunitaire	38
4. La voie de signalisation canonique de Wnt (Wnt/ β -caténine)	39

4.1. Description de la voie canonique de Wnt	40
4.2. La β -caténine.....	43
4.3. Régulation de la voie canonique de Wnt	45
4.3.1. Régulation de la sécrétion des ligands Wnt.....	46
4.3.2. Autres agonistes de la voie canonique de Wnt.....	46
4.3.3. Antagonistes sécrétés et intégrés à la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique.....	47
4.4. Interactions de la voie Wnt/ β -caténine avec d'autres voies de signalisation	50
4.4.1. Voie du TGF β	50
4.4.2. Voie Hippo	52
4.5. Fonctions physiologiques de la voie Wnt/ β -caténine.....	54
4.5.1. Remodelage osseux	54
4.5.2. Autres grandes fonctions physiologiques	55
4.6. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement de différents cancers	56
4.6.1. Différents types de cancers	56
4.6.2. Essais cliniques en cours.....	56
4.7. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement des ostéosarcomes	58
4.7.1. Implication controversée de la voie canonique de Wnt dans le développement des ostéosarcomes.....	58
4.7.2. Intérêt de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine pour le pronostic.....	61
4.7.3. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine et résistance aux traitements.....	62
4.7.4. Régulations épigénétiques de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes	63
4.7.5. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le microenvironnement des ostéosarcomes	64
4.7.6. Ciblage de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes	89
Objectifs.....	93

Résultats.....	97
1. Résultats Partie 1 : Effets pro-migratoires et pro-métastatiques de l'ICG-001 ...	97
1.1. Introduction.....	97
1.2. Article original.....	99
1.3. Complément de discussion	117
2. Résultats Partie 2 : Mécanismes responsables des effets pro-migratoires et pro-métastatiques de l'ICG-001	121
2.1. Introduction.....	121
2.2. Matériels et Méthodes	125
2.2.1. Culture cellulaire et réactifs.....	125
2.2.2. Génération de cellules modifiées stablement avec un shRNA	125
2.2.3. siRNA interférence.....	126
2.2.4. Gène rapporteur luciférase	126
2.2.5. RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction)	127
2.2.6. Western Blot	128
2.2.7. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	129
2.2.8. Test de prolifération cellulaire	129
2.2.9. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	129
2.2.10. Test de migration cellulaire en chambre de Boyden.....	130
2.2.11. Analyses Statistiques.....	130
2.3. Résultats.....	131
2.3.1. L'ICG-001 augmente l'expression de plusieurs gènes cibles de la β -caténine dans les cellules d'ostéosarcome	131
2.3.2. Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001	133
2.3.3. La réponse aux inhibiteurs ICG-001 et IQ-1 semble hétérogène au sein des lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome	138

2.3.4. Le ciblage de p300 ne semble pas affecter la prolifération cellulaire mais pourrait impacter la migration cellulaire induite par l'ICG-001	139
2.3.5. Le ciblage de la voie du TGF β ne semble pas affecter la migration induite par l'ICG-001 dans les cellules KHOS	142
2.4. Discussion	146
Discussion générale	153
Perspectives	161
Conclusion	164
Bibliographie	166

Liste des figures

Figure 1 : Sous-types histologiques d'ostéosarcome humain conventionnels.	21
Figure 2 : Radiographie d'un ostéosarcome.	23
Figure 3 : Protocoles de chimiothérapie utilisés en France lors de l'essai clinique OS2006.	25
Figure 4 : Cellules d'origine des ostéosarcomes.	29
Figure 5 : Schéma général du remodelage osseux.	33
Figure 6 : Cercle vicieux établi entre les cellules tumorales et les cellules responsables du remodelage osseux au cours du développement des ostéosarcomes.	34
Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/ β -caténine.	42
Figure 8 : Structure de la β -caténine et sites de liaison à des protéines partenaires.	43
Figure 9 : Localisations de la β -caténine.	45
Figure 10 : Autres agonistes de la voie Wnt/ β -caténine.	47
Figure 11 : Antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine.	49
Figure 12 : Voie de signalisation du TGF β	51
Figure 13 : Voie de signalisation Hippo/YAP.	53
Figure 14 : Hypothèses émises afin d'expliquer les effets pro-migratoires de l'ICG-001.	95
Figure 15 : Mode d'action de l'ICG-001.	97
Figure 16 : Régulation de la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire.	118
Figure 17 : Hypothèses avancées pour expliquer les effets pro-migratoires de l'ICG-001.	122
Figure 18 : Mécanisme d'action indirect de l'IQ-1.	123
Figure 19 : Action du SD-208 sur la voie de signalisation canonique du TGF β	124
Figure 20 : L'ICG-001 augmente l'expression des gènes <i>cMYC</i> , <i>VEGF-A</i> , <i>PAI-1</i> et la sécrétion de VEGF.	132
Figure 21 : Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 avec l'IQ-1 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001.	135

Figure 22 : Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 avec un shEP300 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001.	137
Figure 23 : Modifications du profil transcriptomique des cellules MG63 entre un traitement ICG-001 seul et la combinaison ICG-001/IQ-1.....	139
Figure 24 : Le ciblage de p300 ne semble pas affecter la prolifération cellulaire mais pourrait impacter la migration cellulaire induite par l'ICG-001.....	142
Figure 25 : Le ciblage de la voie du TGF β ne semble pas affecter la migration induite par l'ICG-001 dans les cellules KHOS.	145
Figure 26 : Modélisation du concept de médecine personnalisée.....	158
Figure 27 : Modèles d'évolution de la tumeur.....	160
Figure 28 : Accumulation nucléaire de P-cJUN après un traitement par l'ICG-001..	162

Tableaux

Tableau 1 : Séquences des couples d'amorces utilisés pour les qPCR.....	128
---	-----

Abréviations

ABC : ATP-binding cassette
AHSA1 : activator of 90kDa heat shock protein ATPase homolog 1
Akt : protein kinase B
ALP : alcaline phosphatase
APC : Adenomatous Polyposis Coli
APCDD1 : Adenomatosis Polyposis Coli Down-regulated 1
ARNm : ARN messenger
ATCC : American Type Culture Collection
BCA : acide bicinchoninique
BCL-9 : B cell CLL/lymphoma 9
BMPs : Bone Morphogenetic Protein
BRG1 : Brahma-related gene 1
BSA : Bovine Serum Albumin
CBP : cAMP response element-binding protein
Cer : Cerberus
CK1 α : Casein Kinase 1 α
CRM1 : chromosome region maintenance 1
CSC : cellules souches cancéreuses
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
DC : cellules dendritiques
Dkk : Dickkopf
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : dimethyl sulfoxide
Dvl : Dishevelled
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
ER : réticulum endoplasmique
Evi/Wls : Evenness/Wntless
Fzd : Frizzled
GAPDH : Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
HAT : histone acetyltransferase
HCl : acide chlorhydrique
HDACs : Histone DeAcetylases
hMSC : cellules souches mésenchymateuses humaines

HSP : heat shock protein
ICAT : inhibitor of β -catenin and TCF
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
IGF-1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP4 : Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4
IL : Interleukine
JNK : cJUN N-terminal Kinase
Krm : Kremen
LATS1/2 : large tumor suppressor 1/2
LDH : lactate déshydrogénase
LEF : Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR : Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor
lncRNAs : long non coding RNAs
LRP : Lipoprotein Receptor-related Protein
MDM2 : Murine Double Minute 2
MED12 : Mediator component 12
MESD : mesoderm development candidate 2
miRs : micro RNAs
MOI : Multiplicity Of Infection
MST1/2 : mammalian sterile 20-like kinases 1/2
mTOR : mammalian target of rapamycin
NK : Natural Killer
NKD2 : naked cuticle homolog 2
NRH1 : Neurotrophin receptor homolog 1
OPG : osteoprotegerin
Opti-MEM : Opti-Minimum Essential Medium
PAF1 : polymerase-associated factor 1
PCP : Planar Cell Polarity
PD-1 : Programmed cell Death
PDL-1 : Programmed cell Death Ligand 1
PDX : Patient-Derived Xenograft
PRIM1 : Primase DNA polypeptide 1
PTH : Parathyroid Hormone
PTHrP : parathyroid hormone related protein
PTK7 : Protein Tyrosine Kinase 7
Pygo : Pygopus
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RANK : receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL : receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RB1 : Retinoblastoma 1
ROR2 : Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
Rspo : R-spondin
RT : Reverse Transcription
Ryk : Related to Tyrosine kinase
SARA : Smad Anchor for Receptor Activation
SBE : SMADs Binding Element
SFRPs : Secreted-Frizzled-Related Proteins
shRNA : small hairpin RNA
SOST : Sclérostine
SOST-DC1 ou Wise : SOST-domain-containing 1
SVF : sérum de veau fœtal
TAMs : macrophages associés aux tumeurs
TAZ : transcriptional coactivator with PDZ-binding domain
TBE : TCF/LEF Binding Element, : TCF/LEF Binding Element
TCF : T-Cell Factor
TEAD1/4 : Transcriptional enhancer factor TEF-1/4
TGF β : Tumor Growth Factor β
TLE : Transducin-Like Enhancer of split
TLR4 : Toll-like receptor 4
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TP53 : Tumor Protein 53
VEGF-A : Vascular endothelial growth factor A
V-MYC : myelocytomatosis viral oncogene homolog
Waif1/5T4 : Wnt-activated inhibitory factor 1
WIF1 : Wnt Inhibitory Factor 1
WRE : Wnt Responsive Element
WTX : Wilms Tumor gene on the X chromosome
YAP : yes-associated protein
ZEB : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox
 β 2M : β -2-Microglobuline
 β -TrCP : β -transducin-repeat-containing protein

Introduction

Introduction

1. Les ostéosarcomes : pathologies de l'os en croissance

1.1. Définition et épidémiologie

Les ostéosarcomes appartiennent à la famille des sarcomes, tumeurs rares, complexes et hétérogènes, avec des profils histologiques très variés. Les sarcomes d'origine mésenchymateuse et les carcinomes qui se développent à partir de cellules épithéliales (sein, prostate, poumons) constituent les deux types de cancers solides. Les sarcomes sont classés en deux sous-groupes :

- Les sarcomes des tissus mous atteignent les muscles (rhabdomyosarcome, léiomyosarcome), le tissu graisseux (liposarcome), les tendons et ligaments (fibrosarcome) ou les vaisseaux sanguins (angiosarcome).

- Les sarcomes des tissus durs ou du tissu osseux se composent des ostéosarcomes, des sarcomes d'Ewing et des chondrosarcomes. Les ostéosarcomes et les sarcomes d'Ewing peuvent envahir les tissus mous. De plus, dans environ 15% des cas, les sarcomes d'Ewing se développent uniquement au niveau des tissus mous.

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes (environ 30% des sarcomes osseux) et touche essentiellement les enfants, les adolescents et les jeunes adultes avec un pic d'incidence à 18 ans. Il existe un second pic d'incidence après 60 ans, correspondant à des ostéosarcomes secondaires à une autre pathologie (Mirabello et al., 2009a). Les ostéosarcomes ont une incidence annuelle de 3 à 4 cas par million dans le monde, ce qui représente environ 150 nouveaux cas par an en France.

La pathologie est caractérisée par la formation d'os immature appelé matrice ostéoïde par les cellules tumorales, associée à des plages d'ostéolyse péri-tumorales, signes d'un intense remodelage osseux anarchique. Chez la grande majorité des patients (80%), les sites anatomiques préférentiels sont les extrémités des os longs (tibias, fémurs et humérus), principalement au niveau des zones de croissance osseuse rapide.

Dans 80% des cas, l'ostéosarcome se présente sous forme localisée au moment du diagnostic avec des taux de survie à 5 ans d'environ 75%. En revanche, pour les patients qui présentent des métastases, majoritairement pulmonaires, au diagnostic (environ 20% des patients), les taux de survie chutent à 20% à 5 ans (Marko et al., 2016; Mialou et al., 2005; Mirabello et al., 2009a, 2009b; Misaghi et al., 2018; Strauss and Whelan, 2018). Il a cependant été estimé que des micrométastases indétectables au moment du diagnostic

pouvaient être présentes dans 60 à 80% des cas, et par conséquent, être à l'origine des rechutes observées chez les patients ne présentant pas de métastases détectables au diagnostic (Bruland et al., 2005, 2009; Ottaviani and Jaffe, 2009). En effet, il est important de noter que 30 à 50% des ostéosarcomes localisés au moment du diagnostic présentent des récurrences, dont 80% avec une ou plusieurs nouvelles masses tumorales aux poumons et 8,6% au niveau de sites osseux (Bacci et al., 2005). Ces rechutes sont plus fréquentes lorsque les patients présentent des métastases au moment du diagnostic (80%).

1.2. Caractérisation clinique et histologique

Sur le plan clinique, l'ostéosarcome est caractérisé par la production par les cellules tumorales de matrice ostéoïde (également nommé "os ectopique"), moins organisée que le tissu osseux physiologique, conduisant à la formation de masses tumorales dites ostéocondensantes. La dérégulation du remodelage osseux associée à cette pathologie induit également le développement de plages d'ostéolyse péri-tumorales, qui résultent d'une activité ostéoclastique intense.

L'ostéosarcome touche, dans plus de 80% des cas la métaphyse des os longs et est principalement localisé au niveau du genou à l'extrémité inférieure du fémur (40%) ou à l'extrémité supérieure du tibia (15%), mais aussi au niveau de l'extrémité supérieure du fémur (14%), et de l'extrémité supérieure de l'humérus (10%). Ces sites correspondent aux segments osseux présentant une croissance très importante. Moins de 10% des ostéosarcomes surviennent au niveau de la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares tout comme celles des os plats ou des os courts. Cependant, des cas d'ostéosarcome ont été rapportés pour tous les os du squelette.

Les ostéosarcomes, qui constituent des tumeurs très hétérogènes, peuvent être séparés en deux groupes, en fonction de leur localisation au sein de l'os, chaque groupe intégrant différents sous-types (Misaghi et al., 2018) :

- Les ostéosarcomes intra-médullaires ou centraux de haut grade (80-90% des cas), peuvent être classés en 4 sous-types :

- Les ostéosarcomes conventionnels dont les variantes histologiques ostéoblastiques, chondroblastiques et fibroblastiques sont les plus communes (Figure1). Ils constituent les formes les plus agressives avec de nombreuses cellules en division, souvent peu différenciées et une croissance rapide de la tumeur.

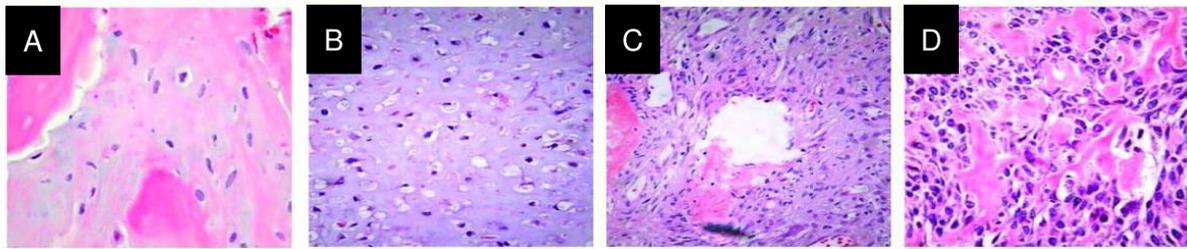


Figure 1 : Sous-types histologiques d'ostéosarcome humain conventionnels. La coloration hématoxyline-éosine montre (A) de l'os normal, et les trois sous-types d'ostéosarcome humain de haut grade les plus fréquents (B) chondroblastique, (C) ostéoblastique, (D) fibroblastique (Daft et al., 2013).

- Les ostéosarcomes télangiectasiques ne représentent que 4% des ostéosarcomes et sont également de haute malignité (Misaghi et al., 2018; Sangle and Layfield, 2012).
 - Les ostéosarcomes à petites cellules ne constituent que 1 à 2% des ostéosarcomes (Misaghi et al., 2018; Righi et al., 2015).
 - Les ostéosarcomes centraux de bas grade ne correspondent qu'à moins de 2% de ostéosarcomes et sont de meilleur pronostic que les autres sous-types précédemment décrits (Andresen et al., 2004; Misaghi et al., 2018).
- Les ostéosarcomes de surface sont majoritairement de grade intermédiaire ou de bas grade et incluent 3 sous-types (Misaghi et al., 2018) :
- L'ostéosarcome paraostéal constitue 4 à 6% des ostéosarcomes et se développe au contact de la face externe du périoste.
 - L'ostéosarcome périosté se développe au niveau de la face interne du périoste.

Ces deux sous-types sont peu agressifs avec des cellules bien différenciées et peu de divisions cellulaires.

- L'ostéosarcome de surface de haut grade est plus rare (10% des ostéosarcomes de surface) et présente une malignité comparable aux ostéosarcomes conventionnels.

1.3. Etiologie des ostéosarcomes

L'étiologie précise de la survenue des ostéosarcomes n'est pas connue. En revanche, il existe différents facteurs de risques à l'apparition des ostéosarcomes, tels que :

- L'âge : un pic d'incidence est observé au moment de la puberté qui est une période de fort remodelage osseux et de croissance osseuse (Mirabello et al., 2009a).

- La taille : les enfants atteints d'ostéosarcome sont en moyenne plus grands que le standard de la population de même sexe au même âge. De plus, les patients avec une tumeur primaire au niveau du fémur sont en moyenne plus grands que les patients avec d'autres sites primaires (Cotterill et al., 2004), ces données pouvant être mises en relation avec une croissance rapide des os.

- Le sexe : les garçons (58%) sont plus touchés que les filles (42%) et les femmes semblent développer les ostéosarcomes un peu plus tôt que les hommes, possiblement en lien avec un début de croissance plus précoce chez les femmes (Cotterill et al., 2004; Ottaviani and Jaffe, 2009).

- L'origine ethnique : des incidences plus élevées sont observées dans les populations noires, puis les populations hispaniques, par rapport aux populations caucasiennes, chez les patients de moins de 20 ans (Ottaviani and Jaffe, 2009).

Les ostéosarcomes peuvent survenir secondairement à d'autres pathologies. C'est notamment le cas de la maladie de Paget, une pathologie présentant un remodelage osseux intense affectant principalement les personnes âgées et pouvant conduire à des ostéosarcomes dans 1% des cas (Appelman-Dijkstra and Papapoulos, 2018). Des maladies génétiques rares peuvent également être à l'origine de la survenue d'ostéosarcome, tels que le syndrome de Li-Fraumeni (mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53*, Tumor Protein 53) dont 12% des patients développent des ostéosarcomes, le rétinoblastome (mutation du gène suppresseur de tumeur *RB1*, Retinoblastoma 1), l'anémie de Blackfan-Diamond (mutation de gènes codant pour des protéines ribosomiques), le syndrome de Bloom (rupture chromosomique, instabilité génétique importante), le syndrome de Werner (mutation du gène codant une hélicase RecQ), ou le syndrome de RAPADILINO (mutations du gène *RECQL4*, hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN) (Calvert et al., 2012; Gianferante et al., 2017; Kansara et al., 2014). Ces maladies rares sont souvent à l'origine de cancers (autres que des ostéosarcomes), pris en charge avec des séances de radiothérapie. La combinaison de la radiothérapie et de l'instabilité génétique des patients affectés par ces syndromes favorise la survenue d'ostéosarcome secondaire (Dray and Miller, 2008; Le Vu et al., 1998; Shimatani et al., 2019), correspondant à 3% des cas d'ostéosarcome.

1.4. Diagnostic

Les seuls signes cliniques sont des douleurs osseuses persistantes, accompagnées de l'apparition d'une masse tumorale et d'une fracture pathologique dans certains cas. La douleur osseuse constitue le premier motif de consultation des patients atteints d'ostéosarcome. Le diagnostic d'un ostéosarcome repose, d'une part, sur une radiographie (Figure 2) afin de mettre en évidence les atteintes osseuses, caractérisées par des lésions ostéocondensantes et/ou ostéolytiques, et, d'autre part, sur une analyse histologique d'une biopsie (Kundu, 2014).



Figure 2 : Radiographie d'un ostéosarcome. Ostéosarcome au niveau distal d'un fémur, avec la forme caractéristique d'une réaction périostée plurilamellaire en "feu d'herbe", à gauche. A droite, présence d'une autre réaction périostée, le triangle de Codman, traduisant une destruction de la corticale (<https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/osteosarcoma/>).

L'analyse histologique a pour but de confirmer le diagnostic et de déterminer le type et le grade de la tumeur. Le système Enneking décrit en 1980 permet la classification de la tumeur par les cliniciens en fonction de sa localisation au niveau du site osseux et de son stade de développement (Enneking et al., 1980). Différents stades de développement sont décrits : les stades de bas-grade (I), et de haut-grade (II), qui peuvent être intra- (A) ou extra-corticaux (B), ainsi que le stade métastatique (III). Ce système est souvent associé à la classification de l'*American joint committee on cancer* qui distingue les stades avec métastases pulmonaires (IV-A) de ceux avec métastases non pulmonaires (IV-B) (Kundu, 2014). En complément de ces analyses histologiques, l'analyse de marqueurs biochimiques

sériques, l'alkaline phosphatase (ALP) et la lactate déshydrogénase (LDH) peut parfois être réalisée à des fins diagnostiques et pronostiques. En effet, le niveau sérique d'ALP augmente chez les patients atteints d'ostéosarcome du fait de la forte activité des ostéoblastes, cellules produisant la matrice osseuse, et constitue un facteur de mauvais pronostic (Ren et al., 2015). De plus, un niveau d'ALP demeurant élevé après traitement peut être le signe d'une rechute ou de la présence de métastases (Bacci et al., 1993; Ren et al., 2015). Un niveau sérique important de l'enzyme LDH est également associé à des taux de survie plus faibles chez les patients atteints d'ostéosarcome (Chen et al., 2014a).

1.5. Prise en charge thérapeutique

Jusque dans les années 1970, la seule prise en charge thérapeutique des ostéosarcomes était chirurgicale, avec l'exérèse de la tumeur conduisant à un taux de survie d'environ 20% à 5 ans. Les agents de chimiothérapie ont ensuite été introduits afin de contenir la progression tumorale pour faciliter la résection chirurgicale.

Les premiers protocoles de chimiothérapie ont été mis en place par le Dr Rosen et comprenaient du méthotrexate à haute dose, du cyclophosphamide, de la bléomycine et de la vincristine en pré-opératoire ainsi qu'une chimiothérapie post-chirurgicale avec de la doxorubicine (Rosen, 1985; Rosen et al., 1979). Les taux de survie à 5 ans ont ainsi augmenté jusqu'à 70% pour les patients présentant des formes localisées de la maladie bien que les taux de survie globale 10 années après le diagnostic restent plus faibles (44%). Les taux de survie sans événement (dissémination métastatique, récurrence locale, décès) sont également plus réduits avec 53,5% à 5 ans et 41,4% à 10 ans (Cho et al., 2011). De plus, à partir d'une cohorte de patients entre 1981 et 1984, une augmentation des taux de survie à 25 ans a été observée chez les patients atteints d'un ostéosarcome de haut grade opérable traités avec une chimiothérapie néo-adjuvante (38%), comparativement à ceux ne recevant pas de chimiothérapie (15%) (Bernthal et al., 2012).

L'exérèse chirurgicale de la tumeur permet la conservation du membre dans 75 à 85% des cas, alors que ce taux n'était que de 45% en 1970 (Allison et al., 2012). La diminution du nombre d'amputations des membres est possible grâce aux progrès des techniques d'imagerie, d'exérèse, de prévention des infections et de reconstruction osseuse (Yang et al., 2018), malgré des marges de résection qui doivent être suffisamment larges pour éviter des phénomènes de récurrence de la tumeur primaire (He et al., 2016). La chirurgie conservatrice du membre a permis d'améliorer la qualité de vie des patients sans affecter leur survie globale (Ayerza et al., 2010; Li et al., 2016). Néanmoins, l'amputation du

membre touché reste parfois le dernier recours dans 10-15% des cas, lorsque la tumeur n'est pas résécable, notamment dans certains cas d'invasion neuromusculaire.

Actuellement, la prise en charge standard consiste en une polychimiothérapie néo-adjuvante, dont le protocole peut varier selon l'âge du patient, les données histologiques de la biopsie, le grade de la tumeur, mais aussi selon les pays et les centres de soins. Les molécules les plus utilisées pour la chimiothérapie néo-adjuvante dans l'ostéosarcome sont le méthotrexate à haute dose (chez l'enfant), la doxorubicine (adriamycine), le cisplatine et l'ifosfamide (Bielack et al., 2016; Liu et al., 2015b). L'association méthotrexate à haute dose, doxorubicine et cisplatine est fréquente dans de nombreux pays (Bielack et al., 2015), bien que les protocoles puissent différer afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique (Anninga et al., 2011; Wang et al., 2017a). En effet, la combinaison méthotrexate à haute dose, ifosfamide et étoposide, proposée en France a aussi prouvé son efficacité chez les jeunes patients (Gaspar et al., 2018) (Figure 3).

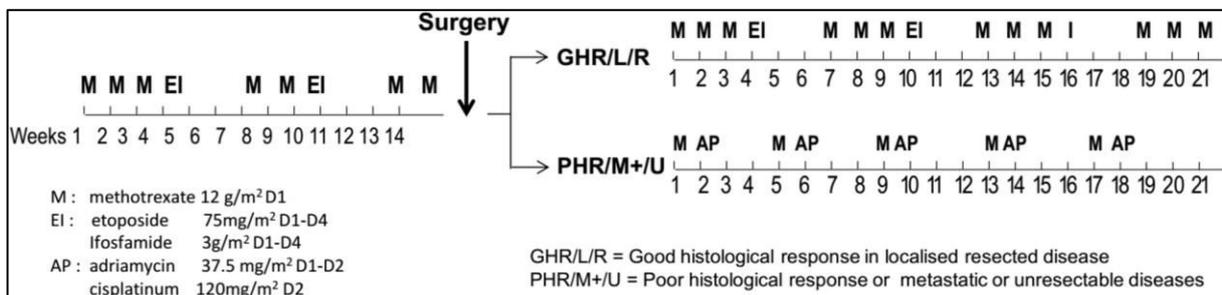


Figure 3 : Protocoles de chimiothérapie utilisés en France lors de l'essai clinique OS2006. La chimiothérapie néo-adjuvante comprend des cycles d'administration de méthotrexate à haute dose et d'étoposide/ifosfamide pendant une durée de 13 semaines. Les patients sont opérés la 14^{ème} semaine. La pièce de résection est ensuite observée, afin de déterminer le niveau de réponse des patients. Les bons répondeurs (< 10% de cellules tumorales viables et une tumeur localisée) sont traités avec les mêmes agents de chimiothérapie que lors de la 1^{ère} phase de chimiothérapie, pendant 21 semaines. Les mauvais répondeurs (> 10% de cellules tumorales viables) ou les ostéosarcomes métastatiques ont une phase de chimiothérapie adjuvante avec du méthotrexate à haute dose, de la doxorubicine (adriamycine) et de la cisplatine (Gaspar et al., 2018).

Les agents de chimiothérapie les plus utilisés ont des mécanismes d'action différents, leurs combinaisons permettent donc de cibler les cellules tumorales à plusieurs niveaux :

- Le méthotrexate inhibe la prolifération des cellules qui se divisent rapidement, via l'inhibition de la réduction de l'acide folique.

- La doxorubicine est un antibiotique cytotoxique capable d'inhiber la topo-isomérase II (régulation de la compaction de la chromatine), de s'intercaler avec les polymérase de l'ADN et de l'ARN, d'induire la formation de radicaux libres et de se fixer aux membranes, ces actions étant probablement responsables de l'effet cytotoxique.

- Le cisplatine est un antinéoplasique cytostatique se liant à l'ADN et inhibant sa synthèse, empêchant ainsi la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire.

- L'ifosfamide est métabolisé au niveau du foie en mafosfamide qui se fixe à l'ADN pour bloquer sa synthèse, inhibant ainsi la division cellulaire.

Les traitements de poly-chimiothérapie néo-adjuvante permettent de réduire la taille de la tumeur facilitant l'acte chirurgical. La résection chirurgicale de la tumeur est suivie d'une seconde phase de chimiothérapie adaptée à la réponse histologique à la chimiothérapie d'induction, observée sur la tumeur réséquée (Misaghi et al., 2018; O'Kane et al., 2015). Le score de Huvos permet de classer les patients en fonction du pourcentage de cellules tumorales viables présentes au sein de la tumeur réséquée. Ainsi, les stades I (> 50% de cellules tumorales viables) et II (11 à 50%) regroupent les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie néo-adjuvante, et les stades III (1 à 10%) et IV (0% de cellules tumorales viables) représentent les bons répondeurs (Huvos et al., 1977). Les mauvais répondeurs ont un taux de survie à 5 ans plus faible (45-55%) que les bons répondeurs à la chimiothérapie néo-adjuvante (75-80%) (Bielack et al., 2002). Les taux de bonne réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante dépendent des études et donc des traitements proposés, mais une méta-analyse de 8 études montre un taux moyen de bonne réponse proche de 50% (Zhang et al., 2018a). C'est pourquoi les protocoles de chimiothérapie peuvent être modifiés en fonction de la réponse aux traitements au cours de la prise en charge thérapeutique des patients. Les agents de chimiothérapie utilisés en seconde phase ne font pas consensus même si les bons répondeurs reçoivent majoritairement les mêmes agents de la chimiothérapie que ceux utilisés en néo-adjuvant (Bielack et al., 2015). A l'inverse, les patients mauvais répondeurs ou en rechute se voient proposer d'autres combinaisons de chimiothérapie telles que l'association doxorubicine/ifosfamide (Huang et al., 2015b), ou les combinaisons ifosfamide/étoposide (Xiao et al., 2014) ou gemcitabine/docetaxel (Rapkin et al., 2012; Zhang et al., 2018b). L'objectif de cette seconde phase de chimiothérapie est de prévenir les rechutes et l'apparition de micrométastases potentiellement produites lors de l'exérèse de la tumeur.

La combinaison des molécules de chimiothérapie augmente malheureusement les effets secondaires chez les patients, tels qu'une diminution de la production de cellules myéloïdes pouvant conduire à une anaplasie, des réactions gastro-intestinales, des mucites ou l'alopecie.

- Le méthotrexate à haute dose conduit à des réactions gastro-intestinales (nausée, vomissement) dans au moins 50% des cas, des dysfonctions hépatiques dans 80% des cas, des neutropénies dans 30% et des leucopénies dans 17% des cas démontrant un impact hématologique non négligeable (Holmboe et al., 2012; Liu et al., 2015b), ainsi que des lésions neurologiques (douleurs, perte d'équilibre, engourdissement). Ce traitement à haute dose est donc limité afin d'éviter une accumulation, parfois fatale, de molécules toxiques dans l'organisme, ou une aplasie médullaire (Zhang et al., 2016c).

- Les antibiotiques anthracycliques tels que la doxorubicine, peuvent être cardiotoxiques lors de l'utilisation à des doses élevées (> 550mg/m²) (van Dalen et al., 2016; Longhi et al., 2007).

- Le cisplatine induit des toxicités rénales et peut provoquer une perte d'audition, une diminution de la magnésémie ainsi que des neuropathies périphériques (Zhang et al., 2018b).

- L'ifosfamide est toxique pour les fonctions urinaires et peut conduire à des cystites hémorragiques, myélotoxique avec une leucopénie, mais présente aussi une toxicité rénale (Kobys et al., 2013; Zhang et al., 2018b).

La radiothérapie reste peu utilisée pour les ostéosarcomes qui sont majoritairement résistants aux radiations, (Schwarz et al., 2009), mais constitue une option majeure pour les tumeurs non résecables, permettant d'augmenter la survie globale des patients (Ciernik et al., 2011; Mohamad et al., 2018). Les agents de chimiothérapie ne peuvent pas être maintenus en complément de protocoles de radiothérapie, car les effets secondaires cumulés peuvent être dévastateurs pour le patient (Schwarz et al., 2009).

Les facteurs pronostiques majeurs restent aujourd'hui, la présence de métastases au diagnostic, les marges de résection à la chirurgie et la réponse histologique à la chimiothérapie néo-adjuvante (Bielack et al., 2002; Kager et al., 2003). Les traitements actuels présentent un certain nombre de limites incluant une efficacité insuffisante pour les patients à haut risque et avec des effets secondaires importants, des taux de survie à 5 ans faibles (proche de 20%) pour des patients présentant des métastases au moment du diagnostic et une absence d'évolution des taux de survie depuis l'avènement des protocoles de chimiothérapie (Allison et al., 2012), aussi bien pour les ostéosarcomes localisés que pour les ostéosarcomes métastatiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cette pathologie.

1.6. Aspects cellulaires et moléculaires, marqueurs du cancer

1.6.1. Origine cellulaire des ostéosarcomes

La notion de "cellule cancéreuse d'origine" fait référence à une cellule normale, qui subit une ou des mutations pour acquérir des caractéristiques de cellule cancéreuse, permettant le développement d'une tumeur initiale (Visvader, 2011). Dans le cas de l'ostéosarcome, l'hypothèse principale a longtemps considéré la cellule souche mésenchymateuse comme cellule d'origine (Mohseny et al., 2009), la cellule souche mésenchymateuse étant le précurseur cellulaire des lignées ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire (Nombela-Arrieta et al., 2011). Cependant, des études plus récentes suggèrent que la cellule souche mésenchymateuse peut devenir cancéreuse à n'importe quelle étape de son processus de différenciation (Rodriguez et al., 2012; Shimizu et al., 2010) et que par conséquent, la cellule d'origine de l'ostéosarcome correspondrait à une cellule plus ou moins engagée dans le processus de différenciation ostéoblastique (Abarrategi et al., 2016; Berman et al., 2008; Sottnik et al., 2014). De plus, les sous-types histologiques d'ostéosarcome les plus communs (ostéoblastique, chondroblastique et fibroblastique) pourraient être expliqués par les différents stades de la différenciation ostéoblastique au cours desquels les mutations apparaissent (Figure 4) (Mutsaers and Walkley, 2014). L'hétérogénéité des ostéosarcomes complexifie donc la prise en charge thérapeutique des patients, chaque type ou sous-type d'ostéosarcome pouvant présenter des sensibilités différentes aux traitements (Mutsaers and Walkley, 2014).

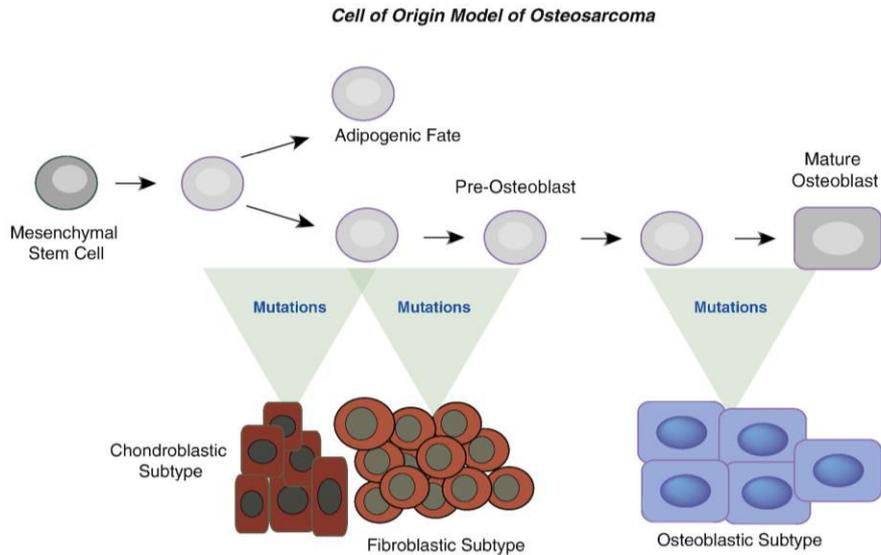


Figure 4 : Cellules d'origine des ostéosarcomes. Les cellules d'ostéosarcome ont pour origine des cellules souches mésenchymateuses, devenant cancéreuses au cours de la différenciation ostéoblastique. Les différents sous-types d'ostéosarcome pourraient correspondre aux différents moments pendant lesquels les mutations affectent les cellules (Mutsaers and Walkley, 2014).

1.6.2. Génétique complexe des ostéosarcomes

Les ostéosarcomes sont des tumeurs caractérisées par des altérations génétiques très complexes et très hétérogènes dans la grande majorité des cas, rendant difficile l'identification des mutations à l'origine du développement tumoral. Les cellules tumorales présentent une instabilité chromosomique très importante avec des amplifications, des délétions et des altérations dans le nombre de copies de certains gènes.

Des études de séquençage du génome entier (Whole-Genome Sequencing) ou des exons (Whole-Exome Sequencing) confirment la prévalence et l'importance de l'altération des gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et *RB1* dans les événements oncogéniques des ostéosarcomes. Ces modifications géniques sont retrouvées chez plus de 50% des patients atteints d'ostéosarcome (Bousquet et al., 2016; Chen et al., 2014b; Perry et al., 2014). Cependant, à l'heure actuelle, il n'a pas été possible de déterminer si les altérations de ces deux gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53* et *RB1*) sont responsables de l'instabilité à l'origine de l'oncogenèse des ostéosarcomes, ou si c'est l'instabilité génétique qui est à l'origine des altérations de *TP53* et *RB1*. Des altérations de l'oncogène *MDM2* (Murine Double Minute 2), protéine s'associant à p53 afin de diminuer son activité transcriptionnelle et de favoriser sa dégradation, sont également retrouvées dans certains cas d'ostéosarcome (Chen et al., 2014b; Kansara et al., 2014).

D'autres modifications génétiques ont pu être mises en évidence dans des cas d'ostéosarcome, parmi lesquelles des altérations des gènes *DLG2* (implication dans la division et la migration cellulaire) et *ATRX* (implication dans le remodelage de la chromatine et l'assemblage du nucléosome) (Chen et al., 2014b; Kansara et al., 2014). La revue publiée par Kansara et collègues en 2014 recense les différentes mutations retrouvées dans les ostéosarcomes, telles que la mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous polyposis coli), avec des pertes d'hétérozygotie. Des altérations de certains oncogènes sont également retrouvées, incluant une amplification de *MYC* (V-MYC myelocytomatosis viral oncogene homolog, 7-10% des cas), une amplification de *PRIM1* dans 41% des cas (Primase DNA polypeptide 1, responsable de la synthèse des fragments d'Okazaki lors de la réplication discontinue de l'ADN) et une amplification de *VEGF-A* (Vascular endothelial growth factor A, 60% des cas) pour les plus connues (Kansara et al., 2014).

Cette hétérogénéité génétique pourrait en partie être expliquée par le phénomène de chromothripsis (du grec "chromos" chromosome et "thripsis" découpé). Il s'agit d'un événement qui conduit à un chaos au niveau chromosomique, certains fragments chromosomiques étant perdus, morcelés ou amplifiés, générant ainsi l'introduction de nombreuses altérations génétiques. Ce phénomène semble impliqué dans les cancers osseux, puisque que dans une cohorte de 20 patients atteints de cancers osseux (9 ostéosarcomes et 11 chordomes de la colonne vertébrale), 3 ostéosarcomes et 2 chordomes présentaient des preuves de chromothripsis (Meyerson and Pellman, 2011; Stephens et al., 2011). De plus, les ostéosarcomes présentent des zones d'hypermutation génétique (appelée Kataegis), dans 50% des cas d'une cohorte de 32 patients (Chen et al., 2014b), et dans 83% des cas d'une cohorte de 13 patients (Perry et al., 2014), ce qui accroît la complexité génétique de ces tumeurs.

Ces altérations génétiques, nombreuses dans le cas des ostéosarcomes, sont responsables de l'acquisition de compétences de cellules cancéreuses par les cellules normales (Hanahan and Weinberg, 2011), via l'inhibition de certaines voies de régulation (exemple : voie dépendante de p53) et via l'activation d'autres voies de signalisation (exemples : voies TGF β (Tumor Growth Factor β)/SMAD3, Wnt/ β -caténine ou PI3K/Akt).

1.6.3. Dérégulations des voies de signalisation

Les voies de signalisation impliquées dans des fonctions biologiques majeures telles que la prolifération, l'apoptose ou la migration cellulaire peuvent être altérées dans les cellules d'ostéosarcome. Ainsi, la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin) est activée dans les cas d'ostéosarcome, augmentant la croissance tumorale et la résistance aux traitements (Freeman et al., 2008; Perry et al., 2014; Zhou et al., 2010). La voie de signalisation IGF-1/IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1/Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), impliquée dans la différenciation ostéoblastique, joue également un rôle primordial dans la survie, la dissémination métastatique et la chimiorésistance des cellules d'ostéosarcome (Li et al., 2019d), notamment via l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR (Wang et al., 2012). De plus, l'expression d'IGF-1 dans les tumeurs d'ostéosarcome constitue un facteur de mauvais pronostic pour les patients (Jentzsch et al., 2014). D'autres voies de signalisation ont une implication majeure dans les processus de migration et d'invasion cellulaire des ostéosarcomes. D'une part, la voie de signalisation Hippo/YAP/TAZ (yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding domain), permet aux cellules tumorales de résister à l'anoïkis et donc de survivre dans la circulation sanguine ou lymphatique (Mortus et al., 2014). De plus, YAP est impliqué dans la croissance tumorale (Chan et al., 2014), et l'expression élevée de YAP/TAZ est corrélée à un mauvais pronostic pour les patients atteints d'ostéosarcome (Bouvier et al., 2016) ainsi qu'à une augmentation de la résistance aux traitements (Wang et al., 2016). D'autre part, la voie de signalisation TGF β (Tumor Growth Factor β)/SMAD3, joue un rôle majeur dans le développement des ostéosarcomes au sein de leur microenvironnement osseux (Verrecchia and Rédini, 2018), particulièrement, en stimulant fortement la migration des cellules d'ostéosarcome et en favorisant ainsi la dissémination métastatique (Lamora et al., 2014, 2015).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est fortement impliquée dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes et fera l'objet d'une description détaillée dans la suite de cette introduction.

2. Détournement du microenvironnement tumoral au profit du développement de l'ostéosarcome

2.1. Remodelage osseux physiologique

L'os est un tissu vivant en remodelage permanent. Des phases d'apposition et de résorption osseuses se succèdent pour renouveler la matrice osseuse et assurer une résistance mécanique constante du squelette. Les ostéoblastes, cellules d'origine mésenchymateuse, sont responsables de la formation osseuse. Ces cellules produisent la matrice osseuse composée essentiellement de collagène de type I et de protéines non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine) et participent ensuite au processus de minéralisation. Une fois la phase d'apposition osseuse achevée, les ostéoblastes meurent par apoptose ou se retrouvent emmurés dans la matrice osseuse nouvellement formée où ils deviennent des ostéocytes. Les ostéocytes représentent la majorité des cellules du tissu osseux, et forment un réseau dans la matrice minéralisée. Les cellules résorbant l'os sont les ostéoclastes, cellules géantes multinucléées issues de la fusion de précurseurs hématopoïétiques (monocytes/macrophages). Ces cellules produisent de la Cathepsine K et acidifient la zone de résorption en excréant de l'acide chlorhydrique (HCl), afin de dégrader la matrice minéralisée (Figure 5) (Eastell et al., 2016; Hadjidakis and Androulakis, 2006). Le remodelage osseux est un processus finement régulé au niveau local mais également au niveau systémique avec un rôle important de la PTH (Parathyroid Hormone) qui permet le maintien de l'homéostasie calcique, le tissu osseux constituant le principal réservoir de Calcium de l'organisme. Ainsi la sécrétion continue de cette hormone majeure du remodelage osseux stimule la résorption osseuse, alors que des sécrétions intermittentes induisent la formation osseuse. Outre la PTH, d'autres hormones peuvent également participer au contrôle du remodelage osseux (calcitonine, œstrogènes, androgènes). La régulation locale est contrôlée par la triade d'acteurs : RANK/RANKL/OPG (receptor activator of nuclear factor κ B/receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin), exprimés par les acteurs cellulaires du remodelage osseux (Figure 5) (Hadjidakis and Androulakis, 2006). Le récepteur RANK est exprimé par les ostéoclastes, et son activation par le RANKL produit par les pré-ostéoblastes et les ostéocytes, induit la maturation des ostéoclastes. L'OPG est un récepteur leurre de RANKL, produit en majorité par les cellules de la lignée ostéoblastique, ce qui permet de limiter la résorption osseuse en régulant le niveau de RANKL disponible dans le microenvironnement.

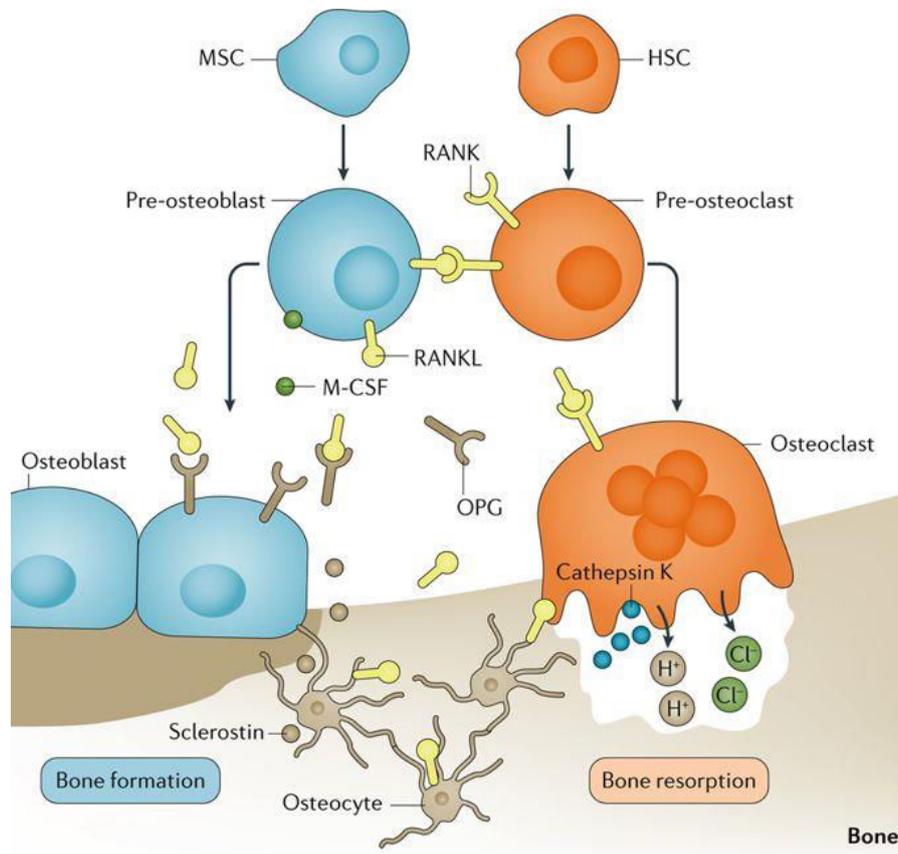


Figure 5 : Schéma général du remodelage osseux. Le tissu osseux est remodelé en permanence par les actions coordonnées et séquentielles des acteurs cellulaires du microenvironnement osseux : les ostéoblastes qui produisent la matrice osseuse, et les ostéoclastes capables de la résorber. Les ostéocytes sont les cellules les plus représentées dans le tissu osseux (> 95%) et jouent le rôle de mécano-senseurs de ce tissu, régulant les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques.

2.2. Cercle vicieux entre l'ostéosarcome et le remodelage osseux

Le microenvironnement osseux joue un rôle majeur dans le développement des ostéosarcomes. En effet, les cellules d'ostéosarcome détournent le microenvironnement tumoral afin qu'il devienne favorable à leur développement. Il apparaît en particulier une ostéolyse péri-tumorale médiée par une hyperactivité des ostéoclastes, consécutive à la sécrétion de différents facteurs pro-ostéoclastiques d'origine tumorale, tels que RANKL, l'Interleukine 6 (IL-6), l'IL-11, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) ou la PTHrP (parathyroid hormone related protein). L'action de ces différents facteurs est soit directe sur les ostéoclastes soit indirecte, et dans ce cas, passe par l'activation des ostéoblastes qui augmentent leur production de RANKL (Figure 6). La destruction de la matrice osseuse permet alors la libération de facteurs pro-tumoraux (TGF β , BMPs, Wnts), qui vont stimuler la croissance de la tumeur. Il s'établit donc un cercle vicieux entre la résorption osseuse impliquant les ostéoblastes et les ostéoclastes et la prolifération des cellules tumorales, permettant un développement rapide de la tumeur (Lamoureux et al., 2007; Verrecchia and Rédini, 2018).

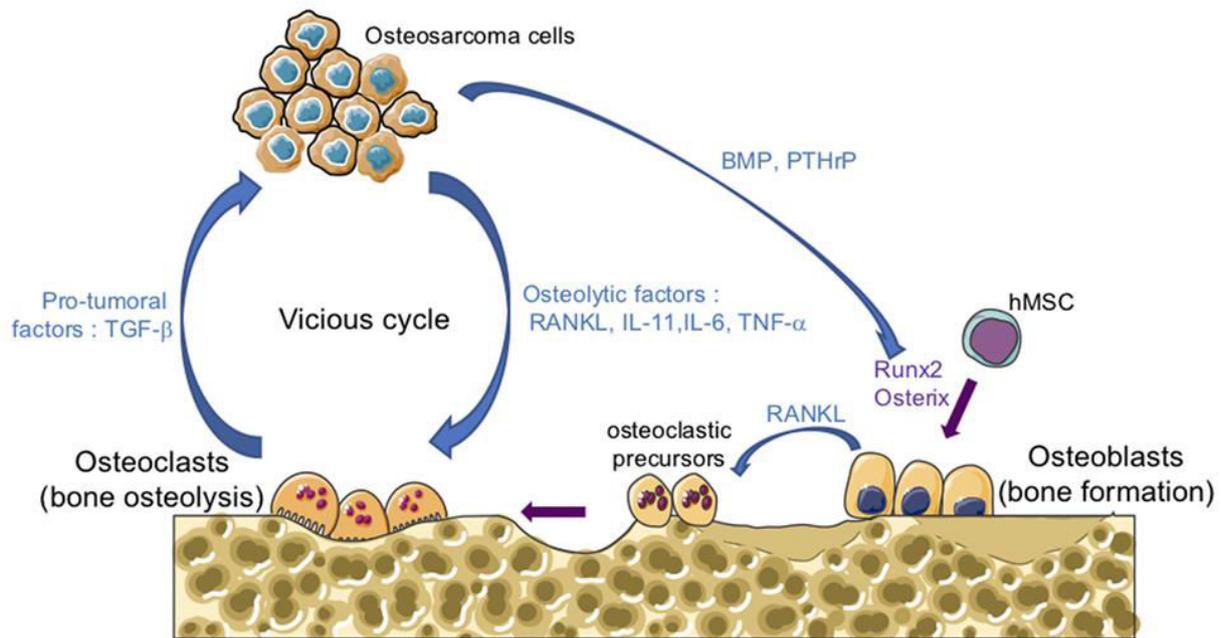


Figure 6 : Cercle vicieux établi entre les cellules tumorales et les cellules responsables du remodelage osseux au cours du développement des ostéosarcomes. Les cellules d'ostéosarcome sécrètent des facteurs favorisant l'ostéolyse (ex : RANKL), ainsi que des facteurs augmentant la production de RANKL par les ostéoblastes (ex : BMP). Lors de la dégradation osseuse, des facteurs de croissance (ex : TGF β) sont relargués dans le microenvironnement tumoral, et stimulent le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes (Verrecchia and Rédini, 2018). BMPs : Bone Morphogenetic Protein ; hMSC : cellules souches mésenchymateuses humaines ; IL : Interleukine ; PTHrP : parathyroid hormone related protein ; RANKL : receptor activator of nuclear factor κ B ligand ; TGF β : Tumor Growth Factor β ; TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

2.3. Autres acteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans le développement des ostéosarcomes

Le microenvironnement des sarcomes osseux comprend une composante immunitaire très importante et hétérogène, puisqu'elle est composée d'effecteurs de l'immunité innée tels que les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques (DC) ou les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), ainsi que de cellules T cytotoxiques responsables de l'immunité adaptative (Heymann et al., 2019). Les cellules d'ostéosarcome sont capables de moduler le recrutement, la prolifération et la différenciation de ces cellules immunitaires afin de permettre la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, plus favorable au développement de la tumeur (Heymann et al., 2019).

Concernant l'immunité innée, l'infiltrat macrophagique semble jouer un rôle prépondérant dans le développement des ostéosarcomes, bien que leur implication précise reste discutée. Les macrophages associés à la tumeur (TAMs) peuvent être classés en deux

types : M1 et M2. Les macrophages M1 ont des propriétés anti-tumorales, alors que le rôle des macrophages de type M2, décrits comme pro-tumoraux dans de nombreux cancers (Poh and Ernst, 2018), semble être plus complexe dans la progression des ostéosarcomes. En effet, certaines études ont décrit les macrophages de type M2 comme étant de mauvais pronostic et associés au développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes (Zhou et al., 2017). Cependant, une étude récente, réalisée sur la cohorte de patients OS2006, a mis en évidence que les macrophages de type M2 sont nécessaires pour inhiber la progression tumorale (Gomez-Brouchet et al., 2017). Le rôle des macrophages de type M2 n'est donc pas clairement défini dans l'ostéosarcome, car il reste compliqué d'identifier les différents sous-types de TAMs dans la tumeur, les marqueurs caractéristiques de chaque sous-type n'étant pas clairement établis. De plus, bien que les TAMs soient actuellement divisés en deux sous-types M1 et M2, cette population de cellules immunitaires regroupe en réalité de nombreux macrophages partageant des caractéristiques des deux sous-types (Qian, cell 2010).

Les cellules dendritiques présentes au sein de la tumeur peuvent être activées par différents médiateurs tels que les ligands Wnt et sécréter des cytokines anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase 1). Il en résulte une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs et une diminution de la toxicité des lymphocytes T cytotoxiques (Galluzzi et al., 2019). Les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné capables de reconnaître des cellules non saines (ex : cellules cancéreuses, cellules en stress) directement grâce à leurs récepteurs membranaires et d'induire la mort de ces cellules. Il a été rapporté que le nombre de cellules NK circulantes est plus faible chez des patients atteints d'ostéosarcome, comparativement à des personnes non malades (Tarek and Lee, 2014).

Les lymphocytes T, médiateurs de l'immunité adaptative, sont également présents (10% des cellules immunitaires (Gomez-Brouchet et al., 2017)) dans le microenvironnement des ostéosarcomes, mais leurs activités sont modulées par les cellules tumorales. En effet, celles-ci expriment, à leur surface, des protéines de la famille B7, notamment PDL-1 (Programmed cell Death Ligand 1), capables de réduire l'activité des lymphocytes T infiltrant la tumeur (Koirala et al., 2016). La liaison de PDL-1, exprimé par les cellules tumorales, sur les lymphocytes T inhibe leurs activités cytotoxiques et contribue donc au développement d'un microenvironnement immunosuppresseur au contact de la tumeur.

3. Les essais cliniques en cours dans l'ostéosarcome

Les taux de mortalité et de morbidité demeurent élevés pour les patients atteints d'ostéosarcome métastatique ou récidivant et aucune amélioration des taux de survie n'a pu être obtenue depuis la mise en place des stratégies de polychimiothérapie dans les années 1970. De plus, les agents de chimiothérapie classiques montrent leurs limites puisqu'ils ne permettent pas, à l'heure actuelle, de contrôler la dissémination métastatique chez les mauvais répondeurs (Allison et al., 2012; Zhang et al., 2018b). Seule une augmentation des doses de chimiothérapie pourrait avoir un effet bénéfique sur les rechutes locales, mais sans affecter la survie globale et avec une toxicité accrue générant de nombreux effets indésirables chez les patients (Zhang et al., 2018a). C'est pourquoi des essais cliniques sont toujours menés pour essayer de répondre aux problématiques posées par cette pathologie, que sont les rechutes, la dissémination métastatique, les résistances aux chimiothérapies ayant pour conséquence une absence d'amélioration du taux de survie à 5 ans pour les ostéosarcomes localisés (70%) et métastatiques (20%) (Bishop et al., 2016; Heymann et al., 2016; Kansara et al., 2014). Ces essais cliniques évaluent l'activité de molécules ciblant soit directement les cellules tumorales, soit les cellules du microenvironnement tumoral osseux et immunitaire.

3.1. Le ciblage de la cellule tumorale

Le ciblage des cellules tumorales est au cœur de nouvelles stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation clinique. Dans ce contexte, plusieurs essais évaluent le bénéfice de molécules inhibitrices de l'activité Tyrosine kinase, qui joue un rôle majeur dans les processus de signalisation intracellulaire (ex : récepteurs IGF-1R, VEGF-R). Par exemple, l'essai clinique français de phase II REGOBONE (NCT02389244) a étudié l'effet du Regorafenib, un nouvel inhibiteur de plusieurs kinases impliquées dans le développement tumoral, chez des patients atteints d'ostéosarcome agressif, progressant malgré les traitements conventionnels ou présentant des métastases. Les résultats ont mis en évidence que 65% (17/26) du groupe de patients traités avec le Regorafenib ne montraient pas de signe de progression après 8 semaines de traitement et une médiane de temps sans progression tumorale de 4 mois, alors que la pathologie avait progressé chez tous les patients du groupe contrôle. De plus, les patients qui ont été transférés du groupe contrôle au groupe incluant le traitement au Regorafenib ont vu la progression de la maladie diminuer (Duffaud et al., 2019). Un essai clinique de phase II multicentrique américain SARC024 (NCT02048371) semble aboutir aux mêmes conclusions, bien que les résultats définitifs ne soient pas disponibles avant août 2020. En effet, la médiane du temps sans progression de

la maladie des patients atteints d'ostéosarcome métastatique ou très agressif, est de 3,6 mois avec le Regorafenib, comparés à 1,7 mois dans le groupe placebo (Davis et al., 2019a). Ainsi, le Regorafenib semble être un traitement d'intérêt pour les ostéosarcomes ne répondant pas aux thérapies conventionnelles.

D'autres types de ciblage peuvent être envisagés. Ainsi, un essai clinique de phase II (NCT02429973) a évalué la combinaison d'un agent de chimiothérapie, la gemcitabine, avec de la rapamycine (ou sirolimus) un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR, chez des patients atteints d'ostéosarcome en rechute et avec des métastases non résécables. Cet essai clinique réalisé sur 33 patients a permis de montrer une bonne efficacité de ce protocole de traitement, avec une absence de progression de la maladie pendant 4 mois pour 44% des patients (seuil 40%). De plus, les effets secondaires de cette combinaison sont faibles, comparativement à un protocole gemcitabine/docetaxel qui présente la même efficacité (Martin-Broto et al., 2017). Le ciblage du disialoganglioside GD2 ou de différents récepteurs kinases impliqués dans la progression tumorale fait également l'objet d'essais cliniques en cours dans les ostéosarcomes (Bishop et al., 2016; Heymann et al., 2016; Kansara et al., 2014).

3.2. Le ciblage du microenvironnement osseux

L'essai clinique français OS2006 (NCT00470223) a permis d'évaluer l'association d'une polychimiothérapie conventionnelle (haute dose méthotrexate/ifosfamide/étoposide pour les plus jeunes patients ou doxorubicine/cisplatine/ifosfamide pour les adultes) à un biphosphonate (le Zoledronate), qui est un inhibiteur de la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes. En effet, des données précliniques ont montré des effets bénéfiques de cette molécule et de son association avec la chimiothérapie tant sur le développement de la tumeur primaire que sur l'apparition de métastases pulmonaires (Heymann et al., 2005; Ory et al., 2005). Trois cent dix-huit patients ont été randomisés dans cet essai multicentrique de phase III, mais l'essai a été arrêté car l'association chimiothérapie/Zoledronate ne montrait pas de bénéfice supérieur pour les patients, en comparaison du traitement standard (Figure 3) (Piperno-Neumann et al., 2016). Ces résultats ont été confirmés par un autre essai clinique sur 798 patients, en Chine (Li et al., 2019c). Ce dernier déconseille l'utilisation du Zoledronate associé aux agents de chimiothérapie, en raison d'une augmentation du nombre d'événements (métastatiques) et d'une réduction de la survie globale. Ces essais cliniques mettent donc en évidence la difficulté de transposer les résultats précliniques à la clinique humaine et nécessitent de nouvelles investigations afin de mieux comprendre l'effet délétère du Zoledronate chez les patients.

L'essai clinique de phase II NCT02470091, pour les patients atteints d'ostéosarcome métastatique, en rechute ou ne répondant pas aux traitements conventionnels, teste l'efficacité du Denosumab, un anticorps monoclonal anti-RANKL. Les résultats de cette étude sont prévus pour fin 2019, avec environ 90 patients randomisés. Les objectifs principaux sont d'une part d'évaluer les effets secondaires associés à l'administration de Denosumab et d'autre part, de suivre la progression tumorale afin de déterminer l'efficacité du traitement.

3.3. Le ciblage du microenvironnement immunitaire

L'essai clinique SARCOME13/OS2016 (NCT03643133) est un essai français multicentrique de phase II évaluant la combinaison d'une chimiothérapie adjuvante et du Mifamurtide chez des patients atteints d'ostéosarcome de haut grade à risque élevé de rechute (métastases au diagnostic, mauvais répondeurs à la chimiothérapie néo-adjuvante). Le Mifamurtide est une molécule synthétique se liant au récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) et activant les monocytes et les macrophages, dans l'objectif de stimuler leur activité anti-tumorale, via la sécrétion de cytokines inflammatoires, puis le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques. L'essai, actuellement dans sa phase de recrutement, a pour objectif de comparer le taux de survie globale et le taux de survie sans maladie (rechute locale, métastases, autre pathologie cancéreuse, décès) à 3 ans, sur une cohorte incluant au moins 126 patients (Brard et al., 2019). A court terme, les effets secondaires seront observés, et à plus long terme, les taux de survie à 10 ans seront également évalués.

L'essai clinique de phase II SARC028 (NCT02301039) cherche à déterminer l'efficacité et l'innocuité du Pembrolizumab (MK3475), un anticorps ciblant le récepteur PD-1 (Programmed cell Death) exprimé par les lymphocytes T, chez des patients atteints de sarcomes des tissus mous ou du tissu osseux avancés. Les objectifs sont d'analyser d'une part, l'efficacité du traitement et d'autre part, les effets secondaires. Les premiers résultats sont peu encourageants pour les ostéosarcomes puisque seul un patient (1/22) présente une réduction de plus de 30% de la lésion tumorale observée (Tawbi et al., 2017). L'essai clinique français de phase II PEMBROSARC (NCT02406781) confirme que l'inhibition de PD-1 ne semble pas efficace pour les patients atteints d'ostéosarcome (Le Cesne et al., 2019).

Ces différents essais cliniques sont des exemples représentatifs des 474 essais cliniques (tous statuts confondus) réalisés chez des patients atteints d'ostéosarcome, recensés sur le site américain des essais cliniques internationaux (ClinicalTrials.gov). Ils mettent en évidence l'intérêt suscité par l'importance de cibler non seulement les cellules tumorales, mais aussi le microenvironnement, avec dans ces exemples, la composante ostéoclastique ainsi que les infiltrats macrophagique et lymphocytaire, car les agents de chimiothérapie montrent leurs limites d'efficacité pour les ostéosarcomes les plus agressifs. En conclusion, les essais cliniques ciblant les cellules tumorales ou leur microenvironnement ne permettent pas, à l'heure actuelle, la mise au point d'un traitement efficace pour les ostéosarcomes les plus agressifs. Il est donc nécessaire de continuer les recherches visant à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la progression des ostéosarcomes dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse dont l'objectif est d'étudier l'implication de la voie canonique de Wnt dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes afin de définir de potentielles cibles thérapeutiques.

4. La voie de signalisation canonique de Wnt (Wnt/ β -caténine)

Les voies de signalisation Wnt sont très conservées au cours de l'évolution et impliquées dans une multitude de phénomènes physiologiques et pathologiques. Trois voies de signalisation ont été décrites à ce jour : la voie canonique de Wnt ou voie Wnt/ β -caténine, et les voies non canoniques Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et Wnt/ Ca^{2+} (Zhan et al., 2017). Ce travail de thèse se concentre uniquement sur la voie canonique de Wnt, qui joue un rôle primordial au cours du développement et est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires, tels que la prolifération, la migration, la polarisation et la différenciation cellulaire. Cette voie de signalisation est finement régulée et des mutations des acteurs de la voie Wnt/ β -caténine ou des dérégulations de cette voie peuvent être à l'origine du développement de cancers, de leurs résistances au traitement, ou des phénomènes de rechute (Duchartre et al., 2016; Polakis, 2012; Tai et al., 2015). La voie Wnt/ β -caténine peut également être impliquée dans d'autres pathologies telles que des maladies osseuses (ostéoporose) ou cardiovasculaires.

4.1. Description de la voie canonique de Wnt

Les voies de signalisation Wnt sont principalement activées par les ligands Wnt qui représentent une famille de 19 glycoprotéines sécrétées chez l'Homme. Certains ligands Wnts activent uniquement la voie canonique (Wnt1, Wnt2b, Wnt3a, Wnt6, Wnt8a et b, Wnt9a et b) alors que d'autres ligands de la même famille, tels que Wnt5a et Wnt5b, activent uniquement les voies non canoniques de Wnt. Un certain nombre de ces ligands Wnts sont également capables d'activer les voies canonique et non canoniques de Wnt (Wnt2, Wnt4, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16b). Les ligands Wnts activateurs de la voie Wnt/ β -caténine peuvent se lier à l'un des 10 récepteurs de la famille Frizzled (Fzd), ou à un co-récepteur LRP5/6 (Lipoprotein Receptor-related Protein 5 ou 6). L'activation des voies non canoniques de Wnt est induite par la liaison des ligands Wnt à d'autres co-récepteurs : ROR2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2), Ryk (Related to Tyrosine kinase), NRH1 (Neurotrophin receptor homolog 1) ou PTK7 (Protein Tyrosine Kinase 7) (Komiya and Habas, 2008).

En absence de ligands, la voie Wnt/ β -caténine est inactive, la β -caténine étant prise en charge par un complexe protéique en vue de sa dégradation. Ce complexe est composé majoritairement des protéines de structure Dishevelled (Dvl), Adenomatous Polyposis Coli (APC), AXIN1 et AXIN2 et WTX (Wilms Tumor gene on the X chromosome). Deux kinases font également partie de ce complexe de dégradation, la Casein Kinase 1 α (CK1 α) phosphorylant la β -caténine sur la Sérine 45, et la Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) responsable de la phosphorylation de la β -caténine sur les résidus Sérine 33, Sérine 37 et Thréonine 41. Les protéines YAP/TAZ recrutent alors la β -TrCP (β -transducin-repeat-containing protein), une ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitinylation de la β -caténine lorsqu'elle se trouve sous sa forme phosphorylée (Azzolin et al., 2014; Kim et al., 2013; Liu et al., 2002; Robertson et al., 2018; Stamos and Weis, 2013). La β -caténine est alors dégradée par la voie du protéasome, et ne peut plus exercer son rôle de cofacteur de transcription, avec les protéines de la famille TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor). En absence de β -caténine, l'activité transcriptionnelle des protéines TCF/LEF est réprimée par l'interaction avec les répresseurs transcriptionnels Groucho/TLE (Transducin-Like Enhancer of split), qui recrutent des Histone DeAcetylases (HDACs) (Figure 7) (Chodaparambil et al., 2014).

La voie canonique de Wnt est activée par la fixation des ligands Wnt sur les récepteurs Fzd et sur les co-récepteurs LRP5/6. Ce complexe membranaire Wnt/Fzd/LRP5/6 est complété par le recrutement de Dvl au niveau de la partie C-terminale du récepteur Fzd, pour se diriger vers une endocytose du complexe dépendante des cavéolines, nécessaire à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Yamamoto et al., 2006). LRP5/6 est alors phosphorylé par les protéines CK1 et GSK3 β , permettant le recrutement des protéines de structure AXINs, et de tout le complexe de dégradation de la β -caténine. L'activité kinase de GSK3 β est inhibée par phosphorylation conduisant à son ubiquitinylation, puis à sa dégradation par la voie du protéasome. La β -caténine néosynthétisée n'est plus dégradée et s'accumule dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau (Li et al., 2012). La β -caténine ne possède pas les séquences classiques d'adressage au noyau, mais la translocation nucléaire semble être due à un contact direct entre la β -caténine et le pore nucléaire (Jamieson et al., 2014). Dans le noyau, la β -caténine interagit avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF et avec des cofacteurs de transcription : les histones acétyltransférase p300 (histone acetyltransferase p300/HAT p300) ou CBP (cAMP response element-binding protein), BCL-9 (B cell CLL/lymphoma 9), BRG1 (Brahma-related gene 1), et Pygo (Pygopus) (Lien and Fuchs, 2014; MacDonald et al., 2009). Ces complexes de transcription sont capables d'activer la transcription de gènes cibles tels que *AXIN2*, *LEF1*, *cMYC*, *CCND1* ou *BIRC5* (Figure 7).

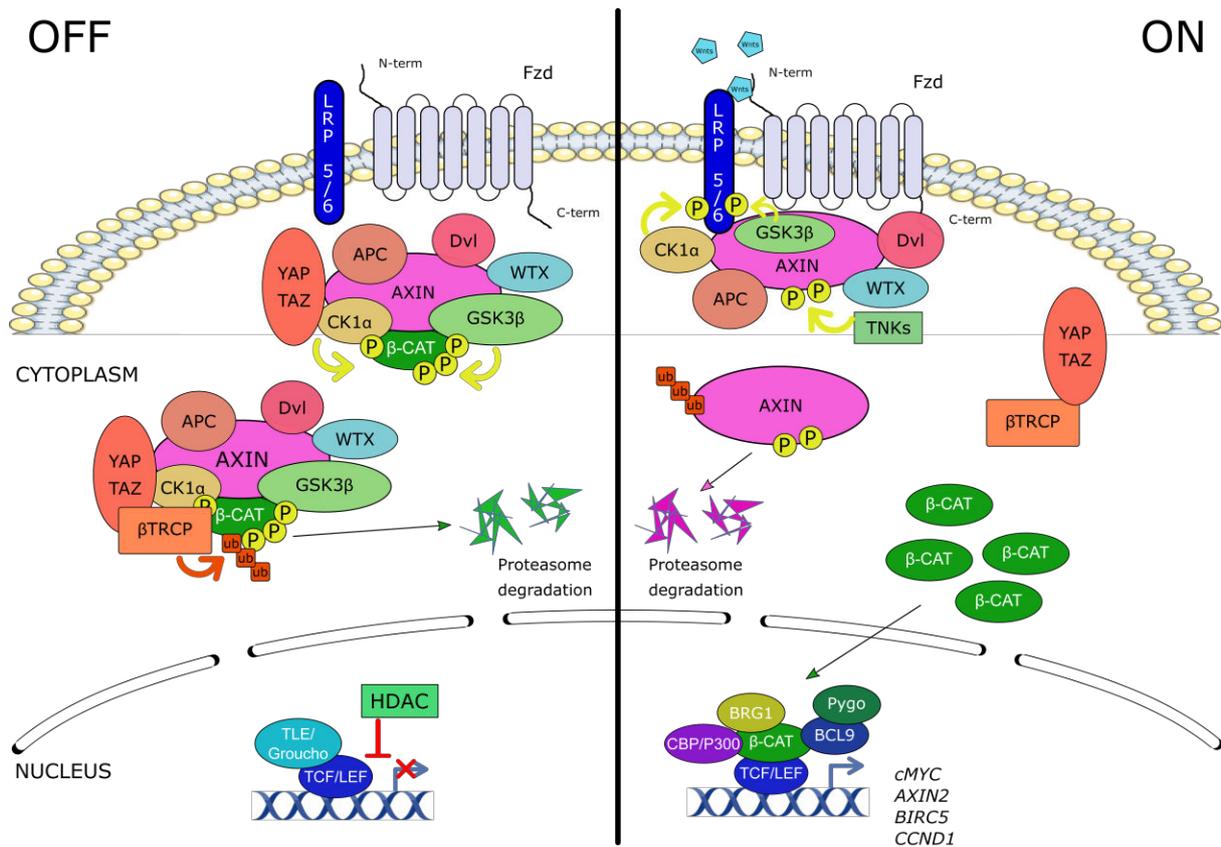


Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine. En absence d'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (partie gauche de la figure), la β-caténine est phosphorylée, ubiquitinylée puis dégradée par la voie du protéasome. La transcription dépendante des complexes de transcription β-caténine/TCF/LEF est alors réprimée par des histones désacétylases. En présence de ligands Wnt (partie droite de la figure), le complexe de dégradation de la β-caténine est séquestré à la membrane plasmique et n'est plus en mesure de phosphoryler la β-caténine. La β-caténine s'accumule dans le cytoplasme, avant d'être transloquée dans le noyau, où elle s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF pour activer la transcription de gènes cibles (Danieau et al., 2019). APC : Adenomatous Polyposis Coli ; BCL-9 : B cell CLL/lymphoma 9 ; BRG1 : Brahma-related gene 1 ; CBP : cAMP response element-binding protein ; CK1α : Casein Kinase 1α ; Dvl : Dishevelled ; Fzd : Frizzled ; GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3β ; HDAC : Histone DeAcetylase ; LEF : Lymphoid Enhancer-binding Factor ; LRP : Lipoprotein Receptor-related Protein ; Pygo : Pygopus ; TAZ : transcriptional coactivator with PDZ-binding domain ; TCF : T-Cell Factor ; TLE : Transducin-Like Enhancer of split ; WTX : Wilms Tumor gene on the X chromosome ; YAP : yes-associated protein ; β-CAT : β-caténine ; β-TrCP : β-transducin-repeat-containing protein.

4.2. La β -caténine

La protéine β -caténine (781 acides aminés), codée par le gène *CTNNB1*, est la protéine centrale de la voie de signalisation canonique de Wnt. Il s'agit d'une protéine aux multiples fonctions, du fait de sa structure comprenant de nombreux domaines de liaisons à d'autres protéines. En effet, la β -caténine comprend une région centrale composée de 12 répétitions imparfaites du motif Armadillo (R1 à R12, environ 40 acides aminés par motif) permettant la liaison à de nombreuses protéines (APC, TCF/LEF), ainsi qu'une extrémité N-terminale contenant des sites de liaison pour des protéines impliquées dans la dégradation de la β -caténine (GSK3 β , β -TrCP), et une extrémité C-terminale avec des sites de liaisons pour des protéines nécessaires au rôle transcriptionnel de la β -caténine (CBP, p300) (Figure 8) (Hurlstone and Clevers, 2002; Mosimann et al., 2009).

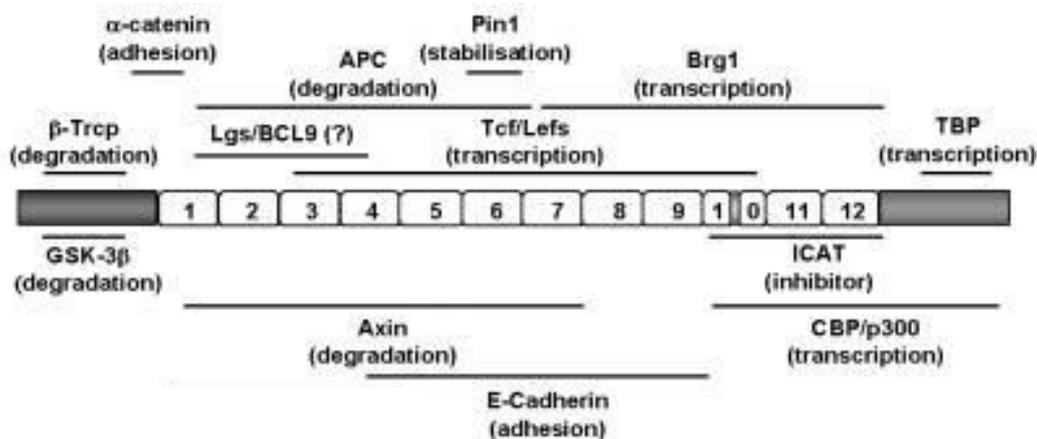


Figure 8 : Structure de la β -caténine et sites de liaison à des protéines partenaires. La partie N-terminale de la β -caténine contient le résidu Sérine 45 phosphorylé par CK1 α , et les résidus Sérine 33, 37 et Thréonine 41 phosphorylés par GSK3 β , ce qui entraîne la reconnaissance de la β -caténine par la protéine β -TrCP, en vue de son ubiquitinylation. Le domaine central de la β -caténine est composé de 12 motifs répétés non parfaitement identiques Armadillo, impliqués dans de nombreuses interactions protéiques. C'est dans cette partie de la β -caténine que peuvent se fixer les protéines APC et AXIN impliquées dans le complexe de dégradation ou dans l'export nucléaire de la β -caténine. La protéine PIN1, en modifiant la conformation d'une liaison peptidique (Sérine 246 – Proline 247) inhibe l'interaction APC/ β -caténine stabilisant la β -caténine dans le noyau. Les protéines α -caténine et E-cadhérine peuvent également interagir de façon directe avec la β -caténine. La partie centrale de la protéine est aussi le lieu de fixation de facteurs de transcription (TCF/LEF) et de cofacteurs de transcription (BRG1, BCL-9 recrutant Pygo). Les derniers motifs Armadillo sont un site de fixation pour la protéine ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF) empêchant l'interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF. La partie C-terminale contient les domaines de liaison aux cofacteurs de transcription CBP et p300, et à la protéine TATA-box impliquée dans le recrutement de l'ARN polymérase ADN dépendante de type II (Hurlstone and Clevers, 2002).

La localisation de la β -caténine est primordiale pour la fonction de la protéine. Lorsque la β -caténine est séquestrée dans le cytoplasme par le complexe de dégradation, elle finit par être dégradée par la voie du protéasome (Figure 9A).

Dans le noyau, la β -caténine participe à la formation de complexes transcriptionnels en recrutant des cofacteurs de transcription, étant donné qu'elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF, partenaires privilégiés de la β -caténine dans le noyau, se fixent sur l'ADN, au niveau de régions consensus WRE (Wnt Responsive Element) : CCTTGW (W=T/A) (Figure 9B) (MacDonald et al., 2009). La β -caténine permet alors le recrutement des protéines modifiant la structure de la chromatine (histones acétyltransférase pour acétyler les histones et ouvrir la chromatine), et du nucléosome (BRG1), puis des protéines favorisant l'interaction avec la RNA polymérase ADN dépendante de type II (Mediator component 12 MED12 ; polymerase-associated factor 1 PAF1) afin d'initier la transcription de gènes cibles. Le recrutement de ces différents acteurs se fait de manière séquentielle (Mosimann et al., 2009; Valenta et al., 2012). Les protéines APC ou AXINE peuvent exporter la β -caténine du noyau vers le cytoplasme, permettant ainsi de réguler l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, en diminuant sa disponibilité nucléaire (Figure 9C)(Henderson and Fagotto, 2002; Rosin-Arbesfeld et al., 2003).

Lorsqu'elle se trouve à la membrane plasmique, la β -caténine est impliquée dans l'adhésion cellulaire, puisqu'il s'agit d'une protéine adaptatrice entre les cadhérines et le cytosquelette (Figure 9D). Cette fonction d'adhésion de la β -caténine peut être considérée comme un régulateur négatif de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (fonction transcriptionnelle), en retenant la β -caténine à la membrane (Nelson and Nusse, 2004). En effet, bien que la fonction d'adhésion et la fonction transcriptionnelle de la β -caténine semblent indépendantes, la modification de l'un des deux compartiments affecte également l'autre, ce qui laisse penser à une connexion étroite entre ces deux fonctions (Bienz, 2005). La β -caténine et les cadhérines se lient dans le réticulum endoplasmique avant d'être adressées ensemble à la membrane cytoplasmique, les deux protéines se protégeant mutuellement de la dégradation. En effet, lorsque ces deux protéines interagissent, elles ne peuvent ni l'une, ni l'autre être dégradées par la voie du protéasome (Valenta et al., 2012).

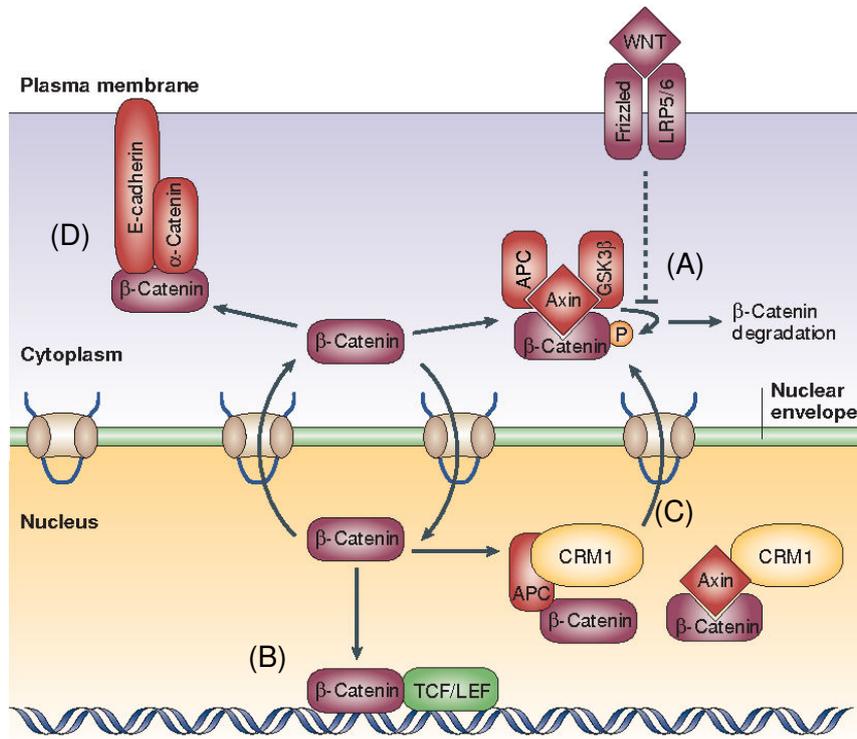


Figure 9 : Localisations de la β -caténine. En fonction de sa localisation dans la cellule, la β -caténine peut avoir différentes fonctions. **(A)** Dans le cytoplasme, la β -caténine finit par être dégradée par la voie du protéasome, après sa prise en charge par un complexe de dégradation. **(B)** Lorsque la voie canonique de Wnt est activée, la β -caténine est transloquée dans le noyau où elle s'associe avec des membres de la famille TCF/LEF (T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer-binding Factor) pour jouer son rôle de cofacteur de transcription. **(C)** Lorsque la β -caténine n'est pas fixée à un membre de la famille TCF/LEF, elle peut être prise en charge par les protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli) ou AXIN (possédant des séquences signal d'export nucléaire), et exportée via l'action de la protéine CRM1 (chromosome region maintenance 1). **(D)** La β -caténine localisée au niveau de la membrane plasmique joue le rôle d'intermédiaire entre la protéine d'adhésion E-cadhérine et le réseau de filaments d'actine du cytosquelette (Xu and Massagué, 2004). GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β ; LRP : Lipoprotein Receptor-related Protein.

4.3. Régulation de la voie canonique de Wnt

Les agonistes les plus courants de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine sont les ligands Wnt, dont la sécrétion est finement régulée. D'autres agonistes ou potentialisateurs de la voie canonique de Wnt ont également été décrits ainsi que différents antagonistes qui peuvent agir à plusieurs niveaux de la voie de signalisation.

4.3.1. Régulation de la sécrétion des ligands Wnt

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est finement régulée, tout d'abord, par la disponibilité de ces ligands qui subissent un processus complexe de maturation et de sécrétion au sein de la cellule. En effet, suite à leur synthèse, les ligands Wnt sont pris en charge par la Porcupine, une acyl-transférase du réticulum endoplasmique, permettant leur palmitoylation, indispensable à leur sécrétion (Kadowaki et al., 1996). Les ligands Wnt se lient ensuite, dans le réticulum endoplasmique, à la protéine transmembranaire Evi/Wls (Evenness/Wntless) (Bänziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006) en présence de la protéine p24 (Buechling et al., 2011), permettant le transport des ligands Wnt jusqu'à l'appareil de Golgi. Lorsque les ligands Wnt sont sécrétés, la protéine Evi/Wls est endocytée puis recyclée dans l'appareil de Golgi avant de retourner dans le réticulum endoplasmique pour prendre en charge un nouveau ligand Wnt (Coudreuse et al., 2006). Les protéines Wnt peuvent être présentées à la membrane plasmique ou sécrétées de différentes façons, notamment par sécrétion directe à partir de la membrane plasmique (Mulligan et al., 2012), ou par intégration dans des exosomes (Gross et al., 2012).

4.3.2. Autres agonistes de la voie canonique de Wnt

Outre les ligands Wnt, d'autres agonistes de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ont été décrits.

La protéine sécrétée Norrin est un ligand du récepteur Fzd4 et du co-récepteur LRP5/6, et active la voie de signalisation Wnt/ β -caténine de la même façon que les ligands Wnt (Figure 10A) (MacDonald et al., 2009).

Les protéines de la famille R-spondin (Rspo1-4) sont capables d'activer directement la voie Wnt/ β -caténine par liaison aux récepteurs Fzd et au co-récepteur LRP6 (Figure 10A). La fixation des Rspo aux récepteurs LGR4/5 (Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5) potentialise quant à elle l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induite par des ligands Wnt mais ne présente pas d'action directe en leur absence (Figure 10B). En effet, la protéine Rspo se fixe sur un récepteur LGR4/5, qui va ensuite s'associer à un complexe Wnt/Fzd/LRP pour augmenter le signal activateur de la voie Wnt/ β -caténine. Les protéines Rspo sont aussi capables de se fixer sur les récepteurs Kremen 1 et 2 (Krm), supprimant l'activité inhibitrice de Dickkopf 1 sur la voie Wnt/ β -caténine (Figure 10B) (Cruciat and Niehrs, 2013; MacDonald et al., 2009).

La protéine chaperonne MESD (mesoderm development candidate 2) se fixe sur le co-récepteur LRP5/6 dans le réticulum endoplasmique, pour permettre sa maturation et une augmentation de son expression à la membrane plasmique permettant une activation plus importante de la voie canonique de Wnt (Figure 10A) (Koduri and Blacklow, 2007; MacDonald et al., 2009).

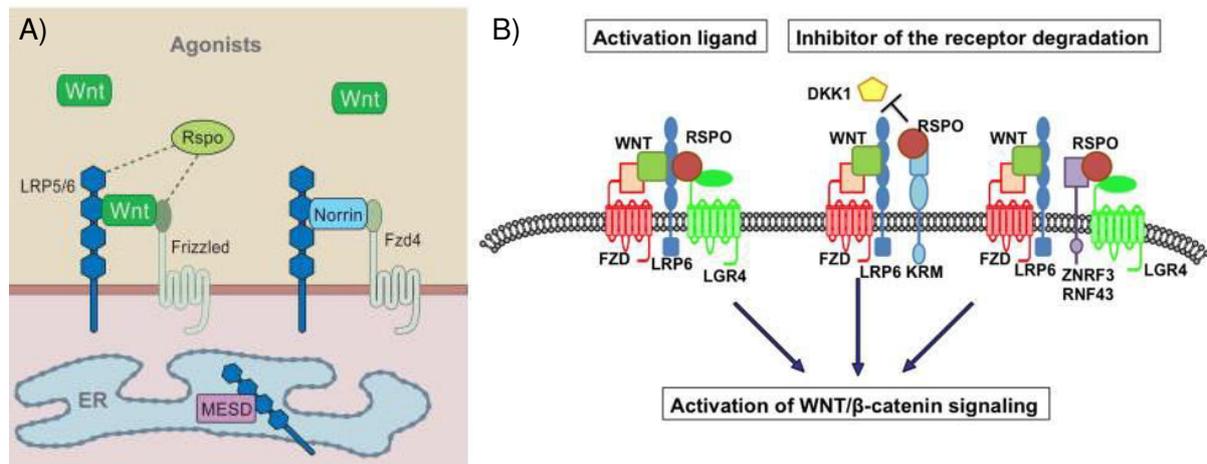


Figure 10 : Autres agonistes de la voie Wnt/β-caténine. (A) Le ligand Norrin active la voie Wnt/β-caténine de la même façon qu'un ligand Wnt, mais uniquement avec le récepteur Fzd4 (Frizzled). La Rspo peut se fixer sur les récepteurs Fzd et les co-récepteurs LRP5/6 pour activer la voie de signalisation canonique de Wnt. MESD (mesoderm development candidate 2) se fixe sur les co-récepteurs LRP5/6 pour permettre leur maturation et expression membranaire (MacDonald et al., 2009). **(B)** La Rspo (R-spondin) est capable de former un complexe Wnt/Fzd/LRP6/LGR4 (Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor) pour potentialiser l'activation de la voie Wnt/β-caténine. La Rspo peut aussi potentialiser l'activation de la voie canonique de Wnt en inhibant l'activité de Dkk1 (Dickkopf1), un antagoniste de cette voie ou en bloquant la dégradation des récepteurs Fzd et co-récepteurs LRP5/6 médiée par ZNRF3/RNF43 (Jin and Yoon, 2012). ER : réticulum endoplasmique ; Krm : Kremen.

4.3.3. Antagonistes sécrétés et intégrés à la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique

De nombreuses molécules sont capables de réguler l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (Cruciat and Niehrs, 2013; MacDonald et al., 2009), parmi lesquelles se trouvent des antagonistes extracellulaires sécrétés tels que Dickkopf (Dkk), Secreted-Frizzled-Related Proteins (SFRPs), Wnt Inhibitory Factor 1 (WIF1), Sclérostine (SOST) et SOST-domain-containing 1 (SOST-DC1 ou Wise), Cerberus (Cer), Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4 (IGFBP4) (Figure 11).

Les protéines Dkks sont des antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine capables de se fixer sur les co-récepteurs LRP5/6 (Dkk1, Dkk2 et Dkk4), et ainsi de bloquer l'activation de la voie canonique de Wnt (Figure 11A). Leur fixation sur les récepteurs Kremen 1 et 2 (Krm1/2), induit l'internalisation clathrine-dépendante du co-récepteur LRP6, bloquant ainsi sa phosphorylation. Il en résulte une inhibition de la voie de signalisation (Figure 11B) (Yamamoto et al., 2008). L'effet inhibiteur de Dkk2 reste cependant à nuancer puisque, dans certaines conditions de surexpression de Dkk2 et de co-transfection de Dkk2 avec LRP5/6, une activation de la voie Wnt/ β -caténine a pu être mise en évidence.

Les protéines SOST et Wise inhibent la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en se fixant respectivement sur les co-récepteurs LRP5/6 et LRP6 empêchant la formation d'un complexe de signalisation Wnt/Fzd/LRP (Figure 11E).

La protéine sécrétée IGFBP4 est un antagoniste de la voie Wnt/ β -caténine, qui se fixe directement sur LRP6 et le récepteur Fzd8 (Figure 11F).

Les SFRPs sont des protéines sécrétées composées d'un domaine similaire au site de fixation des ligands Wnt sur les récepteurs Fzd. Les SFRPs vont agir comme des récepteurs leurres, limitant l'interaction entre les ligands Wnt et les récepteurs membranaires Fzd. Il en résulte une inhibition des trois voies de signalisation Wnt (Figure 11C-D).

WIF1 et Cerberus sont deux protéines sécrétées qui préviennent l'interaction entre les ligands Wnt et les récepteurs Fzd, en fixant aussi bien des ligands Wnt de la voie canonique, que des ligands des voies non canoniques (Figure 11C).

D'autres inhibiteurs de la voie Wnt sont intégrés soit à la membrane plasmique soit à la membrane du réticulum endoplasmique : les protéines de la famille Shisa, Wnt-activated inhibitory factor 1 (Waif1/5T4), Adenomatosis Polyposis Coli Down-regulated 1 (APCDD1) et Tiki1 (Cruciat and Niehrs, 2013).

- Les protéines de la famille Shisa sont présentes à la membrane du réticulum endoplasmique et séquestrent les récepteurs Fzd, empêchant leur expression à la membrane plasmique.

- La protéine de la membrane plasmique Waif1 se lie au co-récepteur LRP6, et inhibe son internalisation cavéoline-dépendante après la liaison d'un ligand Wnt, empêchant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine.

- La protéine APCDD1 est exprimée à la membrane plasmique et inhibe la formation du complexe Wnt3a/LRP5.

- La métalloprotéinase Tiki1 inactive les ligands Wnt par clivage.

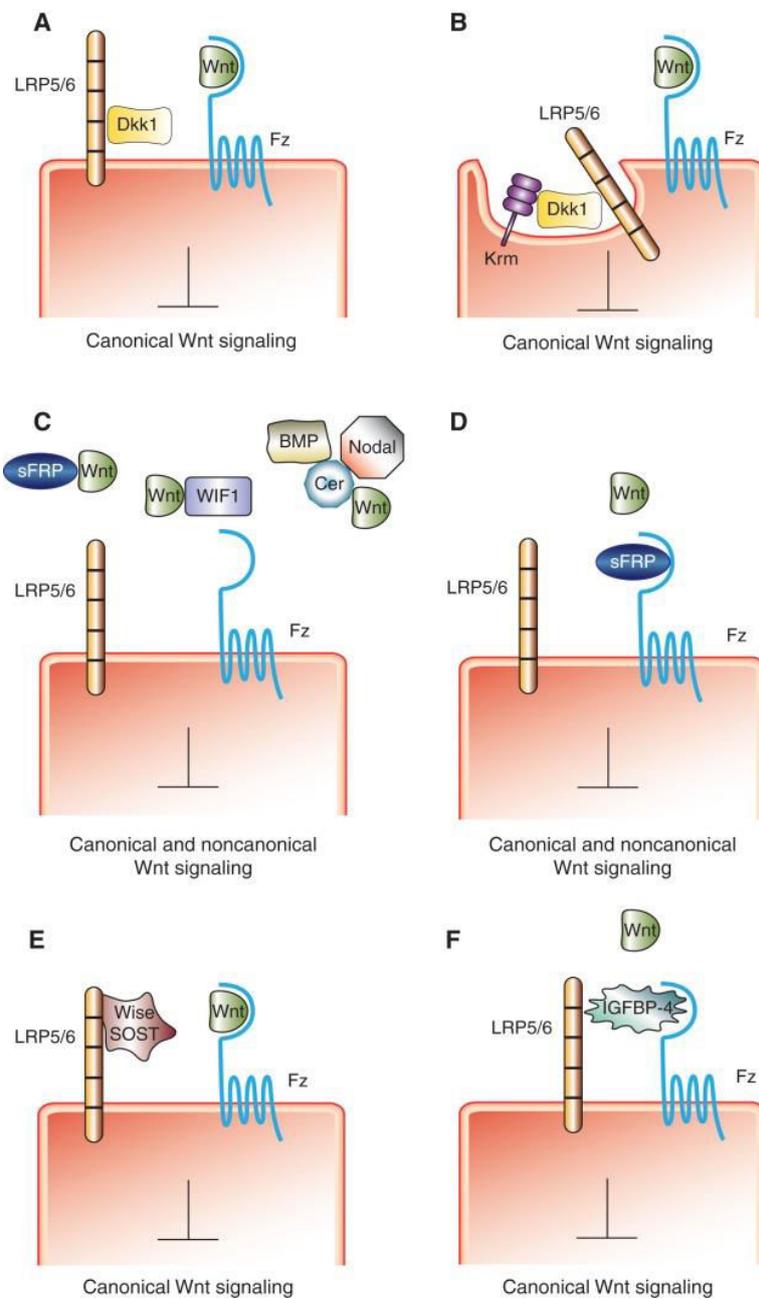


Figure 11 : Antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine. **(A)** Dkk1 (Dickkopf1) se fixe à LRP5/6 (Lipoprotein Receptor-related Protein) et inhibe l'activation de la voie de signalisation. **(B)** Dkk1 induit l'internalisation des co-récepteurs LRP5/6, après s'être fixé sur les récepteurs Krm (Kremen). **(C)** Les ligands Wnt peuvent être piégés dans le milieu extracellulaire par les protéines SFRPs (Secreted-Frizzled-Related Proteins), WIF1 (Wnt Inhibitory Factor 1) et Cer (Cerberus). **(D)** Les SFRPs sont aussi capables de se fixer au niveau des récepteurs Fzd, entrant en compétition avec les ligands Wnt. **(E)** Les protéines Wise et SOST se fixent sur les co-récepteurs LRP5/6 empêchant la formation du complexe de signalisation Wnt/Fzd/LRP. **(F)** IGFBP-4 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4) se lie à LRP6 et aux récepteurs Fzd, entrant en compétition avec les ligands Wnt (Cruciat and Niehrs, 2013).

4.4. Interactions de la voie Wnt/ β -caténine avec d'autres voies de signalisation

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine peut interagir avec d'autres voies de signalisation cellulaire afin de moduler de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques, comme en témoignent les exemples suivants.

4.4.1. Voie du TGF β

La voie de signalisation TGF β /SMADs est une voie de signalisation intracellulaire ubiquitaire, conservée au cours de l'évolution et impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques dès les premiers stades du développement embryonnaire, telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration cellulaire (Weiss and Attisano, 2013). La voie de signalisation du TGF β est activée par la fixation d'un ligand TGF β (TGF β 1-2-3) sur son récepteur transmembranaire, induisant la formation d'un hétérotétramère : deux récepteurs T β RI et deux récepteurs T β RII. Les récepteurs T β RII phosphorylent les récepteurs T β RI, stimulant leur activité Sérine/Thréonine kinase. Les récepteurs T β RI phosphorylent alors les protéines SMADs (SMAD2-3) qui se dissocient du récepteur, et s'associent à la protéine SMAD4, avant d'être transloquées dans le noyau, où SMAD3 va jouer son rôle de facteur de transcription et activer la transcription de gènes cibles tels que *CTGF* (Connective Tissue Growth Factor) ou *PAI-1*. La voie de signalisation du TGF β peut être régulée par la dégradation des récepteurs T β RI sous contrôle de l'ubiquitylation dépendante des E3-ubiquitine ligases Smurf1 et Smurf2, elles-mêmes recrutées par la protéine SMAD7. SMAD7 peut également être à l'origine du recrutement de phosphatases inhibant l'activation des récepteurs T β RI (Verrecchia and Rédini, 2018) (Figure 12).

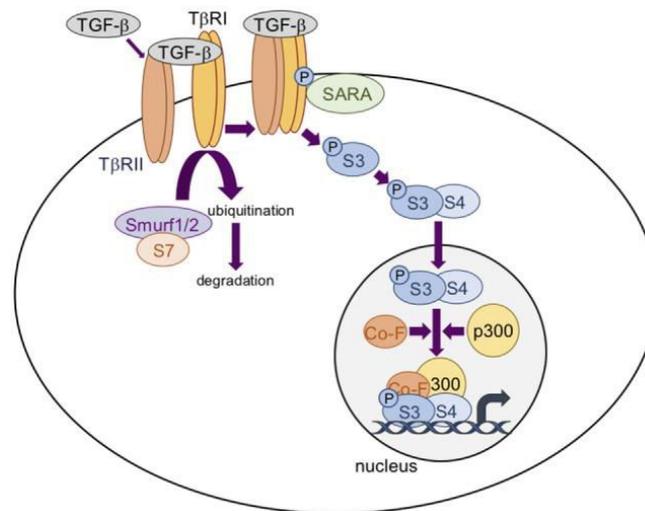


Figure 12 : Voie de signalisation du TGF β . L'activation par le TGF β (Tumor Growth Factor) de la voie de signalisation induit l'hétéro-tétramérisation des dimères T β RI et T β RII, conduisant à la phosphorylation des récepteurs T β RI, libérant leur activité Sérine/Thréonine kinase. SMAD3 (S3) est phosphorylé et activé par T β RI, ce qui permet sa dissociation avec la protéine SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) et son association avec le médiateur SMAD4 (S4). Le complexe protéique S3/S4 est alors importé dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles. La protéine SMAD7 (S7) recrute les E3-ubiquitine ligases Smurf1-2 conduisant à la dégradation des récepteurs T β RI, régulant négativement la voie de signalisation du TGF β (Verrecchia and Rétini, 2018). Co-F : co-factor.

Les interactions entre les voies de signalisation Wnt et TGF β jouent un rôle majeur au cours du développement embryonnaire, grâce à une régulation croisée de leurs ligands, les ligands Wnt et les ligands TGF β (Guo and Wang, 2009). Il a également été observé, dans des cellules saines de glandes mammaires murines, une collaboration entre les voies de signalisation Wnt et TGF β , suite à une stimulation au Wnt3a et au TGF β 1, entraînant un profil transcriptomique inédit, différent de chacune des deux voies analysées individuellement (Labbé et al., 2007). En effet, la stimulation de cellules souches mésenchymateuses ou de chondrocytes par le TGF β 1 induit la translocation nucléaire de la β -caténine, de façon SMAD3 (et SMAD4) dépendante et indépendante de la voie de signalisation canonique de Wnt (Jian et al., 2006; Zhang et al., 2010). Il en résulte une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de la β -caténine (*AXIN2*, *BIRC5*). De plus, il a été démontré par co-immunoprécipitation dans un système de surexpression de la β -caténine et de SMAD3 que ces deux protéines peuvent interagir de façon directe (Zhang et al., 2010). Les protéines SMADs (SMAD2, 3, 4) peuvent également s'associer aux facteurs de transcription TCF/LEF1, dans des complexes avec ou sans la β -caténine, pour activer la transcription de gènes cibles (Labbé et al., 2000).

La coopération entre ces deux voies de signalisation est impliquée dans le maintien du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), comme cela a été démontré dans les carcinomes (Fuxe et al., 2010; Zhang et al., 2016a). En effet, les protéines SMADs interagissent avec des facteurs ou cofacteurs de transcription tels avec les protéines β -caténine, TCF1/LEF (voie Wnt), ou avec les facteurs de transcription Snail1, ZEB1, ZEB2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox) pour former des complexes transcriptionnels capables d'induire la transcription de gènes cibles responsables du phénotype mésenchymateux, et réprimer les gènes cibles responsables du phénotype épithélial (Fuxe et al., 2010; Tian et al., 2013). De même, dans des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires, une stimulation avec du TGF β 1 induit la formation d'un complexe transcriptionnel SMAD3/CBP/ β -caténine sur un domaine SBE (SMADs Binding Element) du promoteur du gène α -SMA (Zhou et al., 2012). Enfin, d'autres gènes tels que *PAI-1* et *GLI2* peuvent être la cible d'un complexe transcriptionnel incluant la β -caténine et SMAD3 dans des carcinomes (Dennler et al., 2009; Fuxe et al., 2010). Toutes ces études mettent donc en évidence des régulations croisées entre les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et TGF β /SMADs.

4.4.2. Voie Hippo

La voie de signalisation Hippo/YAP est une voie de signalisation très conservée au cours de l'évolution, qui est régulée par des facteurs mécaniques ou par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Elle est impliquée dans la régulation de fonctions cellulaires majeures telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose, et la différenciation cellulaire. Lorsque la voie de signalisation Hippo est activée, les protéines MST1/2 (mammalian sterile 20-like kinases 1/2) phosphorylent et activent les protéines LATS1/2 (large tumor suppressor 1/2). Les protéines LATS1/2 activées phosphorylent ensuite les facteurs YAP/TAZ entraînant leur séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 ou leur dégradation par la voie du protéasome (Piccolo et al., 2014). En revanche, lorsque la voie Hippo est inactive, les protéines YAP/TAZ ne sont pas phosphorylées, et sont transloquées dans le noyau pour jouer leurs rôles de cofacteurs de transcription associées aux facteurs de transcription TEAD1/4 (Transcriptional enhancer factor TEF-1/4) et réguler la transcription de gènes cibles tels que *CTGF* ou *CYR61* (Figure 13).

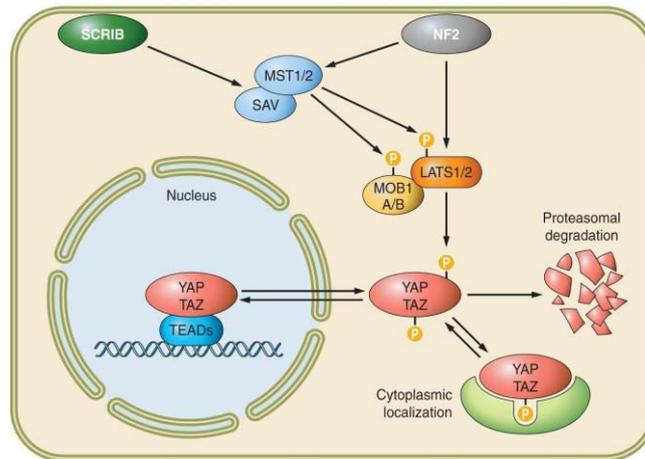


Figure 13 : Voie de signalisation Hippo/YAP. Lorsque la voie de signalisation Hippo est inactive, les protéines YAP/TAZ (yes-associated protein/ transcriptional coactivator with PDZ-binding domain) ne sont pas phosphorylées, et sont transloquées dans le noyau pour s'associer aux facteurs de transcription de la famille TEADs (Transcriptional enhancer factor TEF) et activer la transcription de gènes cibles. Lorsque la voie Hippo est activée, une cascade de signalisation entraîne la phosphorylation des protéines YAP/TAZ qui sont alors séquestrées dans le cytoplasme et peuvent être dégradées par la voie du protéasome (Piccolo et al., 2014). LATS1/2 : large tumor suppressor 1/2 ; MST1/2 : mammalian sterile 20-like kinases 1/2.

Des interactions ont pu être mises en évidence entre les voies de signalisation Hippo/YAP/TAZ et Wnt/ β -caténine dans le cadre de la progression tumorale, en particulier du cancer gastro-intestinal. Tout d'abord, les protéines YAP/TAZ cytoplasmiques sont impliquées dans le recrutement de l'ubiquitine ligase du complexe de dégradation de la β -caténine, en absence de stimulation de la voie canonique de Wnt, participant à l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine (Bernascone and Martin-Belmonte, 2013). Mais, dans le gliome, la surexpression de la protéine YAP est responsable d'une augmentation de croissance tumorale, via la régulation de l'activité de GSK3 β , menant à une activation de la voie Wnt/ β -caténine (Wang et al., 2017b). D'autre part, les protéines YAP/TAZ nucléaires peuvent participer à la formation du complexe de transcription β -caténine/TCF/LEF, stimulant ainsi son activité transcriptionnelle (Bernascone and Martin-Belmonte, 2013). Dans des cardiomyocytes, YAP et la β -caténine interagissent dans des complexes transcriptionnels pour activer des gènes cibles tels que *SOX2* et *SNAI1* (Heallen et al., 2011).

La voie Wnt/ β -caténine peut, à l'inverse, réguler l'activité de YAP/TAZ, la stimulation par Wnt3a stabilisant la protéine TAZ et limitant ainsi sa dégradation (Li et al., 2019b).

Toutes ces études confirment que les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Hippo interagissent aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques.

4.5. Fonctions physiologiques de la voie Wnt/ β -caténine

4.5.1. Remodelage osseux

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est un acteur majeur du remodelage osseux, son activation étant nécessaire à la différenciation des précurseurs mésenchymateux en ostéoblastes matures. Ces derniers peuvent alors former la matrice osseuse minéralisée avant de mourir par apoptose ou de se retrouver emmurés dans la matrice osseuse nouvellement produite. Ces cellules piégées dans la matrice osseuse se transforment en ostéocytes capables de sécréter des régulateurs de la voie Wnt/ β -caténine (SOST, Dkk1) afin de limiter la maturation des ostéoblastes et la formation osseuse (Kenkre and Bassett, 2018). La liaison de la Sclérostine (SOST) sur le co-récepteur LRP4 est essentielle à son activité inhibitrice sur les co-récepteurs LRP5/6 de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéoblastes, inhibant la différenciation ostéoblastique et donc la formation osseuse. C'est pourquoi il a été observé une augmentation de la masse osseuse chez des patients présentant des mutations inactivatrices de LRP4 (Xiong et al., 2015). De plus, les ostéoclastes semblent capables d'inhiber la sécrétion de la Sclérostine (SOST) par les ostéocytes pendant les phases de résorption, permettant ainsi la maturation des ostéoblastes nécessaire à la phase d'apposition osseuse et donc à un remodelage osseux adapté (Koide and Kobayashi, 2019). Des mutations avec perte de fonction ou délétions des co-récepteurs LRP5/6 induisent des phénotypes ostéoporotiques. Au contraire, des mutations limitant les effets des antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine entraînent une augmentation de la masse osseuse (Grigorie and Lerner, 2018; Regard et al., 2012). De plus, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine induit la production d'OPG par les ostéoblastes et les ostéocytes, inhibant ainsi, de façon indirecte, la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse. Néanmoins, les ostéoclastes sont également affectés de manière indirecte par les ligands Wnt qui, via l'activation de β -caténine, augmentent la prolifération des précurseurs des ostéoclastes à un stade précoce mais inhibe l'ostéoclastogenèse à un stade plus tardif du processus de différenciation (Baron and Kneissel, 2013; Pederson et al., 2008; Weivoda et al., 2016).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine et sa régulation sont, par conséquent, au cœur des stratégies thérapeutiques dans le cadre de pathologies affectant le remodelage osseux telles que l'ostéoporose. Ainsi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre la Sclérostine chez les patients ostéoporotiques induit une augmentation de la masse osseuse, par rapport à l'utilisation d'un placebo (Baron and Gori, 2018).

4.5.2. Autres grandes fonctions physiologiques

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est une voie ubiquitaire, très conservée au cours de l'évolution. Elle est impliquée de façon majeure dans de nombreux processus physiologiques de par le rôle primordial qu'elle joue sur la majorité des grandes fonctions cellulaires : prolifération cellulaire, migration et invasion cellulaire, différenciation, transition épithélio-mésenchymateuse, maintien du caractère souche des cellules, polarisation cellulaire, apoptose (Clevers, 2006).

La voie Wnt/ β -caténine est majeure tout au long du développement embryonnaire, avec une implication dans l'organogenèse du cœur, des poumons, des reins, de la peau et des os (Komiya and Habas, 2008). La voie Wnt/ β -caténine participe également à la mise en place de l'axe primaire antéro-postérieur par une régulation différente en fonction de la localisation spatiale : répression au niveau antérieur et activation au niveau postérieur (Petersen and Reddien, 2009).

A l'âge adulte, la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle dans la régénération tissulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire. En effet, elle régule la différenciation et le maintien des cellules souches dans les cryptes intestinales, et au niveau des bulbes pileux, lieux de renouvellement cellulaire intense (Reya and Clevers, 2005). Cette voie de signalisation permet également une régénération tissulaire partielle après des blessures, par la formation d'un tissu fibreux (Bastakoty and Young, 2016). Le système immunitaire, et plus précisément les cellules souches hématopoïétiques sont aussi sous le contrôle de la voie Wnt/ β -caténine qui permet leur auto-renouvellement et donc le maintien d'un stock de cellules souches hématopoïétiques (Clevers, 2006; Malhotra and Kincade, 2009; Reya and Clevers, 2005).

Les rôles majeurs de la voie Wnt/ β -caténine au cours du développement embryonnaire et du maintien de l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte expliquent pourquoi des mutations ou des altérations de cette voie de signalisation sont à l'origine de nombreuses pathologies, notamment cancéreuses (MacDonald et al., 2009).

4.6. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement de différents cancers

4.6.1. Différents types de cancers

La voie canonique de Wnt est impliquée dans le développement de nombreux cancers tels que les cancers gastro-intestinaux (carcinomes colorectal, hépatocellulaire et pancréatique, cancer de l'estomac, cholangiocarcinome), les cancers hématopoïétiques (leucémies myéloïdes, leucémies lymphoblastiques, lymphome, myélome multiple), les cancers du sein, les mélanomes ou les glioblastomes (Ghosh et al., 2019; Zhan et al., 2017), et constitue donc une cible thérapeutique potentielle. C'est pourquoi de nombreuses revues de la littérature rapportent les dernières avancées dans le ciblage de cette voie de signalisation dans différents types de cancer (Ishibashi, 2019; Le et al., 2015; Tabatabai et al., 2017; Tai et al., 2015; Tran and Zheng, 2017; Zhang and Hao, 2015).

4.6.2. Essais cliniques en cours

Les molécules inhibitrices de la voie Wnt, décrites ci-dessous, sont en essais cliniques, majoritairement de phase I (Harb et al., 2019; Krishnamurthy and Kurzrock, 2018). Dans les tumeurs solides, des essais cliniques ont ciblé l'interaction des ligands Wnt avec leurs récepteurs grâce à un anticorps bloquant les récepteurs Fzd (Vantictumab OMP-18R5, NCT01345201, NCT01973309, NCT01957007, NCT02005315) ou par un récepteur leurre couplé à un anticorps permettant de piéger les ligands Wnt (Ipafricept OMP-54F28, NCT02069145, NCT02092363, NCT02050178, NCT01608867). Les premiers essais cliniques avec le Vantictumab (NCT01345201, NCT01973309) ont révélé des atteintes réversibles fragilisant le tissu osseux (Mita et al., 2016; Smith et al., 2013) et pouvant conduire à l'apparition de fractures à de fortes doses, comme cela a été décrit chez des patients atteints de cancers pancréatiques métastatiques (NCT02005315) (Davis et al., 2019b). L'Ipafricept, en association avec des agents de chimiothérapie, était bien toléré par les patientes atteintes de cancer ovarien (Moore et al., 2019) ainsi que par les patients atteints de tumeurs solides (pancréas, foie, ovaires) (Jimeno et al., 2017). En revanche, les doses administrées restaient limitées et combinées à l'administration de thérapies inhibant l'activité ostéoclastique (acide zolédronique, Denosumab) afin d'éviter la fragilisation osseuse. Ces deux molécules ont été abandonnées du fait de la fragilisation osseuse et de l'augmentation de l'incidence des fractures.

D'autres essais cliniques évaluent le ciblage de la maturation des ligands Wnt par l'utilisation d'inhibiteurs de la Porcupine (ETC-159, NCT02521844/LGK974, NCT01351103/WNT974, NCT02278133, NCT02649530 mais rejeté), permettant ainsi de limiter la disponibilité des ligands Wnt dans le microenvironnement. Les résultats définitifs de l'étude sur l'ETC-159 (cancers solides) ne seront disponibles qu'en 2022, mais de premières observations indiquent une bonne tolérance des patients à la molécule, malgré la survenue d'une réduction de la masse minérale osseuse (à dose faible) chez deux patients parmi les 16 inclus dans l'étude (Ng et al., 2017). L'essai clinique avec le LGK974 (NCT01351103) dans des cancers solides obtient également des résultats préliminaires intéressants avec une augmentation du recrutement de lymphocytes T dans la tumeur (Rodon et al., 2018).

Enfin, l'activité transcriptionnelle de la β -caténine peut également être ciblée avec le PRI-724 (ICG-001 de seconde génération), qui inhibe l'interaction entre la β -caténine et CBP, un de ses cofacteurs de transcription. Les essais cliniques utilisant le PRI-724 concluent à sa non dangerosité et seront plus détaillés dans la suite de ce manuscrit.

Le ciblage de la voie de signalisation Wnt fait donc l'objet de nombreux essais, malgré son caractère ubiquitaire et son implication dans diverses phénomènes physiologiques majeurs qui posent la question des effets secondaires associés au ciblage de cette voie (Kahn, 2014). Ces effets secondaires, notamment sur le tissu osseux, ont conduit à l'arrêt de plusieurs essais cliniques. Néanmoins, étant donné le rôle majeur que joue la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans de nombreuses pathologies, il est nécessaire de continuer à approfondir les connaissances sur la régulation de cette voie de signalisation, en particulier lors du développement tumoral. Outre les cancers décrits précédemment, la voie canonique de Wnt est fortement impliquée dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes bien que son rôle soit complexe et encore mal compris à l'heure actuelle.

4.7. Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement des ostéosarcomes

4.7.1. Implication controversée de la voie canonique de Wnt dans le développement des ostéosarcomes

De nombreuses études ont mis en évidence une forte implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la progression tumorale primaire et métastatique des ostéosarcomes. A la fin des années 1990, une étude sur une cohorte modeste met en évidence une accumulation de la β -caténine chez 4 patients atteints d'ostéosarcome, sur les 6 patients testés (Iwao et al., 1999). Quelques années plus tard, une étude immunohistochimique montre que 33 échantillons d'un panel de 40 patients présentent une accumulation cytoplasmique ou nucléaire de la β -caténine (Haydon et al., 2002). En revanche, dans cette étude avec un nombre limité de patients, l'accumulation de la β -caténine ne semble pas être un facteur pronostic pertinent dans le contexte pathologique des ostéosarcomes. En 2019, 3 cohortes plus importantes confirment une augmentation de l'expression de la β -caténine dans les cas d'ostéosarcome comparativement aux individus sains. Tout d'abord, une surexpression de la β -caténine a été observée au niveau transcriptomique dans une cohorte de 61 patients (n'ayant reçu ni chimiothérapie ni radiothérapie) comparativement aux tissus sains adjacents (Huang et al., 2019). De même, une cohorte de 82 patients atteints d'ostéosarcome comparée à 102 tissus osseux sains issus d'amputation (Xia et al., 2019a), et une cohorte de 102 patients atteints d'ostéosarcome (dont 25 métastatiques) n'ayant pas reçu de chimiothérapie néo-adjuvante comparée à des tissus sains adjacents (Xia et al., 2019b), montrent une surexpression significative de la β -caténine au niveau transcriptionnel et protéique, ainsi que de ces gènes cibles CYCLINE D1, cMYC et SURVIVINE. De plus, conjointement à la surexpression de la β -caténine, il a été démontré que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est activée de façon aberrante dans les cellules d'ostéosarcome (U2OS, SaOS2) comparativement à des hMSC (cellules souches mésenchymateuses humaines), notamment par l'implication de sécrétions autocrines de ligands Wnt (Chen et al., 2015).

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont un enjeu important en cancérologie. Ces cellules, appartenant à la masse tumorale, sont plus résistantes aux agents de chimiothérapie, et seraient donc fortement impliquées dans les phénomènes de rechutes locales. Les CSC sont caractérisées par une activation persistante des voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire, telles que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cette population cellulaire représente environ 2,1 à 10% des cellules de la tumeur

d'ostéosarcome, et possède des caractéristiques de clonogénicité, d'auto-renouvellement, de prolifération, d'invasion, de tumorigénicité *in vivo*, et de résistance aux molécules de chimiothérapie plus importantes que les autres cellules de la tumeur. De plus, ces cellules présentent une suractivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par rapport aux autres cellules de la tumeur, avec une augmentation de l'expression protéique de la β -caténine ainsi qu'une surexpression de ces gènes cibles (*CCND1*, *ABCG2*). Plus récemment, il a été mis en évidence que la β -caténine régule positivement les caractéristiques souches des CSC d'ostéosarcome (Liu et al., 2018a). Ces données confirment qu'un traitement inhibant la voie Wnt/ β -caténine permettrait de cibler les CSC et pourrait potentiellement améliorer la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome métastatiques et chimiorésistants.

La perte ou la diminution d'expression de certains antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine peut également être en faveur d'une activation de cette voie dans les ostéosarcomes. Ainsi, l'inhibiteur WIF1, un antagoniste sécrété se fixant aux protéines ligands Wnt, n'est pas détecté en immunohistochimie dans 76% des cas d'ostéosarcome dans une cohorte de 50 patients, et est sous-exprimé dans les lignées cellulaires d'ostéosarcome humain (SaOS2, SaOS-LM7, HOS-MNNG, 143B, U2OS, OS160) comparativement à une lignée d'ostéoblastes (Rubin et al., 2010). La répression du gène *WIF1* semble être médiée par des phénomènes épigénétiques dans les lignées cellulaires d'ostéosarcome. *In vivo*, les souris *WIF1*^{-/-}, n'exprimant pas la protéine WIF1 sont plus sensibles à la survenue d'ostéosarcome spontané ou radio-induit (Kansara et al., 2009). De plus, la réexpression de WIF1 dans la lignée cellulaire 143B permet de réduire la croissance tumorale et de diminuer la dissémination métastatique pulmonaire *in vivo* (Rubin et al., 2010). Un autre inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, NKD2 (naked cuticle homolog 2), impliqué dans la dégradation de la protéine Dvl, est sous-exprimé dans les cas d'ostéosarcome les plus agressifs (métastatiques et/ou récurrents). Les ostéosarcomes localisés présentent quant à eux des niveaux plus élevés de NKD2, associés à l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (*NBL1*, *neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1*) ainsi qu'à une diminution d'expression des gènes impliqués dans la néoangiogenèse et la migration cellulaire (*MMP-9*, *TNFAIP2 tumor necrosis factor alpha-induced protein 2*). Une surexpression de NKD2 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome murin fortement métastatique (RF379L) induit une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire *in vitro*, ainsi que de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique *in vivo* (Zhao et al., 2015). La sous-expression de différents éléments régulateurs de la voie Wnt/ β -caténine, à l'origine d'une dérégulation de cette voie semble donc jouer un rôle clé dans le développement des ostéosarcomes.

Cependant, l'implication de la voie canonique de Wnt dans la progression tumorale primaire et métastatique des ostéosarcomes demeure, à l'heure actuelle controversée, puisque plusieurs études décrivent une inactivation de cette voie dans les ostéosarcomes. En effet, une étude réalisée sur 52 biopsies humaines d'ostéosarcome et 4 lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome (MG63, HOS, SJS1, U2OS) révèle une absence de marquage de la β -caténine au niveau nucléaire dans 90% des biopsies et dans les 4 lignées cellulaires (Cai et al., 2010). De plus, l'étude d'une autre cohorte de 46 patients atteints d'ostéosarcome ne permet pas de mettre en évidence la présence de la β -caténine par immunohistochimie dans le noyau, mais uniquement dans le cytoplasme et à la membrane plasmique (Du et al., 2014). Il a été suggéré une inactivation de la voie de signalisation Wnt dans les ostéosarcomes, car des expériences de puces à ADN mettent en évidence des délétions de plusieurs gènes de la voie Wnt dans une cohorte de 11 patients atteints d'ostéosarcome (Du et al., 2014). Une autre équipe a également montré, lors d'une étude sur 25 patients atteints d'ostéosarcome, que des gènes de la voie Wnt/ β -caténine (*FZD2*, *FZD7*) et des gènes cibles (*CCND1*, *AXIN*) étaient sous-exprimés dans les ostéosarcomes. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car les échantillons de patients ont été comparés à des cellules *in vitro* (5 types de hMSC différentes et les 5 mêmes hMSC différenciées en ostéoblastes), cette comparaison entre des cellules isolées en culture cellulaire et des cellules issues d'un microenvironnement complet pouvant être à l'origine de biais (Cleton-Jansen et al., 2009). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de GSK3 β induisant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine réduit la prolifération des cellules MG63 et U2OS (Cai et al., 2010). De même, un anticorps neutralisant Dkk1 (régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine), permettant d'induire une augmentation de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine et de l'expression nucléaire de la β -caténine diminue la croissance de la tumeur et la dissémination métastatique, dans des modèles murins d'ostéosarcome établis à partir de Patient-Derived Xenograft (PDX). Ces deux dernières études suggèrent donc également un rôle anti-tumoral de la Wnt/ β -caténine dans l'ostéosarcome (Goldstein et al., 2016).

Malgré des données qui peuvent être contradictoires, la majorité des études reste néanmoins en faveur d'une activation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine au cours du développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes (Adamopoulos et al., 2016; Pridgeon et al., 2017).

4.7.2. Intérêt de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine pour le pronostic

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont permis d'établir un lien entre l'activation de la voie canonique de Wnt et le potentiel métastatique des lignées issues d'ostéosarcome. Ainsi, une première étude a comparé, à l'aide de puces à ADN, les lignées parentales HOS et SaOS2, à chacune de leurs lignées filles à fort potentiel métastatique respectives HOS/143B et SaOS2/LM7. Une augmentation de l'activation des voies de signalisation de Wnt, du remodelage du cytosquelette, et du TGF β a été mise en évidence pour les lignées métastatiques (Flores et al., 2012). Une seconde étude réalisée avec des lignées métastatiques et leurs lignées parentales originelles a également montré que le niveau de β -caténine nucléaire transcriptionnellement active peut être corrélé au degré d'agressivité des ostéosarcomes (Ali et al., 2019).

L'analyse d'une cohorte de 96 patients a permis de montrer une expression élevée de β -caténine dans les tissus d'ostéosarcome, comparativement aux tissus adjacents, et pouvant être corrélée avec la présence de métastases et un taux de survie globale plus faible des patients (Lu et al., 2015). Ces résultats, indiquant l'intérêt de la β -caténine pour le pronostic sont confirmés par d'autres études cliniques. En effet, dans une cohorte de 107 patients atteints d'ostéosarcome, les patients présentant une expression élevée de β -caténine (déterminée en immunohistochimie sur les pièces de résection chirurgicale) ont un risque plus important de développer des métastases pulmonaires et ont une survie globale plus faible, que les patients dont le niveau d'expression de la β -caténine est faible (Liu et al., 2018a). De plus, l'analyse par puce à ADN des gènes différentiellement exprimés entre 19 patients sans métastases et 18 patients avec métastases (GSE39055) révèle que l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est associée à une dissémination métastatique des ostéosarcomes plus importante (Liu et al., 2018b). Ces données peuvent être associées au fait que la cytokine Wnt6, ligand activateur de la voie Wnt/ β -caténine est augmentée chez les patients présentant une survie globale plus faible ou avec des métastases (cohorte de 88 patients atteints d'ostéosarcome) (Jiang et al., 2018).

L'activation importante de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine semble donc être corrélée au processus de dissémination métastatique chez les patients atteints d'ostéosarcome.

4.7.3. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine et résistance aux traitements

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine participe à la résistance des ostéosarcomes aux agents de chimiothérapie standards, notamment par l'acquisition de caractéristiques de cellules souches (Li et al., 2013). En effet, l'analyse de données cliniques montre une corrélation positive entre l'expression des marqueurs de cellules souches et la résistance aux traitements (Martins-Neves et al., 2016).

L'exposition des lignées cellulaires d'ostéosarcome (HOS, HOS-MNNG, U2OS) aux agents de chimiothérapie (doxorubicine, cisplatine, méthotrexate) induit une transition phénotypique, vers un profil de cellule souche, via une activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et une augmentation de l'expression de transporteurs membranaires ABC (ATP-binding cassette), impliqués dans l'efflux des molécules de chimiothérapie. La combinaison d'un traitement inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine (IWR-1, inhibiteur des Tankyrases stabilisant le complexe de dégradation de la β -caténine) et de doxorubicine bloque l'apparition d'un phénotype de cellules souches (Martins-Neves et al., 2016). L'inhibiteur des Tankyrases, IWR-1, augmente également la sensibilité des cellules 143B à la doxorubicine en diminuant l'efflux de l'agent de chimiothérapie (Gustafson et al., 2018). Ces résultats ont été validés *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe (HOS-MNNG) traité par la doxorubicine en combinaison avec la molécule IWR-1. De plus, des cellules U2OS rendues résistantes à la doxorubicine (U2OS/Dox) montrent une expression de la β -caténine plus importante que les cellules natives, non résistantes à la doxorubicine. La diminution d'expression de la β -caténine, par un siRNA ou par l'utilisation du XAV-939 (stabilisation du complexe de dégradation de la β -caténine en inhibant l'activité des Tankyrases), resensibilise les cellules U2OS à la doxorubicine, démontrant ainsi l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la résistance à la doxorubicine (Wu et al., 2017).

Outre la doxorubicine, la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la résistance à d'autres agents de chimiothérapie. En effet, une augmentation de l'expression protéique de TWIST (facteur de transcription, réprimant les marqueurs épithéliaux lors de l'EMT) par transfection diminue la survie des cellules d'ostéosarcome SaOS2 en présence de cisplatine, en réduisant le niveau d'expression de la β -caténine, suggérant l'implication de la β -caténine dans la résistance des cellules à la cisplatine (Wu et al., 2014). Dans cette étude, TWIST stabilise GSK3 β , en diminuant sa phosphorylation. Ces données peuvent être corrélées au fait que des anomalies du gène *TWIST* (majoritairement des délétions) chez les patients (91 cas d'ostéosarcome de la cohorte OS94) sont associées à une augmentation du risque de rechutes ainsi qu'à une diminution de la survie globale (Entz-Werle et al., 2007; Entz-Werlé

et al., 2005). L'effet du méthotrexate pourrait aussi être impacté par la voie Wnt/ β -caténine, car l'utilisation d'un shRNA (small hairpin RNA) spécifiquement dirigé contre la β -caténine dans la lignée cellulaire SaOS2 sensibilise les cellules au méthotrexate, en induisant la mort cellulaire (Ma et al., 2013).

Ces différentes études démontrent donc que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est impliquée dans les phénomènes de résistances aux agents de chimiothérapie utilisés dans les protocoles thérapeutiques des ostéosarcomes : doxorubicine, cisplatine et méthotrexate.

4.7.4. Régulations épigénétiques de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes

Les régulations épigénétiques de la voie canonique de Wnt ont fait l'objet de nombreuses études récentes dans les cas de cancers, et notamment dans les ostéosarcomes, et portent essentiellement sur les lncRNAs (long non coding RNAs) et les miRs (micro RNAs).

Les lncRNAs sont des fragments d'ARN non codants de plus de 200 nucléotides, qui sont impliqués dans l'ensemble des grandes fonctions biologiques cellulaires, de la prolifération cellulaire à la mort cellulaire en passant par la migration et l'invasion cellulaire. Les lncRNAs jouent un rôle dans les processus physiologiques et pathologiques : le développement embryonnaire, l'immunité, le développement tumoral ainsi que dans les mécanismes de dissémination métastatique, d'angiogenèse et de résistance à la mort cellulaire (Gutschner and Diederichs, 2012). De nombreuses études rapportent des disparités d'expression des lncRNAs dans des cas de cancers, mais les mécanismes d'actions ne sont pas toujours élucidés. Les lncRNAs peuvent modifier l'état de la chromatine via le recrutement de protéines de régulation (ex : méthylation de l'ADN), réguler la transcription (ex : interférence avec l'ARN Polymerase II) ou la stabilité et la traduction des ARNm (ARN messenger) (ex : réduction du nombre de polysomes par ARNm, donc diminution de la traduction) (Kung et al., 2013; Wilusz et al., 2009). De plus en plus d'études démontrent l'importance de certains lncRNAs dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes, notamment par la régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Par exemple, l'expression de deux lncRNA BE503655 et AWPPH, qui régulent positivement la voie Wnt/ β -caténine, est augmentée dans les ostéosarcomes humains par rapport aux tissus sains adjacents et corrélée avec l'augmentation de la dissémination métastatique chez les patients (Huang et al., 2019; Li et al., 2019a). Les lncRNA AWPPH et AFAP1-AS1 ciblent chacun un miR inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine

et favorise ainsi l'invasion des cellules d'ostéosarcome. De plus, les patients avec un niveau élevé de lncRNA AFAP1-AS1 présentent une survie globale plus faible (cohorte de 49 patients) (Li et al., 2018).

Les miRs sont des ARN non codants de petite taille (d'environ 20 nucléotides), régulateurs post-transcriptionnels capables de se fixer sur des ARNm cibles afin d'induire leur dégradation ou d'inhiber leur traduction. La spécificité des miRs est relativement faible étant donné qu'un miR peut avoir plusieurs cibles différentes, et, à l'inverse, un ARNm peut être la cible de plusieurs miRs. Les miRs jouent un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle en modulant le pool d'ARNm de la cellule. Les miRs sont donc engagés dans tous les phénomènes biologiques cellulaires, et des dérégulations peuvent être retrouvées dans certaines pathologies, notamment dans les cancers. Les miRs peuvent jouer un rôle dans le développement primaire et métastatique des ostéosarcomes, notamment par leurs actions sur les différentes voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse telles que la voie Wnt (Kushlinskii et al., 2016). Certains miRs surexprimés dans les ostéosarcomes ciblent des régulateurs négatifs de la voie Wnt/ β -caténine et induisent ainsi une sur-activation de cette voie. A titre d'exemple, le miR-27a (Mu et al., 2019) et le miR-552-5p (Cai et al., 2019), ciblent respectivement l'ARNm de SFRP1 et l'ARNm de WIF1. Il en résulte une augmentation de la migration et de l'invasion des cellules d'ostéosarcome *in vitro*. Ces deux miRs sont fortement exprimés dans les tumeurs de patients atteints d'ostéosarcome comparativement à des tissus sains.

4.7.5. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le microenvironnement des ostéosarcomes

Les cellules d'ostéosarcome ont la capacité de détourner le microenvironnement osseux à leur avantage afin de permettre la progression tumorale et la dissémination métastatique. Dans ce contexte, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle clé en modulant de grandes fonctions associées au développement tumoral telles que le remodelage osseux, l'angiogenèse et la réponse immunitaire.

La modification du microenvironnement tumoral constitue une étape importante du processus métastatique des ostéosarcomes. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine régule la dégradation de la matrice extracellulaire, en favorisant l'expression et/ou l'activation d'enzymes protéolytiques comme les MMPs, notamment les MMP-2 et 9 et 14 (Guo et al., 2007). L'activation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine induit aussi l'expression de la MT1-MMP (membrane type 1 metalloproteinase), responsable de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type II ou la fibronectine

(Zhang et al., 2011a). De plus, la MT1-MMP active par clivage d'autres membres de la famille des MMPs tels que la MMP-2. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la β -caténine peut diminuer l'invasion des ostéosarcomes par une régulation à la baisse de l'expression et de l'activation des MMPs (Guo et al., 2007). Lors de la progression des ostéosarcomes, il s'établit également un cercle vicieux entre la prolifération des cellules tumorales et le remodelage osseux. La dégradation de la matrice osseuse permet le relargage de facteurs de croissance : les cellules tumorales prolifèrent et le volume tumoral augmente, nécessitant un apport plus important en nutriments et en oxygène. Les cellules tumorales sécrètent alors des cytokines pour promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

L'angiogenèse est un processus biologique complexe qui conduit au développement de nouveaux vaisseaux sanguins et joue un rôle clé dans la progression tumorale primaire et le processus métastatique de plusieurs cancers dont les sarcomes osseux. Les étapes de l'angiogenèse comprennent la prolifération et la migration des cellules endothéliales pour former un vaisseau germinatif, puis le recrutement de péricytes ou cellules musculaires lisses pour produire un vaisseau sanguin mature et fonctionnel. Ce processus est nécessaire à la croissance de la tumeur primaire d'une part, grâce à l'apport indispensable de nutriments et à la dissémination métastatique, d'autre part, fournissant un site d'intravasation pour les cellules cancéreuses. Le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) est le facteur pro-angiogénique majeur impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels dans les tumeurs par recrutement et différenciation des cellules progénitrices endothéliales. La transcription du gène *VEGF* est directement régulée par le complexe β -caténine/TCF grâce à la présence de sites de liaison TCF dans le promoteur du gène (Easwaran et al., 2003). Seules quelques études traitent de l'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans l'angiogenèse associée aux ostéosarcomes. Néanmoins, une étude a décrit que NKD2, un régulateur négatif de la signalisation Wnt, diminue l'expression des gènes impliqués dans le développement vasculaire des ostéosarcomes (Zhao et al., 2015), suggérant un rôle pro-angiogénique de la voie de la Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels induit aussi l'arrivée sur le site de la tumeur des cellules de l'immunité adaptative et innée.

Comme indiqué précédemment, le microenvironnement immunitaire des sarcomes osseux est très hétérogène, composé d'effecteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Heymann et al., 2019). Dans différents types de cancers, la voie Wnt/ β -caténine est associée à l'exclusion des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) et à l'établissement d'un microenvironnement immunodéprimé (Goldsberry et al., 2019; Luke et al., 2019). De plus, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules dendritiques augmente la synthèse et la sécrétion de cytokines immunomodulatrices (IL-10, indoleamine 2,3-dioxygénase). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine module également le recrutement et la prolifération des cellules immunitaires, et de nombreuses fonctions immunitaires au sein de la tumeur, avec une augmentation des lymphocytes T régulateurs et une diminution des fonctions cytotoxiques des lymphocytes (Galluzzi et al., 2019).

En conclusion, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine semble favoriser le développement des ostéosarcomes, notamment en participant au détournement du microenvironnement par les cellules tumorales, favorisant le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes. Ces éléments de discussion sont repris et détaillés dans la revue que nous avons publiée en août 2019 : "New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies?" (Danieau et al., 2019).



Review

New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies?

Geoffroy Danieau, Sarah Morice, Françoise Rédini, Franck Verrecchia and
Bénédicte Brounais-Le Royer *

Université de Nantes, INSERM, UMR1238, Phy-OS, Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés,
44035 Nantes, France

* Correspondence: benedicte.brounais@univ-nantes.fr; Tel.: +33-0240412846

Received: 17 July 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 31 July 2019



Abstract: Osteosarcoma and Ewing sarcoma are the most common malignant primary bone tumors mainly occurring in children, adolescents and young adults. Current standard therapy includes multidrug chemotherapy and/or radiation specifically for Ewing sarcoma, associated with tumor resection. However, patient survival has not evolved for the past decade and remains closely related to the response of tumor cells to chemotherapy, reaching around 75% at 5 years for patients with localized forms of osteosarcoma or Ewing sarcoma but less than 30% in metastatic diseases and patients resistant to initial chemotherapy. Despite Ewing sarcoma being characterized by specific *EWSR1-ETS* gene fusions resulting in oncogenic transcription factors, currently, no targeted therapy could be implemented. It seems even more difficult to develop a targeted therapeutic strategy in osteosarcoma which is characterized by high complexity and heterogeneity in genomic alterations. Nevertheless, the common point between these different bone tumors is their ability to deregulate bone homeostasis and remodeling and divert them to their benefit. Therefore, targeting different actors of the bone tumor microenvironment has been hypothesized to develop new therapeutic strategies. In this context, it is well known that the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a key role in cancer development, including osteosarcoma and Ewing sarcoma as well as in bone remodeling. Moreover, recent studies highlight the implication of the Wnt/ β -catenin pathway in angiogenesis and immuno-surveillance, two key mechanisms involved in metastatic dissemination. This review focuses on the role played by this signaling pathway in the development of primary bone tumors and the modulation of their specific microenvironment.

Keywords: Wnt/ β -catenin; bone sarcoma; bone tumor microenvironment

1. Primary Bone Tumors: Osteosarcoma and Ewing Sarcoma

Osteosarcoma and Ewing sarcoma are the most common primary bone tumors mainly occurring in children, adolescents and young adults. Current standard therapy includes multidrug chemotherapy and/or radiation for Ewing sarcoma, associated with tumor resection. However, the 5-year survival rates have not been improved during the last decades reaching 70–80% for patients with localized forms, but less than 30% in metastatic diseases and patients resistant to initial chemotherapy [1–5].

Osteosarcoma that mainly occurs at the ends of long bones is not associated with any clinical signs except severe pain or spontaneous fracture. Osteosarcoma does not express specific oncogenic markers but exhibits a large number and variety of genetic alterations. Ewing sarcoma is a tumor composed of small undifferentiated round cells that can appear mainly in bones but also in soft tissues in 15% of

cases. In contrast to osteosarcoma, Ewing sarcoma is characterized by a chromosomal translocation between the *EWSR1* and *FLI1* genes in 90% of cases, or by the fusion of *EWSR1* with other transcription factors of the E26 Transformation-Specific (ETS) gene family in 10% of cases [6–8].

Despite progress in understanding the biology of osteosarcoma and Ewing sarcoma, no targeted therapy could be currently implemented to improve patient survival. Nevertheless, the common point between these two pediatric bone tumors is their ability to deregulate bone homeostasis and remodeling to divert them to their benefit. Therefore, new therapeutic research is moving towards targeting different actors of the bone microenvironment.

2. Tumor Microenvironment: Crucial Role in Bone Sarcoma Tumor Growth and Metastatic Progression

It is well established that the bone tumor microenvironment (TME) plays a major role during tumor initiation, progression, and metastatic processes. This very complex and dynamic environment includes different cell types such as osteoblasts, osteoclasts, stromal cells, mesenchymal stem cells, immune or endothelial cells and non-cellular components such as the extracellular matrix compounds [9]. These cells are able to communicate with each other in order to influence their behavior [10]. This microenvironment is able to support bone sarcoma primary development, resistance to chemotherapy [11] and metastatic spread of tumor cells [12–14].

The crucial role played by the TME on sarcoma development has been recently highlighted in several studies. As an example, a modification of the transcriptome has been observed in cell lines established from synovial sarcomas compared to initial tumors or directly engrafted tumors in mice, demonstrating the impact of TME on tumor behavior, particularly through interactions with the immune system and stromal cells [15]. The bone TME is also able to affect the behavior and the fate of tumor cells and particularly, their ability to migrate and invade new tissues. Indeed, the development of sarcoma in orthotopic models of xenograft was associated with the establishment of metastases whereas the subcutaneous model did not allow to observe any metastatic spread [16]. These enhanced invasive and migratory capacities have been confirmed in a rat model of prostate carcinoma and related to the acidification of the bone tumor microenvironment [17]. Similarly, Chattopadhyay et al. have observed that solid sarcoma developed differentially when implanted into two different anatomical sites, related to a greater neovascularization and the presence of tumor-associated fibroblasts and tumor-associated adipocytes, which could support sarcoma tumor growth [18].

2.1. Hijacking of the Bone Tumor Microenvironment by Bone Sarcoma Cells

One of the main hallmarks of osteosarcoma and Ewing sarcoma is their ability to disrupt bone remodeling in favor of an exacerbated osteoclast-mediated bone resorption, leading to the release of pro-tumoral factors initially embedded in the bone matrix [19–21]. It thus establishes a vicious cycle between bone sarcoma proliferation and bone resorption, leading to investigations about the beneficial effect of anti-resorptive agents on bone sarcoma progression. Thus zoledronate, an N-containing bisphosphonate able to inhibit osteoclasts proliferation and activity, reduces osteosarcoma and Ewing sarcoma primary and metastatic development in corresponding pre-clinical models, disrupting the vicious cycle between tumor growth and osteoclast-mediated bone resorption [22–25].

Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) play also a major role in the communication between tumor cells and their microenvironment, as highlighted by recent studies, including increased proliferation and migration of tumor cells. On one hand, bone marrow MSCs promote migration and invasion through direct secretion of several cytokines such as C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) that binds to C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) or CXCR7 on osteosarcoma associated with lower overall patient survival [26–28]. Interleukin-6, secreted by MSCs, contributes to promote metastatic dissemination of osteosarcoma [29,30]. On the other hand, MSCs release exosomes that promote tumor growth and metastases [31]. Other types of stem cells such as the stromal adipose-derived mesenchymal stem cells stimulate tumor growth and invasion of osteosarcoma cells,

by activating the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway, resulting in an increase of the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9 [32].

Bone sarcoma is able to modulate the recruitment, expansion and differentiation of immune cells to establish an immunosuppressive microenvironment, allowing tumor development and metastatic dissemination [33]. Regarding innate immunity, bone sarcomas are mainly invaded by TAMs that are initially divided into two categories: anti-tumor M1-polarized macrophages and tumor-promoting M2-polarized macrophages [34]. Macrophages massively invade osteosarcoma, this infiltration being associated with a good prognosis in osteosarcoma patients [35,36]. However, the implication of tumor-promoting M2-polarized macrophages infiltrates in osteosarcoma progression remains controversial. Indeed, M2-type macrophage infiltrates in the tumor have been correlated with a poor prognosis in some studies [36,37]. Moreover, on one hand, an imbalance in favor of M1 macrophages has been observed in patients without metastases [37]. On the other hand, M2-polarized macrophages have been associated with increased tumor growth and metastases in preclinical models of osteosarcoma [38]. However, a recent study based on the most important cohort of osteosarcoma patients from the OS2006 clinical trial has demonstrated that the presence of CD163⁺ M2-polarized macrophages is crucial for the inhibition of osteosarcoma progression [35]. In contrast, macrophages do not seem to play such a role in Ewing sarcoma development and patient survival [39,40]. Moreover, M2-polarized macrophages contribute to the exhaustion of T lymphocytes infiltrating the tumor, reducing their proliferation and secretion of pro-inflammatory cytokines [41]. These results may be associated with the existing metabolic competition between sarcoma cells and infiltrating T lymphocytes. Indeed, excessive consumption of glucose from the microenvironment by tumor cells restricts the consumption of T cells, which show decreased glycolysis and under-production of interferon γ (IFN γ). T cells respond less to stimuli, allowing the tumor to escape from immune control. Thus, metabolic competition between tumor cells and T cells influences tumor progression [42].

Besides cellular components, the physical properties of the TME can influence the behavior of cancer cells. Indeed, mechanical (composition of the extracellular matrix) and chemical stress (hypoxia) increase the motility and capacity of sarcoma cells to metastasize, through increased expression of procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2), a collagen cross-linker [43]. Hypoxic microenvironment also leads to increased interleukin-6 expression in osteosarcoma cells, which contributes to increased lung metastases [44]. Finally, Ewing sarcoma in response to Wnt3a stimulation can modify the acellular TME by increasing the secretion of proteins involved in the composition of the extracellular matrix [45].

2.2. Bone Sarcoma Microenvironment as a Prognostic Marker or Therapeutic Target

Several studies have highlighted the importance of analyzing TME in order to predict patient outcomes. For example, Volchenboum et al. have demonstrated the importance of studying stromal cells in contact with the Ewing sarcoma, to predict patients at high risk of relapse, thanks to a gene set enrichment analysis conducted on human Ewing sarcomas samples by the Children's Oncology Group (COG) [46]. A strong expression of C-C motif ligand (CCL) 12 produced by infiltrating immune cells is correlated with an increased ratio of CD8⁺/CD4⁺ infiltrating T lymphocytes, leading to a better response to chemotherapy and overall patient survival [47]. In osteosarcoma, tissue micro-arrays analyses showed that the immune infiltrate of primary tumors was enriched with anti-tumor M1-type macrophages for the localized forms (CD68⁺ iNOS⁺, inducible nitric oxide synthase), as compared to metastatic diseases [37]. In addition, metastatic tumors have a higher vascular density than localized tumors, supporting that greater angiogenesis may partly explain metastatic spread.

Osteoclasts and immune cells are the main potential therapeutic targets for osteosarcoma and Ewing sarcoma. Based on preclinical data, the clinical trial OS2006 (NCT00470223, available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470223>) has been developed to evaluate the combination of zoledronate with current chemotherapy and surgery in osteosarcoma patients. Unfortunately, the results do not recommend the use of zoledronate as no improvement in event-free survival was

observed, zoledronate showing a trend to increase the risk of failure in osteosarcoma patients [48]. Several therapeutic approaches targeting infiltrating immune system are currently in clinical development. For example, some of osteosarcoma and Ewing sarcoma express programmed cell death ligand (PDL)-1 that binds to programmed cell death (PD)-1 on infiltrating T cells, inhibiting their cytotoxic activities and contributing to the local immunosuppression and consequently to the tumor progression [49]. Based on pre-clinical data demonstrating the beneficial effect of PD-1/PDL-1 blockade [50] and correlations between PDL-1 expression and clinical outcomes [51,52], clinical trials evaluating the effects of anti-PD1 antibodies are in progress in osteosarcoma and Ewing sarcoma (Pembrolizumab, NCT02301039 (available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02301039>) and Nivolumab, NCT02304458 (available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02304458>)).

3. The Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway

The Wnt signaling pathway is essential during development and is involved in many cellular processes, such as proliferation, migration, polarization and cellular differentiation. This signaling pathway is therefore finely regulated and mutations or deregulation of the Wnt signaling pathway are often associated with tumor development, chemoresistance, or relapse [53–55]. Three Wnt signaling pathways have been described so far: the canonical Wnt pathway or Wnt/ β -catenin pathway on which we will focus, and the non-canonical Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) and Wnt/ Ca^{2+} pathways which are not detailed in this review.

Wnt ligands are a family of 19 secreted glycoproteins, some of which can bind to one of the 10 receptors of the Frizzled family (Fzd), or to a co-receptor lipoprotein receptor-related protein (LRP)-5 or LRP-6, receptor tyrosine-kinase-like orphan receptor (ROR), related to tyrosine kinase (Ryk), to activate cell signaling. In the absence of Wnt ligands, the Wnt/ β -catenin pathway is inactive, β -catenin is sequestered by a protein complex for degradation. This complex is composed of scaffold proteins, dishevelled (Dvl), adenomatous polyposis coli (APC) and Axin1/2 and Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) protein [56], and two kinases, casein kinase 1 alpha (CK1 α) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) which sequentially phosphorylate β -catenin on Serine 45 (CK1 α), and on serine 33 and 37 and threonine 41 (GSK3 β). Yes-Associated protein/transcriptional co-activator with a PDZ-binding domain (YAP/TAZ) proteins, part of the complex, then recruit beta-transducin-repeat-containing protein (β -TrCP) an ubiquitin ligase responsible for the ubiquitination of β -catenin [57–61]. β -Catenin is then degraded by the proteasome pathway, and therefore does not play its role as a co-transcription factor. In addition, the transcriptional proteins of the T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) family interact with the transcriptional repressors groucho/transducin-like enhancer of split (TLE), recruiting histone deacetylases (HDACs) responsible for repressing transcription [62] (Figure 1, left panel).

The binding of a Wnt ligand (i.e., Wnt1, Wnt3a) to an Fzd receptor and its co-receptor LRP5/6 activates the canonical Wnt pathway, inducing the recruitment of Dvl on Fzd receptor and its activation. CK1 α and GSK3 β kinases then phosphorylate the LRP5/6 co-receptor, allowing the recruitment of Axin on LRP5/6 and the inactivation of the β -catenin degradation complex which is trapped to the membrane. Neosynthesized β -catenin is no longer degraded and accumulates in the cytoplasm [63], before being translocated into the nucleus. It interacts with the transcription factors of the TCF/LEF family and with histones modifying co-activators p300 or cAMP-response element binding protein (CREB) binding protein (CBP), B cell CLL/lymphoma 9 (BCL-9), brahma-related gene 1 (BRG1), and pygopus [64,65]. These complexes activate the transcription of target genes such as *AXIN2*, *LEF1*, *cMYC*, *CCND1*, *BIRC5* (Figure 1, right panel).

Numerous molecules are implicated in the regulation of Wnt ligands and the canonical Wnt pathway activation. These include secreted extracellular inhibitors: dickkopf (DKK), secreted-Fzd-related proteins (SFRPs), Wnt inhibitory factor 1 (WIF1), sclerostin (SOST), cerberus, insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4). DKK and SOST proteins are competitive receptor and co-receptor antagonists that prevent signaling activation by Wnt ligands. The WIF1, SFRPs (domain Fzd-like C-terminal)

and cerberus proteins are able to bind to Wnt ligands preventing their interaction with receptors and co-receptors [65,66].

The canonical Wnt signaling pathway is involved in many cancers, notably in gastrointestinal cancers (colorectal carcinoma, hepatocellular carcinoma, gastric cancer, cholangiocarcinoma, pancreatic ductal adenocarcinoma), hematopoietic cancers (acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphoblastic leukemia, lymphoma, multiple myeloma), breast cancer, melanoma, and brain tumors such as glioblastoma [67,68]. Its involvement in the tumorigenesis of many cancerous diseases makes it an interesting target for cancer treatment. That is why recent reviews of the literature have described the latest advances in targeting this signaling pathway [55,69–73]. Some Wnt inhibitor molecules are in clinical trials, most of them in Phase I [74,75], although the ubiquitous nature of this signaling pathway and its involvement in various major physiological processes raise the question of the side effects of this strategy [76].

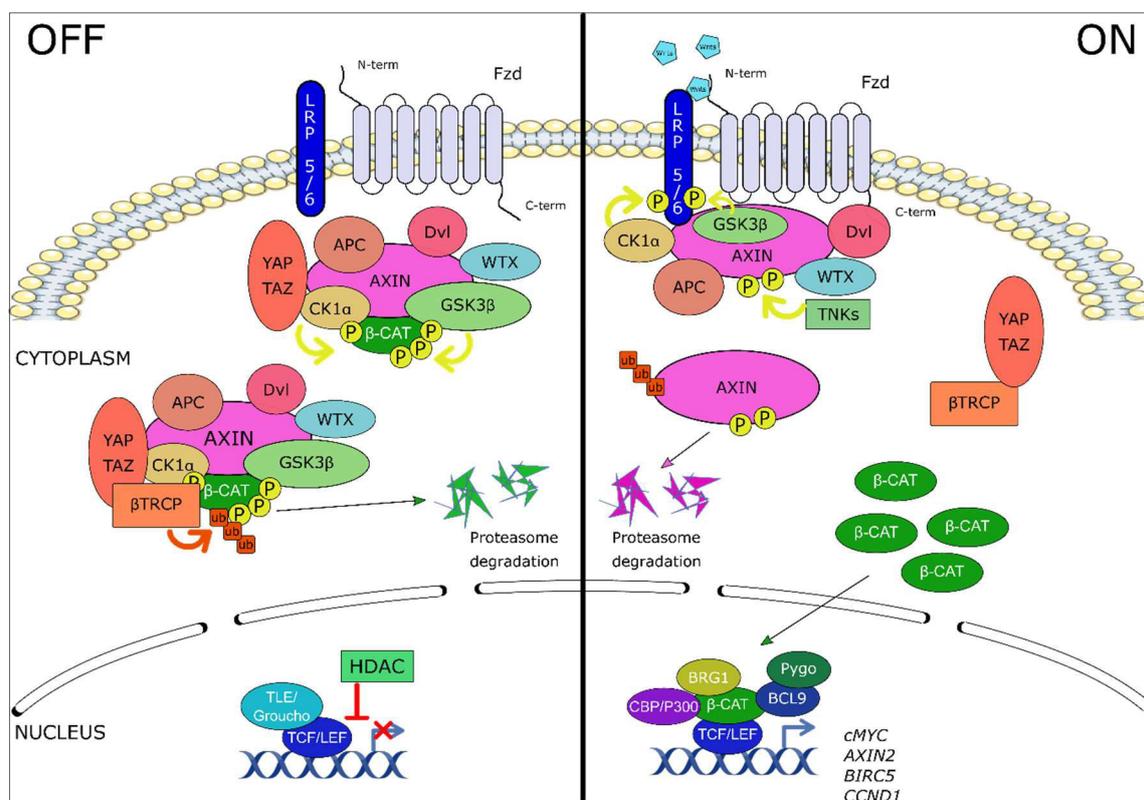


Figure 1. The canonical Wnt/β-catenin signaling pathway. Left panel: in the absence of Wnt ligand, β-catenin is sequestered by a protein complex composed of dishevelled (Dvl), adenomatous polyposis coli (APC), Axin1/2, Wilms tumor gene on X chromosome protein (WTX) and two kinases responsible for the phosphorylation of β-catenin, CK1α (casein kinase 1 alpha) and GSK3β (glycogen synthase kinase 3 beta). Then, YAP/TAZ (yes-associated protein/transcriptional co-Activator with a PDZ-binding domain) proteins recruit β-TrCP (beta-transducin-repeat-containing protein), a ubiquitin ligase responsible for the ubiquitination of β-catenin and its degradation by the proteasome pathway. In the nucleus, the transcriptional proteins of the TCF/LEF family (T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor) interact with the transcriptional repressors groucho/TLE (transducin-like enhancer of split), recruiting histone deacetylases (HDACs) responsible for repressing transcription. Right panel: Binding of the Wnt ligands to the frizzled (Fzd) receptor and low-density-lipoprotein-related protein 5/6 (LRP5/6) co-receptor complex induces the recruitment of the scaffold protein Dvl to Fzd and leads to LRP5/6 phosphorylation (P) by CK1α and GSK3β kinases. The β-catenin destruction complex is then trapped to the membrane through Axin/Fzd interaction, leading to its inactivation. In parallel, Axin proteins are degraded following poly-ADP-ribosylation by tankyrases (TNKS). Newly synthesized β-catenin

accumulates in the cytoplasm and translocates into the nucleus where it interacts with the transcription factors of the TCF/LEF family and with histones modifying co-activators p300 or CREB binding protein (CBP), B cell CLL/lymphoma 9 (BCL-9), brahma-related gene 1 (BRG1), and pygopus. These transcription complexes activate the transcription of target genes such as cMYC, AXIN2, BIRC5 or CCND1.

4. Key Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Osteosarcoma

The most recent researches on Wnt/ β -catenin implication in osteosarcoma deal with metastatic dissemination and recurrence that are associated with poor prognosis for patients. Thus, following a brief description of the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma development, this part will focus on these recent studies.

Canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been involved in the development of osteosarcoma but current knowledge remains unclear because of the high complexity of this pathway. Many studies support an aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma cells which seems to play a crucial role in tumorigenicity as well as metastatic dissemination [77,78]. As an example, two recent analyses on patient samples described a high β -catenin level in osteosarcoma tissues compared to adjacent healthy tissues associated with poor prognosis and lung metastatic dissemination [79,80] (Figure 2a). However, other studies highlighted that inactivation of the Wnt/ β -catenin pathway plays a key role in osteosarcoma development [81,82]. In particular, frequent deletions of genes involved in the Wnt signaling pathway genes have been described in osteosarcoma patients [83]. In this context, Shimozaki et al. showed that pharmacological inhibition or depletion of GSK3 β by siRNA decreases osteosarcoma cell proliferation despite an increased nuclear translocation of β -catenin and expression of its target genes supporting the tumor suppressor role of β -catenin [84]. However, to our knowledge, no additional recent study seems to support this second hypothesis.

A key issue of osteosarcoma metastasis is the epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like multi-step process, based on a transformation from an epithelial to a mesenchymal phenotype, promoting the invasive capacities of cancer cells. EMT is characterized by repression of key components of the intercellular junctions such as E-cadherin associated with an increase in mesenchymal markers including N-cadherin, vimentin and fibronectin. This modulation of gene expression is regulated by different transcription factors such as Snail-1, Snail-2, ZEB-1, ZEB-2 or Twist [85]. Despite the fact that osteosarcoma derives from cells of mesenchymal origin, an overexpression of EMT transcription factors such as Snails, ZEBs or Twist has been associated to increased invasive properties of osteosarcoma cells promoting the formation of metastases [86–89]. Transforming growth factor beta (TGF β) seems to be the main inducer of EMT in tumor cells [90], but cooperates with other signaling pathways including the Wnt/ β -catenin pathway to induce complete EMT [91]. Recent studies focusing on molecules implicated in EMT in osteosarcoma highlighted the implication of β -catenin in this biological process. Thus, Tian et al. have recently demonstrated that bone morphogenetic protein (BMP)-2 promotes EMT of osteosarcoma cells associated with enhanced motility and invasiveness through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [92]. Similarly, Fibulin-3, an extracellular glycoprotein, enhances EMT of osteosarcoma cells, associated with Wnt/ β -catenin pathway activation [93] (Figure 2a). Some other molecules implicated in osteosarcoma development and metastasis, such as ubiquitin-specific protease 7 and N-terminal truncated form of carboxypeptidase seem to exert their effects through induction of EMT in osteosarcoma cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [94,95]. These numerous recent studies demonstrate the interest to target Wnt/ β -catenin pathway in order to inhibit EMT in osteosarcoma cells.

EMT can also promote tumor cells to develop stem cell characteristics and consequently actively participate in the cancer stem cell (CSC) phenotype acquisition [96]. CSCs (also known as tumor-initiating cells or TIC) constitute a subpopulation of tumor cells with properties to self-renew and are responsible for tumor initiation and progression and, thanks to their chemotherapy resistance, seem to drive recurrences and metastases. CSCs are characterized by persistent activation of highly conserved signal transduction pathways including notch, hedgehog and Wnt pathways [97] and some evidence support the presence of CSCs in osteosarcoma and their contribution to metastatic

chemotherapy-resistant properties [98,99]. Martin-Neves et al. have described a constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signaling in osteosarcoma CSCs rather than in parental osteosarcoma cells [100]. More recently, Liu et al., highlighted that β -catenin positively regulates osteosarcoma stem cells properties in vitro [79] (Figure 2a). These results support evidence that a therapy against the Wnt/ β -catenin pathway in osteosarcoma could allow to target CSCs and potentially improve treatment for metastatic and chemotherapy-resistant patients.

New insights about the role of long non-coding RNA (lncRNA) and micro RNA (miR) in osteosarcoma progression have also recently emerged. On one hand, the overexpression of a number of miR has been demonstrated in osteosarcoma cells leading to increased osteosarcoma growth and metastasis. Most of these miRs downregulate antagonists of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. As an example, miR-552-5p is overexpressed in osteosarcoma tissues and cell lines compared to healthy tissue and osteoblasts respectively. Knockdown of this miR decreases osteosarcoma proliferation and metastasis by directly inhibiting WIF1 [101]. On the other hand, some miRs that are able to restrain the expression of key intermediates or regulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway have been described to be downregulated, causing an aberrant activation of this pathway in osteosarcoma cells. Very recent studies described a decrease in miR-377, miR-873, miR-758 and miR-885-5p in osteosarcoma tissues and/or cell lines, leading to increased primary tumor and metastatic development in association with activated Wnt/ β -catenin signaling pathway [102–105]. Other studies deal with lncRNA such as lncRNA AWPPH which levels are increased in osteosarcoma tissues compared to healthy counterparts and promote tumor proliferation and metastasis through activation of the Wnt/ β -catenin pathway [106].

In addition to β -catenin, other modulators of the canonical Wnt signaling pathway, in particular, Wnt antagonists, are affected during osteosarcoma primary and metastatic development, but have already been described in several reviews and will not be developed here [107,108].

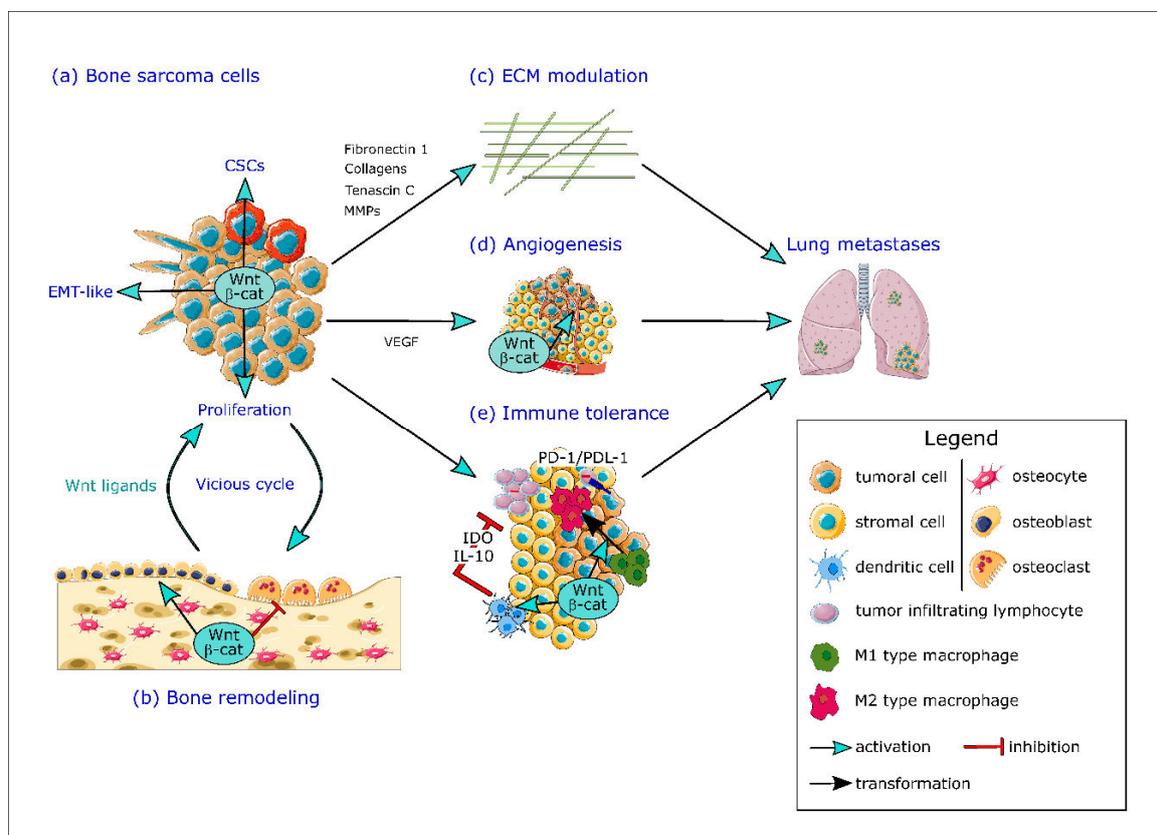


Figure 2. The crucial role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in multiple steps of bone sarcoma progression and metastatic dissemination. (a) The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway is able to enhance bone sarcoma cells proliferation, to induce an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like

through secretion of fibulin-3 and to promote the acquisition of stem cells properties of bone sarcoma cancer stem cells (CSCs). (b) The Wnt/ β -catenin pathway participates to the hijacking of the bone microenvironment by the bone sarcoma cells, leading to the establishment of a vicious cycle between bone remodeling and tumor cells proliferation associated with the release of pro-tumoral factors including Wnt ligands from the bone matrix. (c) The Wnt/ β -catenin pathway promotes the modulation of the extracellular matrix (ECM), increasing secretion of extracellular matrix components such as tenascin C, fibronectin 1 or collagens and stimulates the ECM degradation by upregulation of proteolytic enzymes such as MMPs. (d) The Wnt/ β -catenin pathway induces an over-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), the most important pro-angiogenic factor and is also able to modulate endothelial cell migration, leading to an increase in tumor-associated angiogenesis. (e) The Wnt/ β -catenin signaling pathway participates to the establishment of an immune tolerance in the TME, enhancing pro-tumoral M2 macrophages polarization and inhibiting cytotoxic T cell infiltration and functions and inducing resistance to anti-PD1 or anti-PDL-1 therapy. The activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in dendritic cells leads to up-regulation of interleukin-10 (IL-10) and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO) secretion leading to an inhibition of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) cytotoxic properties. By targeting both osteosarcoma and Ewing sarcoma cells and the bone TME, the Wnt/ β -catenin signaling pathway participates to the disease progression and the establishment of lung metastases.

5. Involvement of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Ewing Sarcoma

The involvement of the Wnt signaling pathway in Ewing sarcoma is less described than in osteosarcoma and seems to be controversial. First, no recurrent mutations in the Wnt/ β -catenin signaling pathway have been reported in Ewing sarcoma but the activation of this pathway has been demonstrated in aggressive sarcoma, the bone microenvironment being the source of Wnt ligands. Moreover, this activation can be potentiated through the R-spondin (RSPO)/leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)/ β -catenin axis. Indeed, LGR5 is highly expressed in aggressive Ewing sarcoma and CSCs and the binding of RSPO-2 on LGR5 was able to potentiate Wnt3a-induced canonical Wnt signaling. However, it seems that an important variability in Wnt responsiveness exists among Ewing sarcoma cells based on the differential expression of LGR5 and the availability of Wnt and RSPO ligands in the tumor microenvironment [109]. The proliferation of Ewing sarcoma cells is not affected by the Wnt/ β -catenin pathway activation [110]. However, this signaling pathway appears to play a crucial role in the cellular motility of Ewing sarcoma cells [111]. Thus, the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in Ewing sarcoma cells induces, on one hand, the formation of neurite outgrowth and, on the other hand, changes in transcriptional profile, leading to the acquisition of a more aggressive metastatic phenotype by tumor cells [109,112]. To go further, molecular mechanisms have been explored. Surprisingly, the activation of the Wnt/ β -catenin pathway partially antagonizes the transcriptional function of the fusion protein EWS/FLI1 (found in the majority of Ewing sarcomas), resulting in an up regulation of metastasis-promoting genes that are normally repressed by EWS/FLI1 and consequently, the acquisition of a more migratory phenotype. Inversely, some studies have shown that EWS/FLI1 inhibits β -catenin dependent transcription through a direct interaction between EWS/FLI1 and the transcription factor LEF1, inhibiting the interaction between β -catenin and LEF1 in Ewing sarcoma-cell lines [113]. To sum up, an inverse relationship between the expression of EWS/FLI1 and TCF/LEF target genes is observed in Ewing sarcoma cells [109,113].

The analysis of the secretome of Wnt3a-activated Ewing sarcoma cells has revealed an increased secretion of proteins implicated in the composition and the structure of the extracellular matrix. In details, Wnt3a-activated cells present an upregulation of the signaling pathways involved in the communication between the tumor and its microenvironment, such as integrin linked kinase, focal adhesion kinase, cadherin angiogenesis, TGF β and matrix metalloproteinase pathways [45].

Finally, the effects of WNT974, a Porcupine protein inhibitor involved in the palmitoylation of Wnt ligands, an indispensable process for Wnt secretion has been investigated in Ewing sarcoma. The WNT974-mediated inhibition of endogenous Wnt ligands secreted by tumor cells decreases the

migration of Ewing sarcoma cells in vitro, downregulating the expression of genes involved in cell migration. In addition, WNT974 appears to reduce the development of metastatic disease in vivo in a murine subcutaneous xenograft model and to delay the time of first lung metastasis establishment. WNT974 inhibits Wnt signaling pathways (canonical and non-canonical) and cell migration and dissemination, therefore demonstrated the role of the Wnt signaling pathway during Ewing sarcoma metastatic spread [114].

6. Wnt/ β -Catenin Pathway and the Bone Tumor Microenvironment

As described in the first part of the review, the bone TME is a complex and dynamic environment composed of both cellular and non-cellular components. This TME which includes bone, vascular and immune “niches” plays a key role in initiation, primary development and metastasis of osteosarcoma and Ewing sarcoma [115]. This part will focus on the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in these three “niches” of the bone TME.

6.1. Wnt/ β -Catenin Pathway and Bone Remodeling

Bone remodeling results from a balance between osteoclasts-mediated bone resorption and osteoblasts-promoted bone formation. Osteocytes, trapped in the bone matrix, also contribute to the regulation of osteoblast and osteoclast functions during bone remodeling. In this context, the Wnt/ β -catenin signaling pathway is able to modulate both osteoblast and osteoclast differentiation and activity. Indeed, osteoblasts and their precursors, osteocytes and osteoclasts are able to secrete various Wnt ligands which participate in the control of bone remodeling [116–118]. Briefly, the Wnt/ β -catenin signaling pathway directly enhances osteoblast differentiation and bone formation whereas indirectly represses osteoclast differentiation and bone resorption through the production of osteoprotegerin by osteoblasts and osteocytes. Nevertheless, osteoclasts are also affected by Wnt ligands given that β -catenin activation enhances the proliferation of osteoclast precursors but inhibits osteoclastogenesis at a later stage [66,116,119].

The early-stage development of osteosarcoma and Ewing sarcoma initiates a dysregulation of the bone remodeling in favor of an exacerbated bone resorption, leading to the release of pro-tumorigenic factors initially trapped into the bone tissue (Figure 2b). Nevertheless, the implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in tumor cell-induced bone osteolysis has mainly been described in bone metastasis rather than in bone sarcoma. Interestingly, in breast cancer bone metastases, the Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to be active inside the tumor with overexpression of canonical Wnt ligands (Wnt2 and Wnt8b), maintaining tumor cell proliferation. Conversely, Wnt2 and Wnt8b are downregulated at the tumor/bone interface while Wnt antagonists WIF1 and SFRP4 are overexpressed and could be responsible, at least in part, of suppression of osteoblast proliferation and enhanced bone destruction by osteoclasts [120]. Moreover, the DKK1 overexpression has been described in osteolytic breast cancer and could promote osteoclastogenesis and bone resorption at the site of metastasis [121]. To our knowledge, no studies compare the activation of the canonical Wnt signaling pathway between the bone sarcoma core and the bone/tumor interface.

An important step in the metastatic process of bone sarcoma is the degradation of the extracellular matrix related to upregulation of proteolytic enzymes such as MMPs. Several studies have highlighted that the invasive capacities of osteosarcoma cells are correlated with MMPs expression, particularly MMP-2 and MMP-9 [122]. Moreover, MMP-2 and/or MMP-9 expression can be associated with the development of metastasis, poor prognosis and resistance to chemotherapy in osteosarcoma patients [123–125]. It is also well established that MMP2 and MMP9 are expressed in Ewing sarcoma and closely associated with Ewing sarcoma invasion and metastasis [126,127]. β -catenin gene silencing by siRNA reduced invasion and motility of the U2OS human osteosarcoma cell line associated with inhibition of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) expression. On one hand, MT1-MMP directly degrades extracellular matrix components such as type II collagen or fibronectin and, on the other hand, activates by cleavage other members of the MMP family such as MMP-2. Moreover,

a dominant-negative soluble LPR5 reduces the expression of MMP-2 and MMP-14, consistent with a decrease in invasive properties of the human SaOS2 osteosarcoma cell line [128]. Thus, these results suggest that β -catenin inhibition may decrease osteosarcoma invasion through downregulation of MMPs expression and activation [129–131]. In Ewing sarcoma, the implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway does not seem to be predominant for the expression and activation of MMPs. However, in Ewing sarcoma, Wnt/ β -catenin activation-induced expression of tenascin C, a secreted extracellular matrix protein that plays a key role during metastasis establishment in different types of cancer [132]. High level of tenascin C contributes to the Ewing sarcoma metastatic phenotype, modulating tumor microenvironment [109]. Activation of the canonical Wnt pathway also leads to increased secretion of the extracellular matrix components such as fibronectin or collagens, that alter the biochemical and structural properties of the bone TME and can modulate the metastatic process of Ewing sarcoma [45] (Figure 2c).

6.2. Wnt/ β -Catenin Pathway, Angiogenesis and Hypoxia

Angiogenesis is a complex biological process that leads to new blood vessel development and plays a key role in primary tumor progression and metastatic potential of several cancers including bone sarcoma. Stages of angiogenesis include the proliferation and migration of endothelial cells to form a vessel sprout and then the recruitment of pericytes or smooth muscle cells to produce a mature and functional blood vessel [133]. This process is necessary for tumor growth allowing the supply of nutrients and metastatic dissemination, providing an intravasation site for cancer cells [133,134]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important pro-angiogenic factor involved in the formation of new functional vessels in tumors through recruitment and differentiation of endothelial progenitor cells [135].

Osteosarcoma patients with high VEGF expression levels exhibit both lower disease-free survival and lower overall survival [136]. Similarly, a genetic amplification of the *VEGFA* gene was detected in osteosarcoma and significantly associated with high microvessels density and low patient disease-free survival [137]. Several studies have also highlighted the importance of VEGF in angiogenesis of Ewing sarcoma. Indeed, high levels of VEGF have been detected in the serum of Ewing sarcoma patients and correlated with increased microvascular density and poor patient outcomes [135,138,139]. In particular, Ewing sarcoma cells produce several VEGF isoforms including soluble spliced isoform of VEGFA, VEGF-165, which promotes the recruitment of bone marrow derived cells. These cells can differentiate into both tumor-associated pericytes and endothelial cells, contributing to the new vasculature of Ewing sarcoma [140,141].

Regarding the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in angiogenesis, transcriptional regulation of VEGF by the β -catenin/TCF complex has been demonstrated, involving TCF binding sites in the *VEGF* gene promoter. Moreover, defects in APC, resulting in constitutively active β -catenin, induce the over-expression of VEGF [142,143]. Furthermore, the SFRPs proteins are a family of soluble Wnt inhibitors that act either through direct binding to Wnt proteins and preventing its interaction with Fzd receptors or through direct interaction with Fzd receptors [144]. First, endothelial cells seem to have a sequential response to SFRP-1 including an initial inhibition of angiogenesis by antagonizing the canonical Wnt signaling pathway followed by an activation of the non-canonical Wnt/PCP signaling pathway that promotes angiogenesis [145,146]. Second, a study has demonstrated that SFRP-4 induces a decrease in endothelial cell migration correlated with a reduction in tumor-associated angiogenesis in a mouse model of ovarian cancer [147]. All these studies highlighted the role of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in promoting angiogenesis (Figure 2d).

Only a few studies deal with the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in bone sarcoma-associated angiogenesis. Nevertheless, a study has described that naked cuticle homolog 2 (NKD2), a negative regulator of Wnt signaling, downregulates the expression of genes involved in the vasculature development of osteosarcoma [148], suggesting a pro-angiogenic role of

the Wnt/ β -catenin pathway in osteosarcoma. To our knowledge, the implication of this pathway on Ewing sarcoma-associated angiogenesis has not been described yet.

It is well recognized that hypoxia is an important regulator of angiogenesis during tumor development [149]. A major regulator of hypoxia is the transcription factor hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), composed of the oxygen regulated HIF-1 α subunit and the constitutively expressed HIF-1 β . Under the hypoxic TME, HIF-1 directly activates the transcription of pro-angiogenic genes including VEGF to promote angiogenesis [150,151] as demonstrated in osteosarcoma and Ewing sarcoma [152]. Thus, HIF-1 α silencing by siRNA reduces VEGF production by osteosarcoma cells in vitro and inhibits angiogenesis in a mouse model of osteosarcoma [153].

Besides its regulation of angiogenesis, hypoxia has been directly correlated to bone sarcoma progression, metastasis and patient prognosis. Thus, hypoxia enhances the expression and the transcriptional function of the fusion protein EWS/FLI1 in a HIF-1 α dependent-manner in Ewing sarcoma cells and consequently increases their invasiveness [154], HIF-1 α is also able to promote osteosarcoma cell proliferation and migration through activation of several signaling pathway including Akt and STAT3 signaling pathways [155,156]. Moreover, the expression of HIF-1 α has been correlated to the development of lung metastasis associated with poorer survival in osteosarcoma patients [157–159].

The implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in hypoxia has mainly been reported in carcinoma. As an example, hypoxia promotes β -catenin nuclear localization related to a more invasive phenotype in colorectal adenocarcinoma cells [160]. Moreover, β -catenin directly interacts with HIF-1 α to promote HIF-1 mediated transcription allowing an enhanced survival and adaptation to hypoxia of colon cancer cells [161]. Although the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to play a crucial role in hypoxia, only a few studies deal with its implication in the hypoxic TME of bone sarcoma. The most relevant one has described that inhibitors of the Wnt signaling pathway re-sensitizes osteosarcoma cells to doxorubicin under hypoxic conditions [162].

6.3. Wnt/ β -Catenin Pathway and the Immune System

The immune microenvironment of bone sarcomas is highly heterogeneous composed of effectors of the innate immunity such as natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC) and tumor-associated macrophages (TAMs) and cytotoxic T cells which drive adaptive immunity [33,35]. Nevertheless, immune and inflammatory infiltrates remain lower in Ewing sarcoma, limiting the development of immunotherapy [163].

Regarding innate immunity, bone sarcomas are mainly invaded by TAMs which have been associated with a good prognosis in osteosarcoma patients. However, as described above, it remains difficult to conclude about the role of M2-polarized macrophages in osteosarcoma progression, probably because of the difficulty to clearly identify the different TAMs subtypes in tumors and by the fact that, in contrast to the binary M1/M2 subtype, TAMs correspond to several distinct populations that often share features of both subtypes [164]. In Ewing sarcoma, a first study has initially described a correlation between macrophages infiltrate and poor prognosis but a second one did not observe any correlation between CD68⁺ macrophages and survival [39,40]. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to drive the polarization of macrophages in cancers. Indeed, hepatic tumor cells produce Wnt ligands that enhance M2 macrophages polarization through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, resulting in increased primary and metastatic tumor development [165] (Figure 2e).

T lymphocytes in cancer, also known as tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), correspond to the second most important immune cells in osteosarcoma [33,166]. TILs had higher cytotoxic capacities against tumor cells than peripheral lymphocytes but immunomodulatory molecules present in the TME prevent their expansion and activation. In particular, ligands of the B7 family are usually expressed by tumor cells in order to modulate T lymphocytes activities [167]. Osteosarcoma cells express HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2), PDL-1 and B7-H3, three members of the B7 proteins that contribute to local immunosuppression. HHLA2 expression has been associated with metastatic properties of osteosarcoma cells and poor survival of osteosarcoma patients [168,169]. The binding

of PDL-1, expressed by osteosarcoma cells to PD-1 on TILs induces the inhibition of their cytotoxic activities, contributing to local immunosuppression and consequently to tumor development. On the contrary, Ewing sarcoma does not constitutively express PDL-1 although its expression could be induced under inflammatory conditions [170]. Thus, only one case of the response of Ewing sarcoma to the blockade of PD-1/PDL-1 interaction has been described [171]. Finally, osteosarcoma cells also express B7-H3 which is correlated with tumor aggressiveness and metastasis [172,173]. In this context, Wnt/ β -catenin pathway activation in the TME seems to inhibit T cell infiltration and functions in several cancers [174,175]. Moreover, the active Wnt/ β -catenin signaling pathway has been associated with T cell exclusion leading to resistance to anti-PDL-1 therapy in human melanoma [176] (Figure 2e). Similarly, β -catenin activation enhances immune evasion and induces resistance to anti-PD1 therapy in hepatocellular carcinoma [177].

Another important point is that cross regulations between TAMs and TILs play a key role in osteosarcoma development. Thus, M2-polarized macrophages promote the suppression of TILs in osteosarcoma and, conversely, anti-PD1 therapy targeting TILs is able to stimulate a transition from M2 macrophages to M1 macrophages, leading to a decrease in lung metastases [41,178].

Finally, it seems important to note that, besides TAMs and TILs, the Wnt/ β -catenin pathway is able to modulate the proliferation, recruitment, and/or functions of the different effectors of the immune system and to regulate multiple aspects of the immune cells/tumor crosstalk. As an example, Wnt ligands secreted by tumor cells can activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway in DC, leading to up regulated interleukin-10 and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 secretion. This results in an increase in regulatory T cells inside the tumor and consequently an inhibition of TILs cytotoxic properties [179].

7. Conclusions

The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a crucial role during the different steps of bone sarcoma growth and the metastatic process, although its involvement has been more studied in osteosarcoma than in Ewing sarcoma. This pathway seems to promote bone sarcoma development through both a direct effect on bone sarcoma cells and an indirect modulation of the bone TME cell activities. Thus, aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma cells seems to be highly involved in cell proliferation, induction of an EMT-like process, acquisition of stem cells properties of osteosarcoma CSCs as well as metastatic dissemination. The Wnt/ β -catenin pathway activation does not affect the proliferation of Ewing sarcoma cells but appears to play a role in the cellular motility of these cells. The Wnt/ β -catenin pathway also participates to the hijacking of the bone TME by the bone sarcoma cells, promoting modulation of the ECM to allow the tumor cells invasiveness and inducing immune tolerance and angiogenesis in the TME. This results in an increase in metastatic dissemination.

The crucial role of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway is not restricted to bone sarcoma. That is why different therapeutic strategies targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancers have been developed. Corresponding clinical trials have been recently described in details in two reviews [67,174]. Briefly, they include inhibitors of porcupin, the enzyme responsible for palmitoylation of Wnt ligands, a necessary process to allow their extracellular secretion (LGK974 or WNT974), anti-Fzd antibodies (OMP18R5) or inhibitors of the β -catenin transcriptional complex (PRI724), mainly evaluated in patients with solid tumors.

The complexity of the Wnt signaling offers multiple targets to reduce β -catenin activation in tumor cells. However, better knowledge about the role of Wnt/ β -catenin in each tumor cell type, in particular, osteosarcoma and Ewing sarcoma, is necessary to safely target this pathway. It is also necessary to focus on crosstalks between the Wnt/ β -catenin and other signaling pathways during bone sarcoma growth and metastatic processes.

Author Contributions: All authors have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

Acknowledgments: The figures were produced with the support of Servier Medical Art (www.servier.com).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCL-9	B cell CLL/lymphoma 9
β -TrCP	beta-Transducin-repeat-Containing Protein
BRG1	Brahma-related gene 1
CBP	CREB (cAMP-Response Element Binding protein) binding protein
CCL	C-C motif ligand
CK1 α	Casein Kinase 1 alpha
CSC	Cancer Stem Cell
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DC	Dendritic cell
DKK	Dickkopf
Dvl	Dishevelled
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ETS	E26 Transformation-Specific
Fzd	Frizzled
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HDAC	histone deacetylase
HHLA2	HERV-H LTR-associating 2
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
IFN γ	Interferon γ
IGFBP4	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR5	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5
lncRNA	long non-coding RNA
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
miR	miRNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloproteinase
NK	Natural killer
NKD2	Naked cuticle homolog 2
PCP	Planar Cell Polarity
PD-1	Programmed cell Death 1
PDL-1	Programmed cell Death Ligand 1
PLOD2	Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2
ROR	Receptor tyrosine-kinase-like Orphan Receptor
RSPO	R-spondin
Ryk	Related to tyrosine kinase
SFRP	Secreted-Fzd-Related Protein
SOST	Sclerostin
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAF	Tumor Associated Fibroblast
TAM	Tumor Associated Macrophage
TAZ	Transcriptional co-Activator with a PDZ-binding domain
TCF	T-Cell Factor
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TLE	Transducin-Like Enhancer of split
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte

TME	Tumor MicroEnvironment
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WIF1	Wnt Inhibitory Factor 1
WTX	Wilms tumor gene on X chromosome
YAP	Yes-Associated Protein

References

- Ladenstein, R.; Pötschger, U.; Le Deley, M.C.; Whelan, J.; Paulussen, M.; Oberlin, O.; van den Berg, H.; Dirksen, U.; Hjorth, L.; Michon, J.; et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: Results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3284–3291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 229–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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* **2009**, *115*, 1531–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rodríguez-Galindo, C.; Navid, F.; Liu, T.; Billups, C.A.; Rao, B.N.; Krasin, M.J. Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann. Oncol.* **2008**, *19*, 814–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Strauss, S.J.; Whelan, J.S. Current questions in bone sarcomas. *Curr. Opin. Oncol.* **2018**, *30*, 252–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Delattre, O.; Zucman, J.; Plougastel, B.; Desmaze, C.; Melot, T.; Peter, M.; Kovar, H.; Joubert, I.; de Jong, P.; Rouleau, G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **1992**, *359*, 162–165. [[CrossRef](#)]
- Delattre, O.; Zucman, J.; Melot, T.; Garau, X.S.; Zucker, J.M.; Lenoir, G.M.; Ambros, P.F.; Sheer, D.; Turc-Carel, C.; Triche, T.J. The Ewing family of tumors—A subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 294–299. [[CrossRef](#)]
- Ginsberg, J.P.; de Alava, E.; Ladanyi, M.; Wexler, L.H.; Kovar, H.; Paulussen, M.; Zoubek, A.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Juergens, H.; Wunder, J.S.; et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing’s sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1809–1814. [[CrossRef](#)]
- Lu, P.; Weaver, V.M.; Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 395–406. [[CrossRef](#)]
- Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322. [[CrossRef](#)]
- Crenn, V.; Biteau, K.; Amiaud, J.; Dumars, C.; Guiho, R.; Vidal, L.; Nail, L.-R.L.; Heymann, D.; Moreau, A.; Gouin, F.; et al. Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: Retrospective analysis and preclinical modeling. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 2333–2349.
- Alfranca, A.; Martínez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Abarrategi, A.; Amaral, T.; de Alava, E.; Menendez, P.; Garcia-Castro, J.; Rodríguez, R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 3097–3113. [[CrossRef](#)]
- Klemm, F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 198–213. [[CrossRef](#)]
- Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437. [[CrossRef](#)]
- Jin, H.; Barrott, J.J.; Cable, M.G.; Monument, M.J.; Lerman, D.M.; Smith-Fry, K.; Nollner, D.; Jones, K.B. The Impact of Microenvironment on the Synovial Sarcoma Transcriptome. *Cancer Microenviron* **2017**, *10*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Goldstein, S.D.; Hayashi, M.; Albert, C.M.; Jackson, K.W.; Loeb, D.M. An orthotopic xenograft model with survival hindlimb amputation allows investigation of the effect of tumor microenvironment on sarcoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 703–715. [[CrossRef](#)]
- Riemann, A.; Schneider, B.; Gündel, D.; Stock, C.; Gekle, M.; Thews, O. Acidosis Promotes Metastasis Formation by Enhancing Tumor Cell Motility. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *876*, 215–220.

18. Chattopadhyay, S.; Chaklader, M.; Chatterjee, R.; Law, A.; Law, S. Differential expression of mitotic regulators and tumor microenvironment influences the regional growth pattern of solid sarcoma along the cranio-caudal axis. *Exp. Cell Res.* **2016**, *340*, 91–101. [[CrossRef](#)]
19. Lamoureux, F.; Richard, P.; Wittrant, Y.; Battaglia, S.; Pilet, P.; Trichet, V.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Pitard, B.; Heymann, D.; et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: Blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7308–7318. [[CrossRef](#)]
20. Picarda, G.; Matous, E.; Amiaud, J.; Charrier, C.; Lamoureux, F.; Heymann, M.-F.; Tirode, F.; Pitard, B.; Trichet, V.; Heymann, D.; et al. Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing's sarcoma by inhibiting RANKL. *J. Bone Oncol.* **2013**, *2*, 95–104. [[CrossRef](#)]
21. Taylor, R.; Knowles, H.J.; Athanasou, N.A. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J. Pathol.* **2011**, *225*, 195–202. [[CrossRef](#)]
22. Dass, C.R.; Choong, P.F.M. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3263–3270. [[CrossRef](#)]
23. Heymann, D.; Ory, B.; Blanchard, F.; Heymann, M.-F.; Coipeau, P.; Charrier, C.; Couillaud, S.; Thiery, J.P.; Gouin, F.; Redini, F. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **2005**, *37*, 74–86. [[CrossRef](#)]
24. Odri, G.A.; Dumoucel, S.; Picarda, G.; Battaglia, S.; Lamoureux, F.; Corradini, N.; Rousseau, J.; Tirode, F.; Laud, K.; Delattre, O.; et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7610–7619. [[CrossRef](#)]
25. Ory, B.; Heymann, M.-F.; Kamijo, A.; Gouin, F.; Heymann, D.; Redini, F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **2005**, *104*, 2522–2529. [[CrossRef](#)]
26. Han, Y.; Wu, C.; Wang, J.; Liu, N. CXCR7 maintains osteosarcoma invasion after CXCR4 suppression in bone marrow microenvironment. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 101042831770163. [[CrossRef](#)]
27. Li, Y.-J.; Dai, Y.-L.; Zhang, W.-B.; Li, S.-J.; Tu, C.-Q. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* **2017**, *17*, 59–69. [[CrossRef](#)]
28. Perissinotto, E.; Cavalloni, G.; Leone, F.; Fonsato, V.; Mitola, S.; Grignani, G.; Surrenti, N.; Sangiolo, D.; Bussolino, F.; Piacibello, W.; et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 490–497.
29. Cortini, M.; Massa, A.; Avnet, S.; Bonuccelli, G.; Baldini, N. Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166500. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Y.; Ma, Q.; Liu, T.; Guan, G.; Zhang, K.; Chen, J.; Jia, N.; Yan, S.; Chen, G.; Liu, S.; et al. Interleukin-6 suppression reduces tumour self-seeding by circulating tumour cells in a human osteosarcoma nude mouse model. *Oncotarget* **2016**, *7*, 446–458. [[CrossRef](#)]
31. Qi, J.; Zhou, Y.; Jiao, Z.; Wang, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, H.; Yang, L.; Zhu, H.; Li, Y. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 2242–2254. [[CrossRef](#)]
32. Wang, Y.; Chu, Y.; Yue, B.; Ma, X.; Zhang, G.; Xiang, H.; Liu, Y.; Wang, T.; Wu, X.; Chen, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23803–23816. [[CrossRef](#)]
33. Heymann, M.-F.; Lézot, F.; Heymann, D. The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma. *Cell. Immunol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
34. Noy, R.; Pollard, J.W. Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity* **2014**, *41*, 49–61. [[CrossRef](#)]
35. Gomez-Brouchet, A.; Illac, C.; Gilhodes, J.; Bouvier, C.; Aubert, S.; Guinebretiere, J.-M.; Marie, B.; Larousserie, F.; Entz-Werlé, N.; de Pinieux, G.; 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 from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1331193.

36. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.J.; Bürger, H.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.W.; Lankester, A.C.; 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.* **2011**, *17*, 2110–2119. [[CrossRef](#)]
37. Dumars, C.; Ngyuen, J.-M.; Gaultier, A.; Lanel, R.; Corradini, N.; Gouin, F.; Heymann, D.; Heymann, M.-F. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78343–78354. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, Q.; Xian, M.; Xiang, S.; Xiang, D.; Shao, X.; Wang, J.; Cao, J.; Yang, X.; Yang, B.; Ying, M.; et al. All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 547–559. [[CrossRef](#)]
39. Fujiwara, T.; Fukushi, J.; Yamamoto, S.; Matsumoto, Y.; Setsu, N.; Oda, Y.; Yamada, H.; Okada, S.; Watari, K.; Ono, M.; et al. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 1157–1170. [[CrossRef](#)]
40. Handl, M.; Hermanova, M.; Hotarkova, S.; Jarkovsky, J.; Mudry, P.; Shatokhina, T.; Vesela, M.; Sterba, J.; Zambo, I. Clinicopathological correlation of tumor-associated macrophages in Ewing sarcoma. *Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc* **2018**, *162*, 54–60. [[CrossRef](#)]
41. Han, Q.; Shi, H.; Liu, F. CD163(+) M2-type tumor-associated macrophage support the suppression of tumor-infiltrating T cells in osteosarcoma. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *34*, 101–106. [[CrossRef](#)]
42. Chang, C.-H.; Qiu, J.; O’Sullivan, D.; Buck, M.D.; Noguchi, T.; Curtis, J.D.; Chen, Q.; Gindin, M.; Gubin, M.M.; van der Windt, G.J.W.; et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **2015**, *162*, 1229–1241. [[CrossRef](#)]
43. Lewis, D.M.; Pruitt, H.; Jain, N.; Ciccaglione, M.; McCaffery, J.M.; Xia, Z.; Weber, K.; Eisinger-Mathason, T.S.K.; Gerecht, S. A Feedback Loop between Hypoxia and Matrix Stress Relaxation Increases Oxygen-Axis Migration and Metastasis in Sarcoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1981–1995. [[CrossRef](#)]
44. Itoh, H.; Kadomatsu, T.; Tanoue, H.; Yugami, M.; Miyata, K.; Endo, M.; Morinaga, J.; Kobayashi, E.; Miyamoto, T.; Kurahashi, R.; et al. TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* **2018**, *37*, 2903–2920. [[CrossRef](#)]
45. Hawkins, A.G.; Basrur, V.; da Veiga Leprevost, F.; Pedersen, E.; Sperring, C.; Nesvizhskii, A.I.; Lawlor, E.R. The Ewing Sarcoma Secretome and Its Response to Activation of Wnt/beta-catenin Signaling. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 901–912. [[CrossRef](#)]
46. Volchenboum, S.L.; Andrade, J.; Huang, L.; Barkauskas, D.A.; Krailo, M.; Womer, R.B.; Ranft, A.; Potratz, J.; Dirksen, U.; Triche, T.J.; et al. Gene expression profiling of Ewing sarcoma tumours reveals the prognostic importance of tumour–stromal interactions: A report from the Children’s Oncology Group. *J. Pathol. Clin. Res.* **2015**, *1*, 83–94. [[CrossRef](#)]
47. Sand, L.G.L.; Berghuis, D.; Szuhai, K.; Hogendoorn, P.C.W. Expression of CCL21 in Ewing sarcoma shows an inverse correlation with metastases and is a candidate target for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 995–1002. [[CrossRef](#)]
48. 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.; et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1070–1080. [[CrossRef](#)]
49. Paydas, S.; Bagir, E.K.; Deveci, M.A.; Gonlusen, G. Clinical and prognostic significance of PD-1 and PD-L1 expression in sarcomas. *Med. Oncol.* **2016**, *33*, 93. [[CrossRef](#)]
50. Lussier, D.M.; O’Neill, L.; Nieves, L.M.; McAfee, M.S.; Holechek, S.A.; Collins, A.W.; Dickman, P.; Jacobsen, J.; Hingorani, P.; Blattman, J.N. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *J. Immunother.* **2015**, *38*, 96–106. [[CrossRef](#)]
51. Shen, J.K.; Cote, G.M.; Choy, E.; Yang, P.; Harmon, D.; Schwab, J.; Nielsen, G.P.; Chebib, I.; Ferrone, S.; Wang, X.; et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 690–698. [[CrossRef](#)]
52. Sundara, Y.T.; Kostine, M.; Cleven, A.H.G.; Bovée, J.V.M.G.; Schilham, M.W.; Cleton-Jansen, A.-M. Increased PD-L1 and T-cell infiltration in the presence of HLA class I expression in metastatic high-grade osteosarcoma: A rationale for T-cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 119–128. [[CrossRef](#)]

53. Duchartre, Y.; Kim, Y.-M.; Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 141–149. [[CrossRef](#)]
54. Polakis, P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008052. [[CrossRef](#)]
55. Tai, D.; Wells, K.; Arcaroli, J.; Vanderbilt, C.; Aisner, D.L.; Messersmith, W.A.; Lieu, C.H. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist* **2015**, *20*, 1189–1198. [[CrossRef](#)]
56. Major, M.B.; Camp, N.D.; Berndt, J.D.; Yi, X.; Goldenberg, S.J.; Hubbert, C.; Biechele, T.L.; Gingras, A.-C.; Zheng, N.; Maccoss, M.J.; et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* **2007**, *316*, 1043–1046. [[CrossRef](#)]
57. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170. [[CrossRef](#)]
58. Kim, S.-E.; Huang, H.; Zhao, M.; Zhang, X.; Zhang, A.; Semonov, M.V.; MacDonald, B.T.; Zhang, X.; Garcia Abreu, J.; Peng, L.; et al. Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* **2013**, *340*, 867–870. [[CrossRef](#)]
59. Liu, C.; Li, Y.; Semenov, M.; Han, C.; Baeg, G.-H.; Tan, Y.; Zhang, Z.; Lin, X.; He, X. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* **2002**, *108*, 837–847. [[CrossRef](#)]
60. Robertson, H.; Hayes, J.D.; Sutherland, C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *147*, 77–92. [[CrossRef](#)]
61. Stamos, J.L.; Weis, W.I. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a007898. [[CrossRef](#)]
62. Chodaparambil, J.V.; Pate, K.T.; Hepler, M.R.D.; Tsai, B.P.; Muthurajan, U.M.; Luger, K.; Waterman, M.L.; Weis, W.I. Molecular functions of the TLE tetramerization domain in Wnt target gene repression. *EMBO J.* **2014**, *33*, 719–731. [[CrossRef](#)]
63. Li, V.S.W.; Ng, S.S.; Boersema, P.J.; Low, T.Y.; Karthaus, W.R.; Gerlach, J.P.; Mohammed, S.; Heck, A.J.R.; Maurice, M.M.; Mahmoudi, T.; et al. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* **2012**, *149*, 1245–1256. [[CrossRef](#)]
64. Lien, W.-H.; Fuchs, E. Wnt some lose some: Transcriptional governance of stem cells by Wnt/catenin signaling. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 1517–1532. [[CrossRef](#)]
65. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9–26. [[CrossRef](#)]
66. Baron, R.; Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: From human mutations to treatments. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 179–192. [[CrossRef](#)]
67. Ghosh, N.; Hossain, U.; Mandal, A.; Sil, P.C. The Wnt signaling pathway: A potential therapeutic target against cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1443*, 54–74. [[CrossRef](#)]
68. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–1473. [[CrossRef](#)]
69. Ishibashi, M. Screening for natural products that affect Wnt signaling activity. *J. Nat. Med.* **2019**, 1–9. [[CrossRef](#)]
70. Le, P.N.; McDermott, J.D.; Jimeno, A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *146*, 1–11. [[CrossRef](#)]
71. Tabatabai, R.; Linhares, Y.; Bolos, D.; Mita, M.; Mita, A. Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics. *Target Oncol.* **2017**, *12*, 623–641. [[CrossRef](#)]
72. Tran, F.H.; Zheng, J.J. Modulating the wnt signaling pathway with small molecules: Modulating the Wnt Signaling Pathway. *Protein Sci.* **2017**, *26*, 650–661. [[CrossRef](#)]
73. Zhang, X.; Hao, J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 2344–2360.
74. Harb, J.; Lin, P.-J.; Hao, J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 12. [[CrossRef](#)]
75. Krishnamurthy, N.; Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 50–60. [[CrossRef](#)]
76. Kahn, M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 513–532. [[CrossRef](#)]
77. Chen, C.; Zhao, M.; Tian, A.; Zhang, X.; Yao, Z.; Ma, X. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17570–17583. [[CrossRef](#)]

78. Iwaya, K.; Ogawa, H.; Kuroda, M.; Izumi, M.; Ishida, T.; Mukai, K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 525–529. [[CrossRef](#)]
79. Liu, W.; Zhao, Z.; Wang, Y.; Li, W.; Su, Q.; Jia, Q.; Zhang, J.; Zhang, X.; Shen, J.; Yin, J. Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/β-catenin signaling pathway. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 343. [[CrossRef](#)]
80. Lu, Y.; Guan, G.-F.; Chen, J.; Hu, B.; Sun, C.; Ma, Q.; Wen, Y.-H.; Qiu, X.-C.; Zhou, Y. Aberrant CXCR4 and β-catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 2123–2129. [[CrossRef](#)]
81. Cai, Y.; Mohseny, A.B.; Karperien, M.; Hogendoorn, P.C.W.; Zhou, G.; Cleton-Jansen, A.-M. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J. Pathol.* **2010**, *220*, 24–33. [[CrossRef](#)]
82. Cleton-Jansen, A.-M.; Anninga, J.K.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Romeo, S.; Oosting, J.; Egeler, R.M.; Gelderblom, H.; Taminiau, A.H.M.; Hogendoorn, P.C.W. Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumourigenic pathways. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1909–1918. [[CrossRef](#)]
83. Du, X.; Yang, J.; Yang, D.; Tian, W.; Zhu, Z. The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 450. [[CrossRef](#)]
84. Shimozaki, S.; Yamamoto, N.; Domoto, T.; Nishida, H.; Hayashi, K.; Kimura, H.; Takeuchi, A.; Miwa, S.; Igarashi, K.; Kato, T.; et al. Efficacy of glycogen synthase kinase-3β targeting against osteosarcoma via activation of β-catenin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77038–77051. [[CrossRef](#)]
85. Jie, X.-X.; Zhang, X.-Y.; Xu, C.-J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81558–81571. [[CrossRef](#)]
86. Lei, P.; Ding, D.; Xie, J.; Wang, L.; Liao, Q.; Hu, Y. Expression profile of Twist, vascular endothelial growth factor and CD34 in patients with different phases of osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 417–421. [[CrossRef](#)]
87. Sharili, A.-S.; Allen, S.; Smith, K.; Hargreaves, J.; Price, J.; McGonnell, I. Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumour Biol.* **2011**, *32*, 515–526. [[CrossRef](#)]
88. Shen, A.; Zhang, Y.; Yang, H.; Xu, R.; Huang, G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2012**, *105*, 830–834. [[CrossRef](#)]
89. Yang, G.; Yuan, J.; Li, K. EMT transcription factors: Implication in osteosarcoma. *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 697. [[CrossRef](#)]
90. Verrecchia, F.; Rédini, F. Transforming Growth Factor-β Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 133. [[CrossRef](#)]
91. Fuxe, J.; Vincent, T.; de Garcia Herreros, A. Transcriptional crosstalk between TGF-β and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2363–2374. [[CrossRef](#)]
92. Tian, H.; Zhou, T.; Chen, H.; Li, C.; Jiang, Z.; Lao, L.; Kahn, S.A.; Duarte, M.E.L.; Zhao, J.; Daubs, M.D.; et al. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteosarcoma growth by promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the Wnt/β-catenin signaling pathway. *J. Orthop. Res.* **2019**, *37*, 1638–1648. [[CrossRef](#)]
93. Wang, S.; Zhang, D.; Han, S.; Gao, P.; Liu, C.; Li, J.; Pan, X. Fibulin-3 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition and activating the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6215. [[CrossRef](#)]
94. Fan, S.; Gao, X.; Chen, P.; Li, X. Carboxypeptidase E-ΔN promotes migration, invasiveness, and epithelial-mesenchymal transition of human osteosarcoma cells via the Wnt-β-catenin pathway. *Biochem. Cell Biol.* **2018**, 1–8. [[CrossRef](#)]
95. Zeng, Q.; Li, Z.; Zhao, X.; Guo, L.; Yu, C.; Qin, J.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Yang, X. Ubiquitin-specific protease 7 promotes osteosarcoma cell metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 543–551. [[CrossRef](#)]
96. Cai, Z.; Cao, Y.; Luo, Y.; Hu, H.; Ling, H. Signalling mechanism(s) of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *483*, 156–163. [[CrossRef](#)]
97. Takebe, N.; Miele, L.; Harris, P.J.; Jeong, W.; Bando, H.; Kahn, M.; Yang, S.X.; Ivy, S.P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 445–464. [[CrossRef](#)]
98. Adhikari, A.S.; Agarwal, N.; Wood, B.M.; Porretta, C.; Ruiz, B.; Pochampally, R.R.; Iwakuma, T. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4602–4612. [[CrossRef](#)]

99. Siclari, V.A.; Qin, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *J. Orthop. Surg. Res.* **2010**, *5*, 78. [[CrossRef](#)]
100. Martins-Neves, S.R.; Corver, W.E.; Paiva-Oliveira, D.I.; van den Akker, B.E.W.M.; Briaire-de-Bruijn, I.H.; Bovée, J.V.M.G.; Gomes, C.M.F.; Cleton-Jansen, A.-M. Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4. *J. Cell. Physiol.* **2016**, *231*, 876–886. [[CrossRef](#)]
101. Cai, W.; Xu, Y.; Yin, J.; Zuo, W.; Su, Z. miR-552-5p facilitates osteosarcoma cell proliferation and metastasis by targeting WIF1. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17*, 3781–3788. [[CrossRef](#)]
102. Liu, Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Zhao, L.; Song, R.; Tan, H.; Wang, L. MicroRNA-873 targets HOXA9 to inhibit the aggressive phenotype of osteosarcoma by deactivating the Wnt/ β -catenin pathway. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 1809–1820. [[CrossRef](#)]
103. Liu, Y.; Bao, Z.; Tian, W.; Huang, G. miR-885-5p suppresses osteosarcoma proliferation, migration and invasion through regulation of β -catenin. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 1996–2004. [[CrossRef](#)]
104. Ren, J.; Yang, M.; Xu, F.; Chen, J. microRNA-758 inhibits the malignant phenotype of osteosarcoma cells by directly targeting HMGA1 and deactivating the Wnt/ β -catenin pathway. *Am. J. Cancer Res.* **2019**, *9*, 36–52.
105. Xia, P.; Gu, R.; Zhang, W.; Shao, L.; Li, F.; Wu, C.; Sun, Y. MicroRNA-377 exerts a potent suppressive role in osteosarcoma through the involvement of the histone acetyltransferase 1-mediated Wnt axis. *J. Cell. Physiol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
106. Li, C.; Wang, F.; Wei, B.; Wang, L.; Kong, D. LncRNA AWPPH promotes osteosarcoma progression via activation of Wnt/ β -catenin pathway through modulating miR-93-3p/FZD7 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514*, 1017–1022. [[CrossRef](#)]
107. Lin, C.H.; Ji, T.; Chen, C.-F.; Hoang, B.H. Wnt signaling in osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *804*, 33–45.
108. Pridgeon, M.G.; Grohar, P.J.; Steensma, M.R.; Williams, B.O. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2017**, *15*, 239–246. [[CrossRef](#)]
109. Pedersen, E.A.; Menon, R.; Bailey, K.M.; Thomas, D.G.; Van Noord, R.A.; Tran, J.; Wang, H.; Qu, P.P.; Hoering, A.; Fearon, E.R.; et al. Activation of Wnt/ β -catenin in Ewing sarcoma cells antagonizes EWS/ETS function and promotes phenotypic transition to more metastatic cell states. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5040–5053. [[CrossRef](#)]
110. Scannell, C.A.; Pedersen, E.A.; Mosher, J.T.; Krook, M.A.; Nicholls, L.A.; Wilky, B.A.; Loeb, D.M.; Lawlor, E.R. LGR5 is Expressed by Ewing Sarcoma and Potentiates Wnt/ β -Catenin Signaling. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 81. [[CrossRef](#)]
111. Uren, A.; Wolf, V.; Sun, Y.-F.; Azari, A.; Rubin, J.S.; Toretsky, J.A. Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **2004**, *43*, 243–249. [[CrossRef](#)]
112. Endo, Y.; Beauchamp, E.; Woods, D.; Taylor, W.G.; Toretsky, J.A.; Uren, A.; Rubin, J.S. Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 2368–2379. [[CrossRef](#)]
113. Navarro, D.; Agra, N.; Pestaña, A.; Alonso, J.; González-Sancho, J.M. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes β -catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 394–401. [[CrossRef](#)]
114. Hayashi, M.; Baker, A.; Goldstein, S.D.; Albert, C.M.; Jackson, K.W.; McCarty, G.; Kahlert, U.D.; Loeb, D.M. Inhibition of porcupine prolongs metastasis free survival in a mouse xenograft model of Ewing sarcoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78265–78276. [[CrossRef](#)]
115. Brown, H.K.; Schiavone, K.; Gouin, F.; Heymann, M.-F.; Heymann, D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif. Tissue Int.* **2018**, *102*, 174–195. [[CrossRef](#)]
116. Pederson, L.; Ruan, M.; Westendorf, J.J.; Khosla, S.; Oursler, M.J. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20764–20769. [[CrossRef](#)]
117. Westendorf, J.J.; Kahler, R.A.; Schroeder, T.M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* **2004**, *341*, 19–39. [[CrossRef](#)]
118. Zhong, Z.; Zylstra-Diegel, C.R.; Schumacher, C.A.; Baker, J.J.; Carpenter, A.C.; Rao, S.; Yao, W.; Guan, M.; Helms, J.A.; Lane, N.E.; et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2197–E2204. [[CrossRef](#)]
119. Weivoda, M.M.; Ruan, M.; Hachfeld, C.M.; Pederson, L.; Howe, A.; Davey, R.A.; Zajac, J.D.; Kobayashi, Y.; Williams, B.O.; Westendorf, J.J.; et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 65–75. [[CrossRef](#)]

120. Sadanandam, A.; Futakuchi, M.; Lyssiotis, C.A.; Gibb, W.J.; Singh, R.K. A cross-species analysis of a mouse model of breast cancer-specific osteolysis and human bone metastases using gene expression profiling. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 304. [[CrossRef](#)]
121. Bu, G.; Lu, W.; Liu, C.-C.; Selander, K.; Yoneda, T.; Hall, C.; Keller, E.T.; Li, Y. Breast cancer-derived Dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: Implication for breast cancer osteolytic bone metastases. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 1034–1042. [[CrossRef](#)]
122. Bjørnland, K.; Flatmark, K.; Pettersen, S.; Aaasen, A.O.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G.M. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J. Surg. Res.* **2005**, *127*, 151–156. [[CrossRef](#)]
123. Kunz, P.; Sähr, H.; Lehner, B.; Fischer, C.; Seebach, E.; Fellenberg, J. Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 223. [[CrossRef](#)]
124. Zhang, M.; Zhang, X. Association of MMP-2 expression and prognosis in osteosarcoma patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 14965–14970.
125. Zhou, J.; Liu, T.; Wang, W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma: A meta-analysis of 16 studies. *Medicine* **2018**, *97*, e13051. [[CrossRef](#)]
126. Mateo, E.C.; Motta, F.J.N.; de Paula Queiroz, R.G.; Scrideli, C.A.; Tone, L.G. Protein expression of matrix metalloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9 and -14) in Ewing family tumors and medulloblastomas of pediatric patients. *J. Pediatr. Genet.* **2012**, *1*, 181–187.
127. Ye, C.; Yu, X.; Liu, X.; Zhan, P.; Nie, T.; Guo, R.; Liu, H.; Dai, M.; Zhang, B. Beclin-1 knockdown decreases proliferation, invasion and migration of Ewing sarcoma SK-ES-1 cells via inhibition of MMP-9. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 3221–3225. [[CrossRef](#)]
128. Guo, Y.; Zi, X.; Koontz, Z.; Kim, A.; Xie, J.; Gorlick, R.; Holcombe, R.F.; Hoang, B.H. Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 964–971. [[CrossRef](#)]
129. Liu, B.; Li, G.; Wang, X.; Liu, Y. A furin inhibitor downregulates osteosarcoma cell migration by downregulating the expression levels of MT1-MMP via the Wnt signaling pathway. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1033–1038. [[CrossRef](#)]
130. Zhang, F.; Chen, A.; Chen, J.; Yu, T.; Guo, F. Influence of β -catenin small interfering RNA on human osteosarcoma cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **2011**, *31*, 353–358. [[CrossRef](#)]
131. Zhang, F.; Chen, A.; Chen, J.; Yu, T.; Guo, F. siRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2011**, *12*, 239–245.
132. Lowy, C.M.; Oskarsson, T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adh. Migr.* **2015**, *9*, 112–124. [[CrossRef](#)]
133. Olsen, J.J.; Pohl, S.Ö.-G.; Deshmukh, A.; Visweswaran, M.; Ward, N.C.; Arfuso, F.; Agostino, M.; Dharmarajan, A. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *Clin. Biochem. Rev.* **2017**, *38*, 131–142.
134. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 417–427. [[CrossRef](#)]
135. Mavrogenis, A.F.; Vottis, C.T.; Megaloikonomos, P.D.; Agrogiannis, G.D.; Theocharis, S. Neovascularization in Ewing's sarcoma. *Neoplasma* **2018**, *65*, 317–325. [[CrossRef](#)]
136. 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. *Tumour Biol.* **2013**, *34*, 1895–1899. [[CrossRef](#)]
137. Yang, J.; Yang, D.; Sun, Y.; Sun, B.; Wang, G.; Trent, J.C.; Araujo, D.M.; Chen, K.; Zhang, W. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer* **2011**, *117*, 4925–4938. [[CrossRef](#)]
138. Fuchs, B.; Inwards, C.Y.; Janknecht, R. Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1344–1353. [[CrossRef](#)]
139. Van der Schaft, D.W.J.; Hillen, F.; Pauwels, P.; Kirschmann, D.A.; Castermans, K.; Egbrink, M.G.A.O.; Tran, M.G.B.; Sciort, R.; Hauben, E.; Hogendoorn, P.C.W.; et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11520–11528. [[CrossRef](#)]
140. Reddy, K.; Zhou, Z.; Schadler, K.; Jia, S.-F.; Kleinerman, E.S. Bone marrow subsets differentiate into endothelial cells and pericytes contributing to Ewing's tumor vessels. *Mol. Cancer Res.* **2008**, *6*, 929–936. [[CrossRef](#)]

141. Reddy, K.; Cao, Y.; Zhou, Z.; Yu, L.; Jia, S.-F.; Kleinerman, E.S. VEGF165 expression in the tumor microenvironment influences the differentiation of bone marrow-derived pericytes that contribute to the Ewing's sarcoma vasculature. *Angiogenesis* **2008**, *11*, 257–267. [[CrossRef](#)]
142. Easwaran, V.; Lee, S.H.; Inge, L.; Guo, L.; Goldbeck, C.; Garrett, E.; Wiesmann, M.; Garcia, P.D.; Fuller, J.H.; Chan, V.; et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3145–3153.
143. Zhang, X.; Gaspard, J.P.; Chung, D.C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6050–6054.
144. Kawano, Y.; Kypka, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2627–2634. [[CrossRef](#)]
145. Dufourcq, P.; Leroux, L.; Ezan, J.; Descamps, B.; Lamazière, J.-M.D.; Costet, P.; Basoni, C.; Moreau, C.; Deutsch, U.; Couffinhal, T.; et al. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: Role in neovessel formation. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 37–49. [[CrossRef](#)]
146. Duplão, C.; Jaspard, B.; Moreau, C.; D'Amore, P.A. Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 1433–1445. [[CrossRef](#)]
147. Muley, A.; Majumder, S.; Kolluru, G.K.; Parkinson, S.; Viola, H.; Hool, L.; Arfuso, F.; Ganss, R.; Dharmarajan, A.; Chatterjee, S. Secreted frizzled-related protein 4: An angiogenesis inhibitor. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 1505–1516. [[CrossRef](#)]
148. Zhao, S.; Kurenbekova, L.; Gao, Y.; Roos, A.; Creighton, C.J.; Rao, P.; Hicks, J.; Man, T.-K.; Lau, C.; Brown, A.M.C.; et al. NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* **2015**, *34*, 5069. [[CrossRef](#)]
149. Liao, D.; Johnson, R.S. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 281–290. [[CrossRef](#)]
150. Forsythe, J.A.; Jiang, B.H.; Iyer, N.V.; Agani, F.; Leung, S.W.; Koos, R.D.; Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4604–4613. [[CrossRef](#)]
151. Krock, B.L.; Skuli, N.; Simon, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1117–1133. [[CrossRef](#)]
152. Zeng, W.; Wan, R.; Zheng, Y.; Singh, S.R.; Wei, Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* **2011**, *313*, 129–136. [[CrossRef](#)]
153. Zhang, X.-D.; Wu, Q.; Yang, S.-H. Effects of siRNA-mediated HIF-1 α gene silencing on angiogenesis in osteosarcoma. *Pak. J. Med. Sci.* **2017**, *33*, 341–346. [[CrossRef](#)]
154. Aryee, D.N.T.; Niedan, S.; Kauer, M.; Schwentner, R.; Bennani-Baiti, I.M.; Ban, J.; Muehlbacher, K.; Kreppel, M.; Walker, R.L.; Meltzer, P.; et al. Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells in vitro. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4015–4023. [[CrossRef](#)]
155. Zhang, D.; Cui, G.; Sun, C.; Lei, L.; Lei, L.; Williamson, R.A.; Wang, Y.; Zhang, J.; Chen, P.; Wang, A.; et al. Hypoxia promotes osteosarcoma cell proliferation and migration through enhancing platelet-derived growth factor-BB/platelet-derived growth factor receptor- β axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 360–366. [[CrossRef](#)]
156. Zhang, B.; Li, Y.-L.; Zhao, J.-L.; Zhen, O.; Yu, C.; Yang, B.-H.; Yu, X.-R. Hypoxia-inducible factor-1 promotes cancer progression through activating AKT/Cyclin D1 signaling pathway in osteosarcoma. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 1–9. [[CrossRef](#)]
157. Li, Y.; Zhang, W.; Li, S.; Tu, C. Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *Springerplus* **2016**, *5*, 1370. [[CrossRef](#)]
158. Wang, S.; Ren, T.; Huang, Y.; Bao, X.; Sun, K.; Shen, D.; Guo, W. BMPR2 and HIF1- α overexpression in resected osteosarcoma correlates with distant metastasis and patient survival. *Chin. J. Cancer Res.* **2017**, *29*, 447–454. [[CrossRef](#)]
159. Ren, H.-Y.; Zhang, Y.-H.; Li, H.-Y.; Xie, T.; Sun, L.-L.; Zhu, T.; Wang, S.-D.; Ye, Z.-M. Prognostic role of hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in osteosarcoma: A meta-analysis. *Onco Targets Ther.* **2016**, *9*, 1477–1487. [[CrossRef](#)]

160. Demir, R.; Dimmler, A.; Naschberger, E.; Demir, I.; Papadopoulos, T.; Melling, N.; Sturzl, M.; Hohenberger, W. Malignant progression of invasive tumour cells seen in hypoxia present an accumulation of beta-catenin in the nucleus at the tumour front. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *87*, 109–116. [[CrossRef](#)]
161. Kaidi, A.; Williams, A.C.; Paraskeva, C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 210–217. [[CrossRef](#)]
162. Scholten, D.J.; Timmer, C.M.; Peacock, J.D.; Pelle, D.W.; Williams, B.O.; Steensma, M.R. Down regulation of Wnt signaling mitigates hypoxia-induced chemoresistance in human osteosarcoma cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111431. [[CrossRef](#)]
163. Casey, D.L.; Lin, T.-Y.; Cheung, N.-K.V. Exploiting Signaling Pathways and Immune Targets Beyond the Standard of Care for Ewing Sarcoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 537. [[CrossRef](#)]
164. Qian, B.-Z.; Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **2010**, *141*, 39–51. [[CrossRef](#)]
165. Yang, Y.; Ye, Y.-C.; Chen, Y.; Zhao, J.-L.; Gao, C.-C.; Han, H.; Liu, W.-C.; Qin, H.-Y. Crosstalk between hepatic tumor cells and macrophages via Wnt/ β -catenin signaling promotes M2-like macrophage polarization and reinforces tumor malignant behaviors. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 793. [[CrossRef](#)]
166. Liu, T.; Fang, X.-C.; Ding, Z.; Sun, Z.-G.; Sun, L.-M.; Wang, Y.-L. Pre-operative lymphocyte-to-monocyte ratio as a predictor of overall survival in patients suffering from osteosarcoma. *FEBS Open Bio* **2015**, *5*, 682–687. [[CrossRef](#)]
167. Assal, A.; Kaner, J.; Pendurti, G.; Zang, X. Emerging targets in cancer immunotherapy: Beyond CTLA-4 and PD-1. *Immunotherapy* **2015**, *7*, 1169–1186. [[CrossRef](#)]
168. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Chinai, J.M.; Ewart, M.R.; Piperdi, S.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Fatakhova, Y.V.; Ghorpade, M.; et al. HHLA2, a member of the B7 family, is expressed in human osteosarcoma and is associated with metastases and worse survival. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31154. [[CrossRef](#)]
169. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30093. [[CrossRef](#)]
170. Spurny, C.; Kailayangiri, S.; Jamitzky, S.; Altvater, B.; Wardelmann, E.; Dirksen, U.; Harges, J.; Hartmann, W.; Rossig, C. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression is not a predominant feature in Ewing sarcomas. *Pediatr. Blood Cancer* **2018**, *65*, e26719. [[CrossRef](#)]
171. McCaughan, G.J.B.; Fulham, M.J.; Mahar, A.; Soper, J.; Hong, A.M.; Stalley, P.D.; Tattersall, M.H.N.; Bhadri, V.A. Programmed cell death-1 blockade in recurrent disseminated Ewing sarcoma. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 48. [[CrossRef](#)]
172. Wang, L.; Zhang, Q.; Chen, W.; Shan, B.; Ding, Y.; Zhang, G.; Cao, N.; Liu, L.; Zhang, Y. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70689. [[CrossRef](#)]
173. Yin, S.J.; Wang, W.J.; Zhang, J.Y. Expression of B7-H3 in cancer tissue during osteosarcoma progression in nude mice. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 14253–14261. [[CrossRef](#)]
174. Goldsberry, W.N.; Londoño, A.; Randall, T.D.; Norian, L.A.; Arend, R.C. A Review of the Role of Wnt in Cancer Immunomodulation. *Cancers* **2019**, *11*, 771. [[CrossRef](#)]
175. Luke, J.J.; Bao, R.; Sweis, R.F.; Spranger, S.; Gajewski, T.F. WNT/ β -catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3074–3083. [[CrossRef](#)]
176. Spranger, S.; Bao, R.; Gajewski, T.F. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **2015**, *523*, 231–235. [[CrossRef](#)]
177. De Ruiz Galarreta, M.; Bresnahan, E.; Molina-Sanchez, P.; Lindblad, K.E.; Maier, B.; Sia, D.; Puigvehi, M.; Miguela, V.; Casanova-Acebes, M.; Dhainaut, M.; et al. β -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discov.* **2019**. [[CrossRef](#)]
178. Dhupkar, P.; Gordon, N.; Stewart, J.; Kleinerman, E.S. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 2654–2664. [[CrossRef](#)]
179. Galluzzi, L.; Spranger, S.; Fuchs, E.; López-Soto, A. WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 44–65. [[CrossRef](#)]



4.7.6. Ciblage de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes

Au début de ces travaux de thèse (fin de l'année 2016), certaines études montraient les effets bénéfiques d'un ciblage de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le contexte pathologique des ostéosarcomes. En effet, des études *in vitro* dont l'objectif était de caractériser l'effet de certaines molécules végétales potentiellement thérapeutiques, ont révélé qu'elles pouvaient affecter la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans les lignées cellulaires d'ostéosarcome. Ces molécules (ex : Baicaléine, Curcumin) présentaient des effets anti-tumoraux associés à une diminution de la prolifération cellulaire, via un blocage du cycle cellulaire (phases G0/G1) et une augmentation de l'apoptose cellulaire. Les recherches sur leurs mécanismes d'action ont mis en évidence une diminution de l'expression de la β -caténine et de l'activité de la voie canonique de Wnt (Dai et al., 2017; He and Zhang, 2015; Leow et al., 2010; Liu et al., 2015a, 2013, 2014; Ma et al., 2015; Zou et al., 2015). Une inhibition des capacités migratoires et invasives des cellules d'ostéosarcome a également été observée et corrélée à une répression de la transcription des MMP-2 et MMP-9 consécutive à l'inhibition de la β -caténine (Leow et al., 2010, 2014; Liu et al., 2015a, 2013; Ma et al., 2015). La molécule PKF118-310, d'origine microbienne, montre également un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (via un blocage du cycle cellulaire en phases G2/M), ainsi que sur la migration et l'invasion des cellules d'ostéosarcome U2OS. Ces effets sont associés à une réduction de l'expression protéique nucléaire de la β -caténine, ainsi que des expressions protéiques de la CYCLINE D1, de cMYC et de la SURVIVINE (Leow et al., 2010). Le ciblage de protéines en lien avec la voie Wnt/ β -caténine peut également affecter le comportement des cellules d'ostéosarcome, *in vitro*. C'est le cas de la protéine Galectin-3, déjà identifiée comme pouvant potentialiser l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans certains types de cancers. Dans les cellules HOS, un siRNA dirigé spécifiquement contre l'ARNm de la Galectin-3, diminue l'expression protéique de la β -caténine, ainsi que la migration et l'invasion cellulaire (Park et al., 2015). De même, le ciblage par siRNA, de la protéine AHSA1 (activator of 90kDa heat shock protein ATPase homolog 1, protéine chaperonne de la heat shock protein HSP90), ralentit la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire et augmente l'apoptose des cellules MG63 et SaOS2. Ces effets sont corrélés à une augmentation de l'expression protéique des régulateurs de la voie canonique de Wnt, l'AXIN2 et GSK3 β et une diminution de l'expression protéique de la β -caténine (Shao et al., 2016).

Des petites molécules chimiques connues pour cibler directement la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ont montré un intérêt dans le traitement des cellules d'ostéosarcome *in vitro*. La molécule JW74 inhibe l'action des Tankyrases, bloquant ainsi la phosphorylation de l'AXIN2 et stimulant donc la dégradation de la β -caténine en stabilisant son complexe de dégradation. Le traitement des lignées d'ostéosarcome KPD, U2OS et SaOS2 avec la molécule JW74 diminue la prolifération cellulaire et stimule l'apoptose (Stratford et al., 2014). La molécule CGP049090, inhibant l'interaction entre la β -caténine et le facteur de transcription LEF1, diminue la viabilité cellulaire et augmente l'apoptose des cellules MG63, *in vitro*. Ces effets sont associés à une diminution de l'expression protéique de cMYC et de la CYCLINE D1, cibles transcriptionnelles de la β -caténine (Yao et al., 2016). Certains travaux de recherche font également état de l'action de molécules d'origine végétale ou bactérienne affectant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans des modèles précliniques murins d'ostéosarcome. Ces molécules permettent un ralentissement de la croissance tumorale en inhibant l'activité de la voie Wnt/ β -caténine (Liu et al., 2013, 2014; Tang et al., 2011).

Le ciblage de la voie Wnt/ β -caténine peut également être réalisé par surexpression des régulateurs négatifs tels que Dkk3 et Tiki2 dans les cellules d'ostéosarcome. La surexpression de ces deux régulateurs diminue l'expression nucléaire de la β -caténine et réprime l'activité de la voie Wnt/ β -caténine, *in vitro* (Hoang, 2004; Li et al., 2014). Dans ces conditions expérimentales, les cellules d'ostéosarcome prolifèrent moins vite, et leurs capacités migratoires et invasives sont réduites (Lin et al., 2013). *In vivo*, dans des modèles murins de xénogreffe obtenus par injection de cellules KHOS ou 143B surexprimant Dkk3 ou Tiki2, une inhibition de la croissance tumorale a pu être mise en évidence (Hoang, 2004; Li et al., 2014).

Une autre stratégie consiste à viser des acteurs de la voie Wnt/ β -caténine par une approche moléculaire qui permet de cibler non seulement la β -caténine, mais aussi les récepteurs de la voie Wnt/ β -caténine, ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans la transcription des gènes cibles de la β -caténine. Des siRNA spécifiquement dirigés contre la β -caténine ont été réalisés, mais dans la plupart des études citées ci-dessous, ce mode de ciblage de la β -caténine dans les ostéosarcomes est souvent utilisé pour évaluer l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans les effets observés, mais ne constitue pas le centre de l'étude. Seuls les travaux réalisés par Zhang et al. en 2011 se concentrent sur les effets d'une inhibition directe de la β -caténine par un siRNA dans des cellules d'ostéosarcome MG63 et montrent une diminution du potentiel invasif de ces cellules sans modulation de la prolifération cellulaire (Zhang et al., 2011b). Dans une étude plus récente, un si β -caténine induit l'inhibition de la viabilité cellulaire en augmentant l'apoptose des cellules MG63 (Yao et

al., 2016). Ces conclusions différentes quant à l'induction de l'apoptose dans des cellules MG63 transfectées avec un si β -caténine pourraient être liés à des taux de répression différents de la β -caténine en raison de la variabilité des séquences ciblant les ARNm de la β -caténine. Une diminution des capacités migratoires et invasives des cellules U2OS modifiées par un siRNA ciblant la β -caténine a également été observée, en association avec une diminution de l'expression protéique de MT1-MMP (métalloprotéase), mais sans effet sur la viabilité cellulaire (Zhang et al., 2011a). De même, les cellules HOS modifiées par un siRNA dirigé contre la β -caténine voient leur migration et invasion cellulaires inhibées, associées à la réduction de l'expression protéique des MMP-2 et 9, ainsi que du VEGF. Il a également été observé une diminution de l'expression protéique de la MMP-9, dans les cellules 143B transfectées avec un si β -caténine. L'expression d'un dominant négatif LRP5 (dnLRP5) dans des cellules SaOS2 permet de réprimer l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et diminue la migration et l'invasion cellulaire, *in vitro* (Hoang, 2004). Enfin, le ciblage des facteurs de transcription associés à la β -caténine (siLEF1 ou dnTCF4) ralentit la prolifération cellulaire de la lignée U2OS, via un blocage du cycle cellulaire en G0/G1 (Chen et al., 2015).

A la lecture de l'ensemble de ces études, il apparaît que le ciblage de la voie Wnt/ β -caténine est une piste intéressante pour optimiser les stratégies thérapeutiques dans les ostéosarcomes. Certains effets anti-tumoraux (anti-prolifératifs, anti-migratoires, anti-invasifs) observés lors de traitement de cellules d'ostéosarcome avec des molécules d'origine végétale ont pu être attribué, au moins en partie, à une répression de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. Mais finalement, il n'existe que peu d'études *in vitro* et *in vivo* ciblant spécifiquement des acteurs de la voie de signalisation canonique de Wnt dans les ostéosarcomes avec des inhibiteurs pharmacologiques.

Objectifs

Objectifs

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est impliquée dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes. Bien que certains auteurs aient mis en évidence une inactivation de cette voie de signalisation dans les cellules d'ostéosarcome, la majorité des études s'accordent sur le fait que l'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle primordial dans le développement de ces tumeurs. En effet, l'accumulation de β -caténine dans les cellules tumorales accroît leur potentiel prolifératif mais également migratoire et invasif, et donc la dissémination métastatique des cellules d'ostéosarcome et semble être corrélé à la présence de métastases chez les patients. Le traitement des patients présentant des métastases, majoritairement pulmonaires, est, à l'heure actuelle, un enjeu majeur car la survie globale de ces patients reste très faible. Comme décrit précédemment, l'intérêt du ciblage de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine a pu être mis en évidence dans les ostéosarcomes. Cependant, seules quelques études évaluent les effets d'inhibiteurs pharmacologiques, pourtant privilégiés à des approches moléculaires en clinique et aucun inhibiteur de la transcription dépendante de la β -caténine n'a encore été testé dans un modèle préclinique d'ostéosarcome. De plus, les molécules utilisées ciblent l'intégralité de l'activité de la voie de signalisation, engendrant des effets secondaires très importants sur le tissu osseux qui ont conduit à l'arrêt de plusieurs essais cliniques.

Dans ce contexte, le premier objectif de mon travail de thèse a été de **(1) caractériser les effets d'une molécule d'intérêt pour le ciblage de la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes, l'ICG-001**. Cette molécule très spécifique se fixe sur la protéine CBP au niveau de son site de liaison à la β -caténine et bloque ainsi la transcription dépendante du complexe incluant la β -caténine et CBP, sans agir au niveau des autres acteurs de la voie de signalisation qui pourraient être impliqués dans d'autres processus biologiques. Cet inhibiteur pharmacologique, dont les effets n'avaient jamais été évalué dans la pathologie des ostéosarcomes, montre de bons résultats dans d'autres types de cancers agressifs, notamment dans les adénocarcinomes pancréatiques. De plus, de par son mode d'action très ciblé, l'ICG-001 pourrait potentiellement permettre d'obtenir des effets bénéfiques sur la progression des ostéosarcomes, tout en préservant les patients des effets secondaires, tels que la fragilisation du tissu osseux, rencontrés lors d'un ciblage global de la voie Wnt/ β -caténine. Les effets de l'ICG-001 ont donc été évalués dans différentes lignées d'ostéosarcome ainsi que dans un modèle préclinique murin. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que, malgré une inhibition très forte de la prolifération des lignées cellulaires d'ostéosarcome *in vitro*, l'ICG-001 n'affecte pas la croissance tumorale dans un modèle

préclinique murin orthotopique de xénogreffe par injection de cellules humaines d'ostéosarcome KHOS. En revanche, de façon inattendue, l'ICG-001 augmente les propriétés migratoires des cellules KHOS, MG63 et SJSA1, et favorise la dissémination métastatique pulmonaire *in vivo*. Ces effets de l'ICG-001 qui n'avaient jamais été décrits dans la littérature nous ont amenés à nous poser de nouvelles questions sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine qui pouvaient se mettre en place dans les cellules d'ostéosarcome en réponse à l'ICG-001 et ainsi stimuler le développement métastatique des ostéosarcomes. Le second objectif de ce travail de thèse a donc découlé de ces premières observations et a consisté à **(2) déterminer les mécanismes de régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine pouvant être à l'origine des effets pro-migratoires et pro-métastatiques induits par l'ICG-001 dans les ostéosarcomes**. En se basant sur la littérature et les premiers résultats obtenus qui démontraient l'induction de l'expression de certains gènes cibles de la β -caténine tels que *PAI-1*, *cMYC*, *VEGF-A* en présence d'ICG-001, deux hypothèses de travail ont été émises. La première hypothèse propose un "switch" transcriptionnel d'un complexe composé de la β -caténine et de CBP vers un complexe transcriptionnel impliquant le cofacteur de transcription p300. En effet, la β -caténine ne pouvant plus interagir avec CBP pourrait alors se lier à son homologue p300, permettant la transcription de gènes cibles autres que ceux régulés par le complexe incluant la β -caténine et CBP (Figure 14A). La seconde hypothèse repose sur la formation d'un complexe transcriptionnel incluant la β -caténine et les protéines SMADs, des intermédiaires de la voie de signalisation du TGF β , qui joue un rôle pro-migratoire et pro-métastatique dans les ostéosarcomes (Figure 14B).

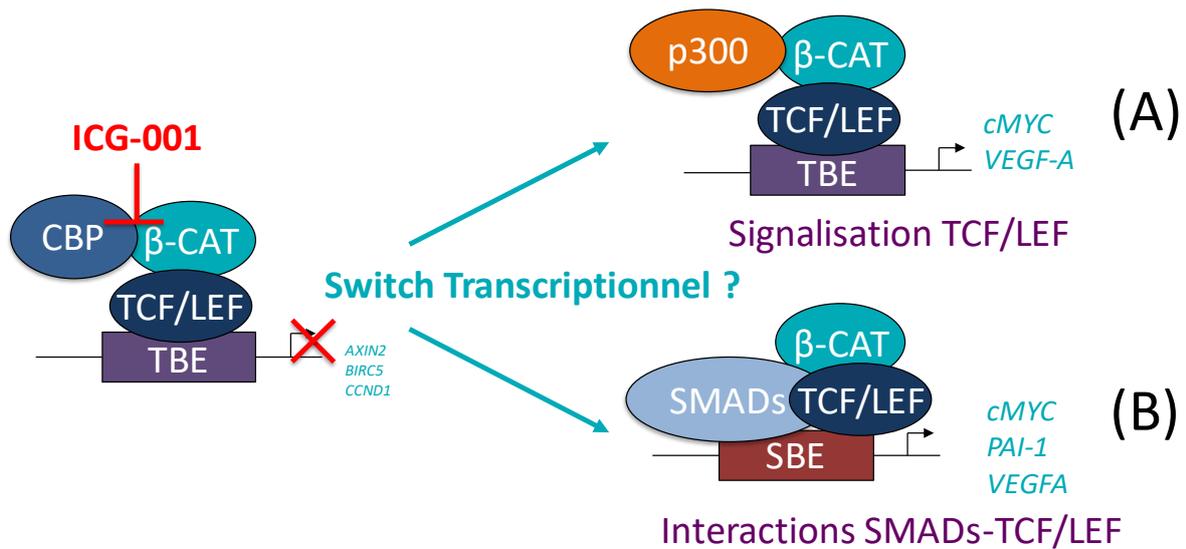


Figure 14 : Hypothèses émises afin d'expliquer les effets pro-migratoires de l'ICG-001. L'ICG-001 inhibe la transcription dépendante du complexe CBP/ β -caténine. **(A)** Cette inhibition pourrait favoriser la transcription dépendante des complexes p300/ β -caténine et ainsi activer la transcription des gènes cibles *cMYC* et *VEGF-A*. **(B)** La β -caténine libérée avec l'inhibition de l'interaction CBP/ β -caténine par l'ICG-001 pourrait favoriser la création de complexes transcriptionnels avec les protéines SMADs de la voie de signalisation canonique du TGF β . CBP : cAMP response element-binding protein ; SBE : SMADs Binding Element, région de fixation des facteurs de transcription SMADs. TBE : TCF/LEF Binding Element, région de fixation des facteurs de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor /Lymphoid Enhancer-binding Factor) ; β -CAT : β -caténine.

Résultats

Résultats

1. Résultats Partie 1 : Effets pro-migratoires et pro-métastatiques de l'ICG-001

1.1. Introduction

L'optimisation des stratégies thérapeutiques constitue un enjeu majeur pour les patients atteints d'ostéosarcome, et plus particulièrement pour ceux présentant des métastases pulmonaires qui sont associées à des taux de survie très faibles. C'est pourquoi, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la voie Wnt/ β -caténine qui joue un rôle clé dans la progression des ostéosarcomes. Plus particulièrement, nous avons évalué les effets d'un inhibiteur de la transcription dépendante de la β -caténine et de CBP, l'ICG-001.

L'ICG-001 est une petite molécule chimique qui inhibe spécifiquement l'interaction de la β -caténine avec son cofacteur de transcription CBP. L'ICG-001 se fixe au niveau des acides aminés de la région N-terminale (1-111) de la protéine CBP, mais pas sur son homologue p300, au niveau du site d'interaction avec la partie C-terminale de la β -caténine (Emami et al., 2004).

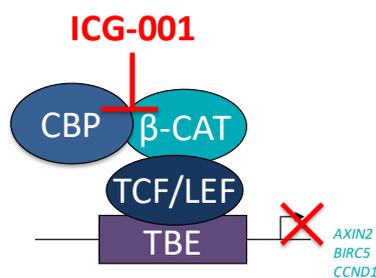


Figure 15 : Mode d'action de l'ICG-001. L'ICG-001 cible la protéine CBP au niveau du site de liaison avec la β -caténine, supprimant l'interaction entre ces deux cofacteurs de transcription. Par conséquent, l'ICG-001 inhibe la transcription dépendante de ce complexe. β -CAT : β -caténine ; CBP : CREB Binding Protein ; TCF : T-Cell Factor ; LEF : Lymphoid Enhancer-binding Factor. TBE : TCF/LEF Binding Element, région de fixation des facteurs de transcription TCF/LEF.

Cet inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine a déjà démontré des effets anti-cancéreux par l'inhibition de la transcription dépendante du complexe incluant la β -caténine et CBP. Ainsi, dans un modèle murin de cancer du côlon, l'ICG-001 est capable d'inhiber fortement la croissance tumorale (Emami et al., 2004), alors que dans d'autres types de tumeurs, comme le cancer du sein triple négatif (les cellules tumorales ne possèdent pas les récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone et le récepteur HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), son action passe par une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales au paclitaxel *in vitro* et *in vivo*, en inhibant les cellules souches cancéreuses (Ring et al., 2018). De façon similaire, l'ICG-001 permet d'inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de cancer gastrique ainsi que de diminuer leur résistance au cisplatine. L'effet anti-prolifératif de l'ICG-001 a également pu être observé dans un modèle *in vivo* avec un ralentissement de la croissance tumorale (Liu et al., 2017). Dans le carcinome hépatocellulaire, l'ICG-001 potentialise les effets pro-apoptotiques du Sorafénib, un inhibiteur de kinases utilisé dans la prise en charge des patients atteints de cancer du foie ou cancer du sein (Lin et al., 2016). L'ICG-001 a également été testé dans le cancer du pancréas où il diminue la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe d'une lignée cellulaire humaine de cancer pancréatique (Arensman et al., 2014). Ces études ont donc montré l'intérêt de cibler la transcription dépendante de la β -caténine et de CBP par l'ICG-001 dans un certain nombre de tumeurs solides. Des résultats similaires ont été obtenus dans les leucémies. Tout d'abord, dans le cas de la leucémie lymphoblastique aiguë, l'ICG-001 diminue la capacité d'auto-renouvellement des cellules (formation de clones), et les sensibilise aux agents de chimiothérapie *in vitro* (diminution de la viabilité cellulaire) et *in vivo* (Gang et al., 2014). Ensuite, l'ICG-001 augmente l'apoptose des cellules issues de patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques lors d'un traitement avec l'Imatinib, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase utilisé en clinique dans la prise en charge des leucémies. Enfin, la survie des souris traitées avec l'ICG-001 associé au Nilotinib (autre inhibiteur de l'activité tyrosine kinase utilisé dans la prise en charge des leucémies) est augmentée comparativement aux souris traitées uniquement avec le Nilotinib (Zhao et al., 2016).

Suite aux différentes études montrant l'intérêt de la molécule ICG-001 pour le ciblage de la voie Wnt/ β -caténine dans les cancers, une seconde génération d'antagoniste de l'interaction β -caténine/CBP a été développée afin d'obtenir une molécule moins toxique que l'ICG-001 pour la réalisation d'essais cliniques. Ainsi, 8 essais cliniques ont pu être développés avec le PRI-724, un isomère énantiomère de l'ICG-001, présentant une toxicité réduite. Parmi ces 8 essais cliniques, 5 essais cliniques ont été menés jusqu'à leur terme, 2 essais cliniques ont été stoppés (mais pas pour dangerosité du traitement PRI-724), et un essai clinique a débuté à la fin du mois d'août 2019. Il s'agit dans la majorité des cas

d'essais cliniques de phase I, ayant pour objectif de tester la toxicité du PRI-724 dans différentes conditions pathologiques. Le premier essai clinique de phase I avec le PRI-724 a eu lieu en 2011 mais a été arrêté en 2015 pour faute de recrutement suffisant (seulement 23 patients sur les 64 initialement prévus). Il avait pour objectif de tester la toxicité PRI-724 en association avec un agent de chimiothérapie et déterminer la dose maximale thérapeutique pour le cancer colorectal (NCT01302405). Un essai clinique de phase I (2013-2015), avec une vingtaine de patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques (avancés, inopérables, résistants à la chimiothérapie ou métastatiques), montre que l'association PRI-724 et gemcitabine n'est pas dangereuse pour le patient (NCT01764477). Des études de toxicité ont également été menées chez des patients atteints d'hépatites C ou de cirrhoses induites par des hépatites C pour évaluer la toxicité du PRI-724 (NCT02195440, NCT02828254). Le PRI-724 est très bien toléré à dose faible ou moyenne, mais à la dose maximale (160mg/m²/jour) des lésions hépatiques pourraient survenir (Kimura et al., 2017). De plus, une nouvelle étude de phases I/II pour des patients présentant des hépatites B et C ou des cirrhoses du foie a débuté en 2018, pour évaluer la toxicité et l'efficacité du PRI-724 dans la prise en charge thérapeutique (NCT03620474). Pour les patients atteints de pathologies myéloïdes avancées (leucémies myéloïdes chroniques et aiguës), un essai clinique de phase I/II a eu lieu de 2012 à 2016, afin de déterminer les doses limites de toxicité et d'efficacité du PRI-724 en combinaison avec les traitements standards (NCT01606579). Les résultats n'ont pas encore été publiés, peut-être en raison d'un nombre trop faible de patients inclus (49 inclus sur les 140 attendus), ne permettant pas de conclure quant à l'efficacité du PRI-724. Enfin, un nouvel essai clinique a débuté fin août 2019 pour tester la toxicité de l'OP-724 (autre nom du PRI-724) pour 12 patients atteints de cholangite biliaire primitive avec une fibrose, qui progresse (pathologie hépatique entraînant des lésions des conduits biliaires) (NCT04047160). Ces essais cliniques n'en sont qu'à des stades très précoces et, à l'heure actuelle, aucune conclusion sur l'efficacité du PRI-724 n'a pu être établie.

Au vu des résultats bénéfiques de l'ICG-001 sur le développement de cancers solides et de leucémies et du rôle primordial que joue la voie Wnt/ β -caténine dans la progression des ostéosarcomes, les effets de l'ICG-001 ont été analysés dans différentes lignées d'ostéosarcome ainsi que dans un modèle préclinique.

1.2. Article original

"ICG-001, an inhibitor of the β -Catenin and cAMP Response Element-Binding Protein Dependant Gene Transcription, Decrease Proliferation but Enhances Migration of Osteosarcoma Cells". Article original soumis en septembre 2019.

1 Article

2 **ICG-001, an Inhibitor of the β -Catenin and cAMP**
3 **Response Element-Binding Protein Dependent Gene**
4 **Transcription, Decreases Proliferation but Enhances**
5 **Migration of Osteosarcoma Cells.**

6 **Geoffroy Danieau**¹, **Sarah Morice**¹, **Sarah Renault**¹, **Régis Brion**^{1,2}, **Kevin Biteau**¹, **Jérôme**
7 **Amiaud**¹, **Marie Cadé**^{3,4}, **Dominique Heymann**^{3,4,5}, **Frédéric Lézot**¹, **Franck Verrecchia**¹,
8 **Françoise Rédini**¹ and **Bénédicte Brounais-Le Royer**^{1,*}

9 ¹Université de Nantes, INSERM, UMR1238, Phy-OS, Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés,
10 Nantes 44035, France

11 ²Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

12 ³Equipe Apoptose et Progression Tumorale, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes
13 Angers, CRCINA, INSERM, UMR1232, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes 44035, France

14 ⁴LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain 44800, France

15 ⁵European Associated Laboratory Sarcoma Research Unit, INSERM, University of Sheffield, Sheffield S10
16 2TN, UK

17 * Correspondence: benedicte.brounais@univ-nantes.fr

18 Received: date; Accepted: date; Published: date

19 **Abstract:** High-grade osteosarcomas are the most frequent malignant bone tumors in the pediatric
20 population, with 150 patients diagnosed every year in France. Osteosarcomas are associated with
21 low survival rates for high risk patients (metastatic, relapsed disease). Knowing that the canonical
22 Wnt signaling pathway (Wnt/ β -catenin) plays a complex but a key role in primary and metastatic
23 development of osteosarcoma, the aim of this work was to analyze the effects of ICG-001, a CBP/ β -
24 catenin inhibitor blocking the β -catenin dependent gene transcription, in three human osteosarcoma
25 cell lines (KHOS, MG63 and SJA1). The cell proliferation and migration were first evaluated in
26 vitro after ICG-001 treatment. Secondly, a mouse model of osteosarcoma was used to establish the
27 in vivo biological effect of ICG-001 on osteosarcoma growth and metastatic dissemination. In vitro,
28 ICG-001 treatment strongly inhibits osteosarcoma cell proliferation through a cell cycle blockade in
29 the G0/G1 phase, but surprisingly, increases cell migration of the three cell lines. Moreover, ICG-
30 001 does not modulate tumor growth in the osteosarcoma mouse model but, rather significantly
31 increases the metastatic dissemination to lungs. Taken together, these results highlight, despite an
32 anti-proliferative effect, a deleterious pro-migratory role of ICG-001 in osteosarcoma.

33 **Keywords:** osteosarcoma; β -catenin; proliferation; migration; ICG-001

34

35 **1. Introduction**

36 High-grade osteosarcomas are the most frequent malignant bone tumors in the pediatric
37 population, with 150 patients diagnosed every year in France [1]. Osteosarcoma affects mainly
38 children and adolescents with a peak of incidence around 18 years. Current standard therapeutic
39 approaches include conservative surgery associated with poly-chemotherapy. However, patient
40 survival has not evolved for the past decades and remains closely related to the response of tumor
41 cells to chemotherapy, reaching 70% at 5 years for patients with localized forms while less than 30%
42 in metastatic diseases and patients resistant to chemotherapy [2–5].

The Wnt proteins constitute a large family of highly conserved secreted glycoproteins that bind to receptors encoded by the frizzled (Fzd) genes. The complexity of the Wnt signaling pathways relies on the fact that 19 Wnt ligands and 10 Fzd receptors have been identified with transduction of their signals through both canonical and non canonical pathways [6]. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been well characterized. In the absence of Wnt ligands, β -catenin is phosphorylated by Casein Kinase 1 α (CK1 α) and Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), both present in a destruction complex that also includes Adenomatous Polyposis Coli (APC) and Axin-2, which leads to β -catenin proteasomal degradation [7]. Following the interaction of Wnt ligands with Fzd receptors which forms a complex with low-density lipoprotein receptor related protein (LRP)-5/6 co-receptor, unphosphorylated β -catenin accumulates and translocates into the nucleus. Then, β -catenin associates to members of the T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) family and transcriptional co-activators such cAMP response element-binding protein (CBP) or p300 in order to induce the transcription of various target genes such as CYCLIN D1 or c-MYC [8].

The Wnt signaling pathways regulate important cellular processes including cell proliferation, differentiation, migration or polarity and have been involved in many forms of human cancers with complex roles, as promotion or inhibition of tumor initiation, growth or metastasis depending on cancer-stage and type [9,10]. Some studies have focused on the role of Wnt signaling pathways in osteosarcoma development, but current knowledge remains controversial. Indeed, aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway has been highlighted in osteosarcoma cells and seems to be responsible for increased tumorigenicity and proliferation of these cells as well as their metastatic dissemination [11,12]. Thus, high β -catenin levels have been recently reported in osteosarcoma tissues compared to adjacent healthy ones associated with poor prognosis and lung metastatic dissemination [13,14]. However, other studies demonstrated that inactivation of the Wnt/ β -catenin pathway plays a key role in osteosarcoma development. In particular, frequent deletions of genes involved in the Wnt signaling pathway have been described in osteosarcoma patients [15,16]. These different data highlight the complexity of the Wnt pathway regulation during primary and metastatic development of osteosarcoma, which constitutes a substantial obstacle to therapeutic targeting of this pathway. Nevertheless, most of data seems to sustain a pro-tumoral role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway during osteosarcoma development allowing to hypothesize that inhibiting β -catenin activity should represent a therapeutic strategy in osteosarcoma.

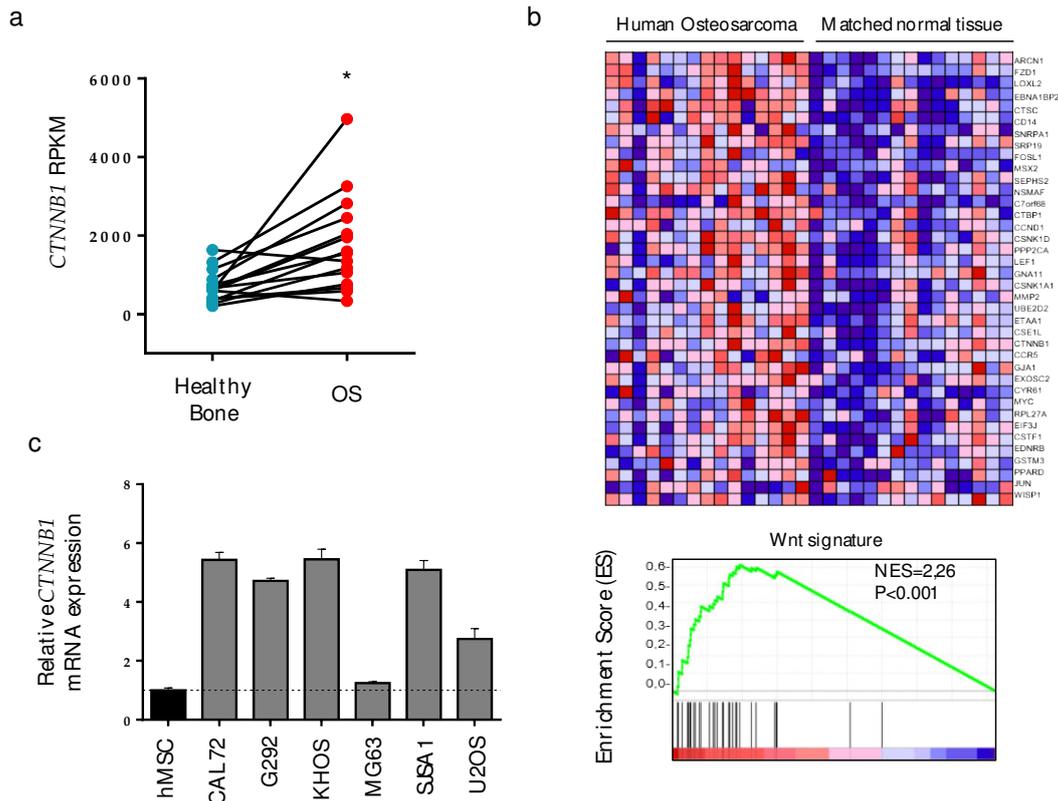
The aim of this work was so to determine the implication of the β -catenin dependent gene transcription in the primary and metastatic development of osteosarcoma. Thus, the effect of ICG-001, a CBP/ β -catenin inhibitor which blocks the β -catenin dependent gene transcription, was evaluated in three human osteosarcoma cell lines, KHOS, MG63 and SJSA-1. ICG-001 treatment strongly inhibits osteosarcoma cell proliferation through a cell cycle blockade in the G0/G1 phase, but, surprisingly increases cell migration of the three cell lines in vitro. Despite a beneficial effect on cell proliferation in vitro, ICG-001 does not modulate tumor growth in vivo, using a mouse model of osteosarcoma, but significantly increases metastatic dissemination to lungs, confirming a pro-migratory role of ICG-001 on osteosarcoma cells.

2. Results

2.1. Osteosarcoma cell lines expressing high β -catenin levels are sensitive to ICG-001.

Based on the literature, the canonical Wnt signaling pathway plays a complex role in the development of osteosarcoma. Indeed, some data described an oncogenic role of the canonical Wnt signaling pathway whereas some other studies highlighted an anti-tumorigenic role of this pathway in osteosarcoma patients. Thus, in order to provide recent data about the activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma, a published RNA-seq study (GSE99671) including 15 paired samples of patients (15 osteosarcoma and 15 healthy bone paired samples) was analyzed for β -catenin expression [17]. This analysis of paired samples highlighted that β -catenin mRNA level was significantly increased in osteosarcoma biopsies compared to healthy bone (Figure 1A). Consistently, Gene set enrichment analysis (GSEA) of expression data obtained from the same cohort of patients

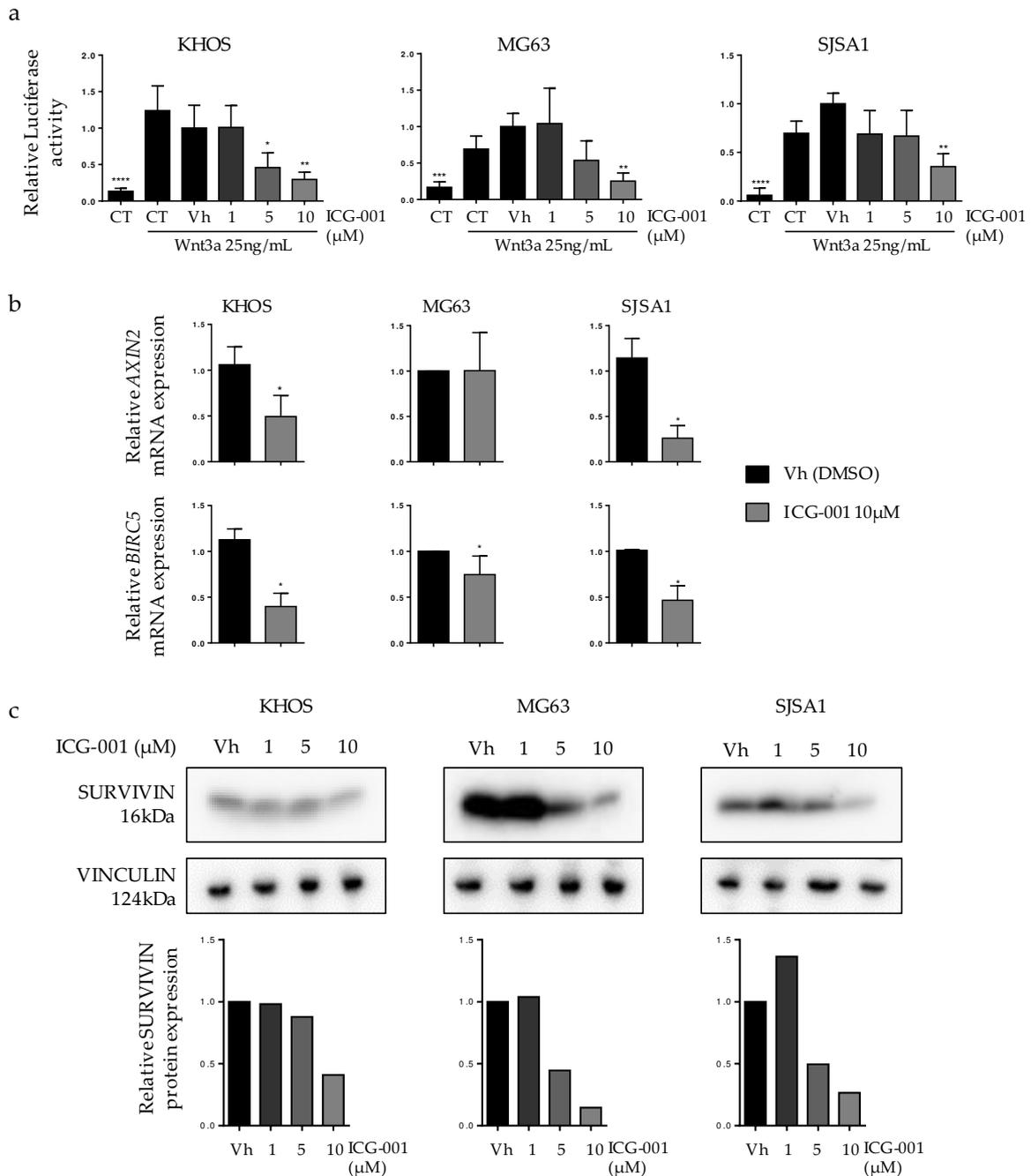
93 revealed a Wnt signature in osteosarcoma samples as compared to healthy bone samples from the
 94 same patient (Figure 1B). β -catenin mRNA expression was also evaluated in 6 human osteosarcoma
 95 cell lines. As indicated in Figure 1C, high levels of β -catenin mRNA are observed in all tested
 96 osteosarcoma cells, excepted MG63 cells, as compared to human mesenchymal stem cells (MSCs), in
 97 favor of an aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma. Based on
 98 these data, the effects of ICG-001, a CBP/ β -catenin inhibitor, was investigated in three human
 99 osteosarcoma cell lines, KHOS, MG63 and SJS1.



100
 101 **Figure 1. Osteosarcoma cells and tissues overexpressed β -catenin and its target genes.** (a) Relative
 102 *CTNNB1* gene expression in Reads Per Kilo base per Million (RPKM) in osteosarcoma (OS) samples
 103 and healthy bone tissues following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (N=15 paired
 104 patients). *, p<0.05. (b) Heatmap showing color-coded expression of Wnt target genes in osteosarcoma
 105 patients and healthy bone tissue from the same patients following bioinformatics analysis of RNAseq
 106 data GSE99671 (N=15 paired patients). High expression is represented in red and low expression in
 107 blue (upper panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis showing a significant upregulation
 108 of Wnt target genes in osteosarcoma tissues compared to paired healthy bone tissues Color scales are
 109 based on Z-scores. (lower panel). (c) Relative *CTNNB1* gene expression in osteosarcoma cell lines
 110 compared to human Mesenchymal Stem Cells (hMSC). Bars indicate means \pm SD of relative and
 111 normalised *CTNNB1* mRNA expression determined by RT-qPCR (N=1, performed in triplicate).

112 The efficiency of ICG-001 was first evaluated by TCF/LEF luciferase gene reporter assay in
 113 KHOS, MG63 and SJS1 cells. ICG-001 dose-dependently decreased Wnt3a-induced TCF/LEF
 114 dependent luciferase activity in the three cell lines (Figure 2A). KHOS cells seemed to be the most
 115 sensitive cells to ICG-001 with a significant decrease of luciferase activity from 5 μ M whereas a dose
 116 of 10 μ M was necessary to observe a significant inhibition of luciferase activity in MG63 and SJS1
 117 cells. Moreover, ICG-001 significantly diminished mRNA expression of two β -catenin target genes,
 118 *AXIN2* and *BIRC5* in KHOS and SJS1 cells with an inhibition higher than 50%. Only *BIRC5* mRNA

119 level was significantly decreased by 25% in MG63 cells that seem to be less sensitive to ICG-001,
 120 perhaps because of a lower β -catenin over-expression compared to KHOS and SJSA1 cells (Figure
 121 2B). Moreover, Survivin protein level, encoded by *BIRC5* gene, was decreased after 48h of ICG-001
 122 treatment as analyzed by relative quantification of Survivin protein expression after Western Blot
 123 (Figure 2C). Taken together, these data revealed that ICG-001 inhibits the canonical Wnt signaling
 124 pathway in osteosarcoma cells.
 125



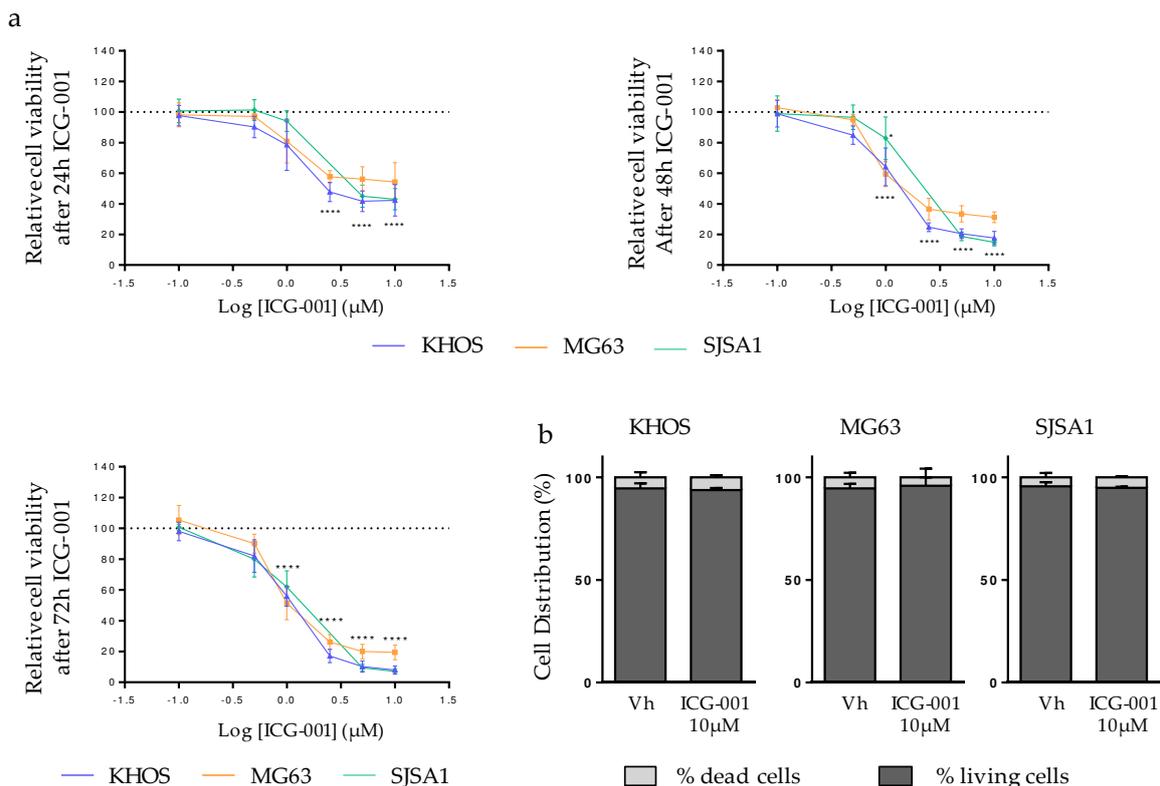
126

127 **Figure 2. ICG-001 inhibits β -catenin dependent transcription in KHOS, MG63 and SJSA1**
 128 **osteosarcoma cell lines. (a)** Relative Luciferase Firefly/Renilla activity ratio in cells co-transfected
 129 with TOPFLASH and pRL-TK constructs and treated or not (CT) with Vehicle (Vh) or ICG-001 (1 to
 130 10 μ M). Wnt3a 25ng/mL was added 1 hour after ICG-001 treatment for a period of 24 hours. Bars
 131 represent means \pm SD of at least 3 independent experiments, each performed in duplicate. *, $p < 0.05$;
 132 **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ vs Vehicle. (b) Relative and normalised AXIN2 (upper panel) or
 133 *BIRC5* (lower panel) gene expression determined by RT-qPCR in cells treated with Vehicle (Vh) or

134 10 μ M of ICG-001 during 24 hours. Bars represent means \pm SD (N \geq 3, performed in duplicate). *, p<0.05
 135 vs Vehicle. (c) SURVIVIN and VINCULIN protein level evaluated by Western Blot in cells treated
 136 with Vehicle (Vh) or ICG-001 (1-10 μ M) during 48 hours (upper panel with one representative
 137 experiment of three independent experiments). Relative SURVIVIN protein quantification,
 138 normalised with VINCULIN protein expression (lower panel).

139 2.2. ICG-001 induced a cell cycle blockade in the G0/G1 phase in osteosarcoma cells.

140 To investigate the effects of β -catenin inhibition on osteosarcoma cell viability, cells were treated
 141 with increasing doses of ICG-001 for 24h, 48h and 72h and viable cells were analyzed by Cristal Violet
 142 staining. ICG-001 decreased osteosarcoma cell viability in a time and dose dependent manner with
 143 IC₅₀ of 0.83 μ M, 1.05 μ M and 1.24 μ M at 72h for KHOS, MG63 and SJSA1 respectively (Figure 3A and
 144 Table 1). After 72h of ICG-001 treatment, less than 20% of MG63 cells were still viable and less than
 145 8% of KHOS and SJSA1 as compared to untreated cells. To complete these results, cell death was
 146 analyzed after 72h of ICG-001 treatment by Trypan Blue Counting. ICG-001 did not significantly
 147 modify the proportion of dead cells which remained between 4.1 and 6.3% whatever the treated cell
 148 line, suggesting that the decrease in viable cells under ICG-001 treatment was due to an inhibition of
 149 cell proliferation rather than an induction of cell death (Figure 3B). To confirm that ICG-001 did not
 150 induce cell death by apoptosis, a caspase-3 activity assay was performed, together with PARP
 151 cleavage analysis by Western Blot in KHOS cells. ICG-001 was not able to induce either caspase-3
 152 activity or PARP cleavage, confirming that ICG-001 treatment only induced an inhibition of cell
 153 proliferation without induction of apoptosis (data not shown).



154

155 **Figure 3. ICG-001 decreases KHOS, MG63 and SJSA1 osteosarcoma cells viability.** (a) Cell viability
 156 analysed in cells treated with ICG-001 or vehicle (Vh) from 0.1 to 10 μ M for 24, 48 or 72 hours. At the
 157 end points, cells were stained with crystal violet and the curves represent the means \pm SD relativized
 158 with the value of the vehicle, of at least 5 independent experiments, each performed in triplicate. The
 159 dashed line represents the vehicle value set to 100. *, p<0.05; ***, p<0.0001 vs vehicle. (b) Cell death
 160 evaluated after 72h of ICG-001 treatment (10 μ M). Live and dead cells were counted in Malassez
 161 chamber after Trypan Blue staining. Histograms represent means \pm SD of three independent
 162 experiments, each performed in duplicate.

Table 1. Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) of ICG-001 in KHOS, MG63 and SJSA1 cells.

Cell line	MG63	KHOS	SJSA1
IC ₅₀ (24h)	1,11µM	1,27µM	1,12µM
IC ₅₀ (48h)	0,87µM	1,11µM	1,59µM
IC ₅₀ (72h)	0,83µM	1,05µM	1,24µM

As evidenced by flow cytometry analyses of cell cycle, the decrease in osteosarcoma cell viability was associated with a cell cycle blockade in the G0/G1 phase. Indeed, ICG-001 significantly increased the proportion of KHOS, MG63 and SJSA1 cells in the G0/G1 phase by 31.5%, 22.9% and 24.5% respectively. In parallel, a decrease in the proportion of cells in the S phase was observed from 38.5% to 10.4% for KHOS, from 31.1% to 7.3% for MG63 and from 26.3% to 8.9% for SJSA1 cells after 24h of ICG-001 treatment (Figure 4A). These results were confirmed after cell cycle synchronization with thymidine treatment (data not shown). Then, in order to better understand the mechanisms responsible for this G0/G1 phase blockade, the expression of several proteins implicated in the cell cycle regulation was analyzed by Western Blot in KHOS cells. ICG-001 strongly inhibited cyclin D1 and cyclin D3 expression in KHOS cells, associated with a decreased Retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation, mainly after 24h of treatment. In parallel, ICG-001 promoted p21^{WAF1} accumulation (Figure 4B). All these modulations repressed S phase genes expression and consequently induced a blockade of G1 to S phase transition (Figure 4C).

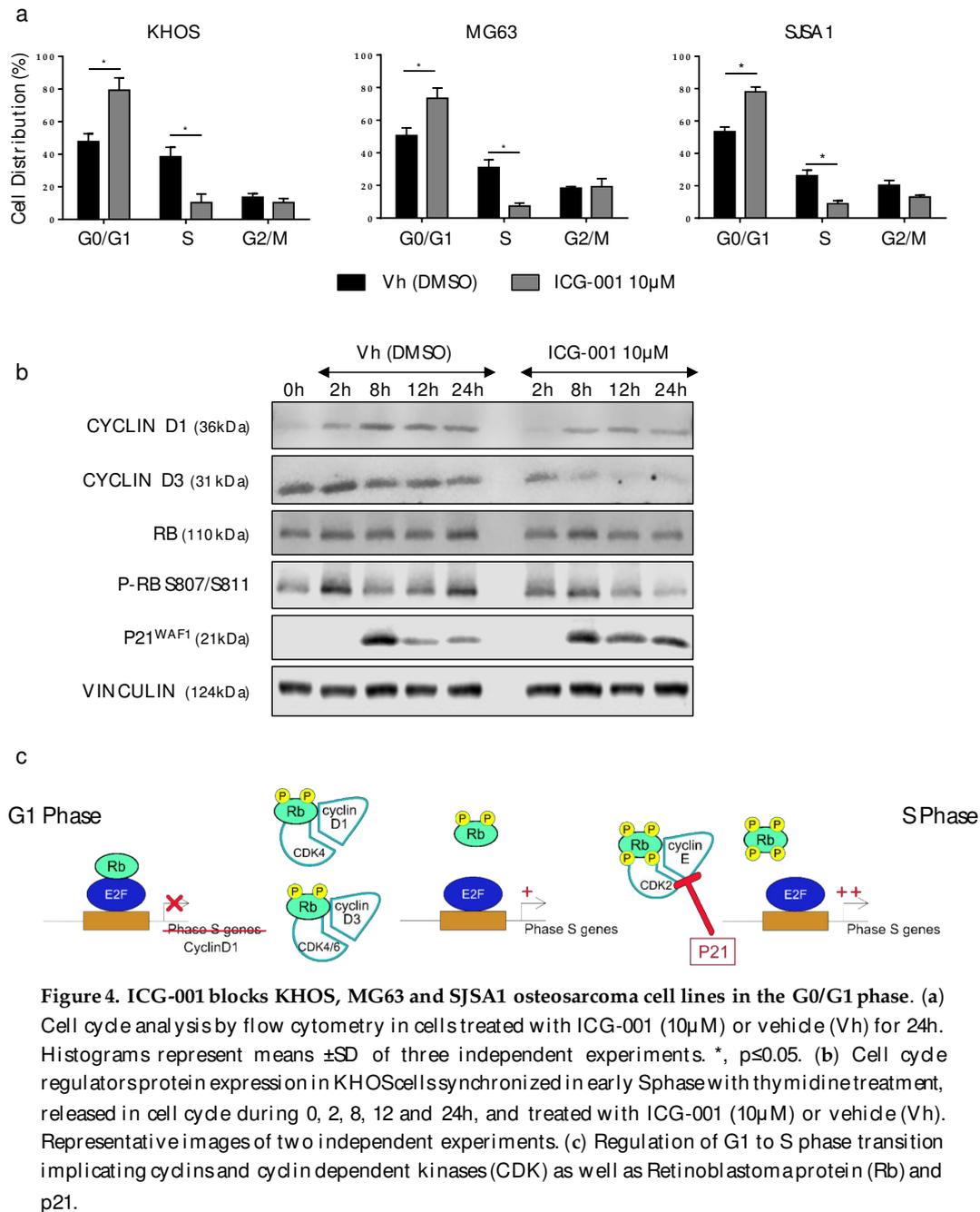


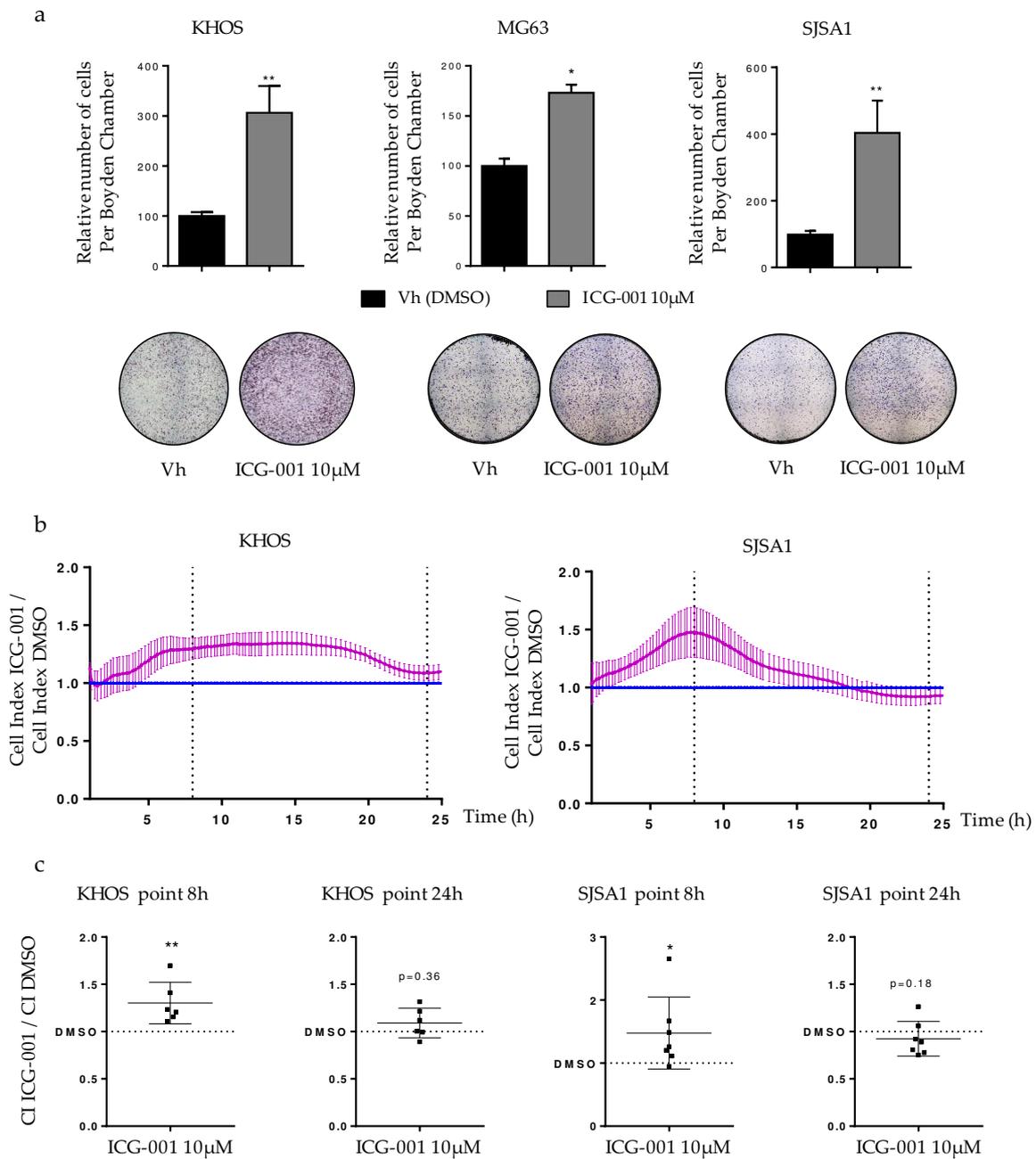
Figure 4. ICG-001 blocks KHOS, MG63 and SJS A1 osteosarcoma cell lines in the G0/G1 phase. (a) Cell cycle analysis by flow cytometry in cells treated with ICG-001 (10µM) or vehicle (Vh) for 24h. Histograms represent means ±SD of three independent experiments. *, p≤0.05. (b) Cell cycle regulators protein expression in KHOS cell synchronized in early S phase with thymidine treatment, released in cell cycle during 0, 2, 8, 12 and 24h, and treated with ICG-001 (10µM) or vehicle (Vh). Representative images of two independent experiments. (c) Regulation of G1 to S phase transition implicating cyclins and cyclin dependent kinases (CDK) as well as Retinoblastoma protein (Rb) and p21.

179
180
181
182
183
184
185
186
187

188 **2.3. ICG-001 stimulates osteosarcoma cell migration.**

189 Given that the presence of metastasis is associated with a poor prognosis for osteosarcoma
190 patients, cell migration was analyzed after ICG-001 treatment using, on the one hand, a transwell
191 assay, and, on the other hand, a real time assay with the xCELLigence system. Osteosarcoma cells
192 were treated during 24h with 10µM of ICG-001 before seeded in Boyden Chamber and cell counting
193 of migrated cells was performed 8h later. ICG-001 induced a significant 3-fold, a 1.8-fold and a 4-fold
194 increase for KHOS, MG63 and SJS A1 cell migration, respectively (Figure 5A). Results obtained with
195 the xCELLigence system confirmed that ICG-001 increased osteosarcoma cell migration at least until
196 8h after seeding (Figure 5B). Indeed, the cell index induced by ICG-001 treatment reached 1.22-fold
197 increase for KHOS cells 8h after seeding and 1.26-fold increase for SJS A1 cells (Figure 5C). The
198 migration of MG63 cells could not be evaluated with the xCELLigence system due to the very low

199 migratory properties of this cell line. After 24h, the Cell Index did not longer significantly differ
 200 between control and ICG-001-treated cells, suggesting that the inhibition of cell proliferation became
 201 predominant compared to the stimulation of cell migration.
 202

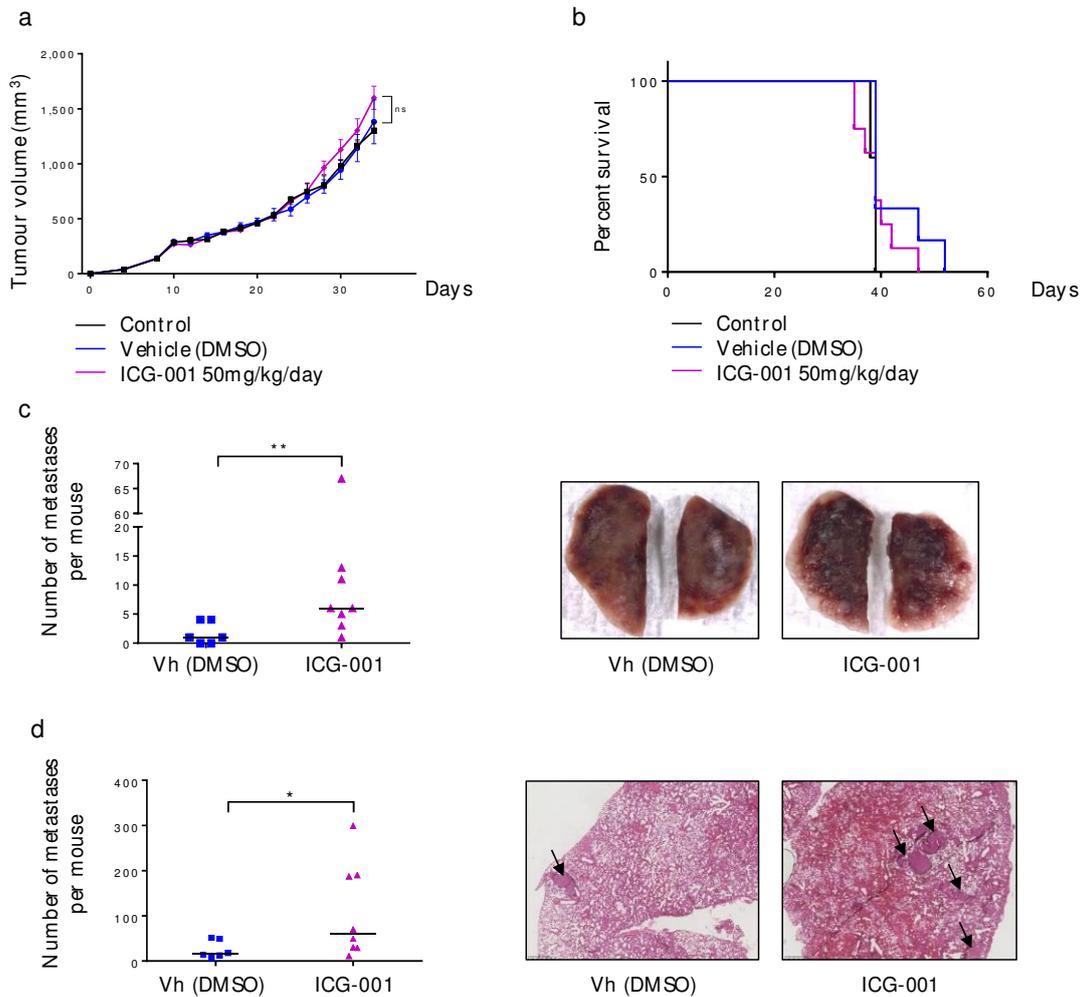


203
 204 **Figure 5. ICG-001 increases KHOS, MG63 and SJSA1 osteosarcoma cell migration.** (a) Migrated
 205 KHOS, MG63 and SJSA1 cells counting after 24h of ICG-001 (10µM) or vehicle (Vh) pre-treatment and
 206 seeding in Boyden Chamber for 8h. Histograms represent means ±SD for at least two independent
 207 experiments, each performed in duplicate. *, p<0.05; **, p<0.01. (b) Real-time migration of KHOS and
 208 SJSA1 cells after 24h of ICG-001 (10µM) or vehicle (Vh) and seeding in inserts of CIM plate. Curves
 209 represent means ±SEM of Cell Index (CI) of ICG-001 treated cells related to the CI of vehicle-treated
 210 cells, for at least three independent experiments, each performed in duplicate. (c) CI of ICG-001
 211 treated cells relativized to CI of vehicle treated cells at 8h and 24h *, p<0.05; **, p<0.01 vs vehicle.

212 2.4. ICG-001 stimulates metastatic dissemination to lungs in a pre-clinical mouse model of osteosarcoma.

ICG-001 inhibits osteosarcoma cell proliferation by inducing a cell cycle blockade in the G0/G1 phase but stimulates the migration of osteosarcoma cells *in vitro*. Thus, to determine the predominant effect of ICG-001 on osteosarcoma *in vivo*, a mouse model of osteosarcoma xenograft was used. ICG-001 treatment, at a dose of 50mg/kg/day, (diluted in Dimethyl Sulfoxide, DMSO) was initiated 7 days after that para-tibial injection of KHOS cells was performed in nude mice. First, it is important to note that DMSO did not impact either the tumor growth or the survival as compared to control group (Figures 6A-B). In the following series, ICG-001 treatment was only compared to DMSO treated mice for analyses. No significant differences of primary tumor volume could be observed between different groups, reaching, 34 days after KHOS cells injection, a mean of 1,600mm³ in ICG-001-treated mice *versus* 1,380mm³ in the DMSO group (Figure 6A). Consequently, mouse event free survival was not altered by ICG-001 treatment. Indeed, control mice were euthanized (tumor volume > 2500mm³) from 38 to 39 days, DMSO treated mice from 39 to 52 days and ICG-001 treated mice from 35 to 47 days (Figure 6B).

Lung metastases were evaluated in this pre-clinical model of osteosarcoma by two complementary approaches: a macroscopic counting of metastases using binocular loupe and a histological counting on lung sections after Hematoxylin-Eosin staining. In accordance to *in vitro* results obtained on cell migration, ICG-001 significantly increased the metastatic dissemination to lungs in this pre-clinical model of osteosarcoma as evidenced by the two techniques. Lungs from DMSO-treated mice exhibited a mean of 2 macroscopic metastases at euthanasia whereas ICG-001 treated mice developed a mean of 6 macroscopic lung metastases. Moreover, one of the ICG-001 treated mice presented more than 60 macroscopic lung metastases and two other more than 10 metastases while no more than 5 metastases was reported for each DMSO-treated mouse (Figure 6C). To complete this analysis of metastases, a counting of metastatic nodules was performed on lung sections after Hematoxylin-Eosin staining. Thus, a mean of 20 metastatic nodules were counted in DMSO treated mice and 80 nodules in ICG-001-treated mice with 3 evidencing higher than 180 metastatic nodules (Figure 6D). These pre-clinical results indicate that the predominant effect of ICG-001 *in vivo* seems to be the induction of cell migration associated with the occurrence of lung metastases rather than an effect on primary tumor progression.



241

242

243 **Figure 6. ICG-001 enhances metastatic dissemination to lungs in a mouse model of osteosarcoma.**

244 (a) Tumor growth monitoring by volume measurement every two days. Different curves (Control N=5, DMSO N=6, ICG-001 50mg/kg/day N=8) represent means \pm SEM.

245 (b) Survival curves, with a median survival of 39 days for each group.

246 (c) Macroscopic count of metastases, each dot represents the number of metastases per mouse. **, $p \leq 0.01$.

247 (d) Histological count of metastases after Hematoxylin-Eosin staining, each dot represents the number of metastases per mouse. On the right

248 panel, arrows indicate metastases*, $p \leq 0.05$.

249 3. Discussion

250 The implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in the development of
 251 osteosarcoma has been evaluated but data remain controversial. Indeed, some data described an
 252 aberrant activation of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway responsible for increased
 253 tumorigenicity and metastatic dissemination of osteosarcoma whereas some other studies
 254 highlighted an inactivation of this pathway in some osteosarcoma patients [13–16]. Our analysis of
 255 RNA seq data including 15 osteosarcoma patients and our screening of the level of β -catenin mRNA
 256 expression in 6 osteosarcoma cell lines (Figure 1) were consistent with an aberrant activation of the
 257 Wnt/ β -catenin pathway in osteosarcoma. Thus, we proposed to block specifically the interaction
 258 between β -catenin and CBP with the drug ICG-001 and consequently to analyze the impact of the β -
 259 catenin/CBP dependent transcription regulation on primary and metastatic osteosarcoma
 260 development.

Our present findings have established that ICG-001 decreased osteosarcoma cell proliferation *in vitro* through a G0/G1 cell cycle blockade (Figures 3–4). These observations were consistent with most of previous studies evaluating the relevance of targeting the canonical Wnt pathway in osteosarcoma, using pharmacological or molecular approaches. As an example, the tankyrase inhibitor JW24 decreased β -catenin nuclear accumulation and reduced osteosarcoma cell growth [18]. A LRP5 dominant negative was also shown responsible for a reduced cell proliferation *in vivo* [19]. Interestingly, the implication of micro-RNAs (miR) has also been evaluated, such as miR-885-5p or miR-107 that decrease cell proliferation and migration through the inhibition of β -catenin. Other studies demonstrated that pharmacological inhibition or depletion of GSK3 β by siRNA decreases osteosarcoma cell proliferation despite an increased nuclear translocation of β -catenin and expression of its target genes [20]. Likewise, treatment with the anti-Dickkopf 1 (DKK1, antagonist of the Wnt/ β -catenin signaling pathway), BHQ880, reduces osteosarcoma development and lung metastasis in mouse models of patient-derived osteosarcoma xenografts [21], supporting a tumor suppressor role of β -catenin in osteosarcoma.

The inhibition of proliferation has been related to a cell cycle blockade in the G0/G1 phase. ICG-001 decreased the expression of two cyclins, cyclin D1 and cyclin D3 as well as Rb phosphorylation while inducing p21 accumulation (Figure 4). Cyclins D1 and D3 and their partners CDK4/6 regulate S phase entry through Rb phosphorylation since hyperphosphorylation of Rb leads to activation of E2F transcription factors and the expression of their target genes responsible for cell cycle progression (Figure 4C) [22]. ICG-001, by reducing cyclins D1 and D3 levels, decreases Rb phosphorylation, leading to a blockade of G1 to S phase transition and consequently the progression of the cell cycle. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 also contributes to the cell cycle blockade in G0/G1, inhibiting Cyclin-Dependent Kinase 2 (CDK2), CDK3, CDK4 and CDK6-associated kinase activity (Figure 4C) [23,24]. Cyclin D1 is a direct target of the Wnt/ β -catenin signaling pathway whereas the increased expression of cyclin D3 following β -catenin activation could be mediated through c-Jun, as demonstrated in myogenic cells [25]. Several studies also demonstrated that p21 gene expression is negatively regulated by the β -catenin/TCF signaling and consequently that β -catenin inhibition leads to p21 accumulation in different cell lines including Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells, vascular smooth muscle cells and breast cancer cells [26–28].

In contrast to previous reports describing a pro-apoptotic role of β -catenin in osteosarcoma cells, ICG-001 treatment does not induce cell death in the three tested osteosarcoma cell lines. Indeed, *SOST* gene (encoding Sclerostin) silencing, leading to Wnt/ β -catenin activation, down-regulates caspase-3 dependent apoptosis in osteosarcoma cells [29]. Therefore, the inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway with tankyrase inhibitors, JW24 or IWR-1, promotes caspase-3-mediated apoptosis in association with reduced cell proliferation in osteosarcoma [18,30]. However, one study has described that β -catenin knockdown by siRNA only slightly increases apoptosis in MG63 osteosarcoma cell line [31], suggesting a limited role of β -catenin in osteosarcoma apoptosis, as observed in our study.

The most important discrepancy between our study and others dealing with the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma development concerns its role in osteosarcoma cell migration. Indeed, our study demonstrated that ICG-001 significantly promotes osteosarcoma cell migration *in vitro* and lung metastases establishment in a pre-clinical mouse model of osteosarcoma. Only one previous study analyzed the effects of a specific inhibitor of β -catenin/CBP interaction, PRI-724, a derivative of ICG-001 in osteosarcoma. The authors observed a decrease in cell proliferation in accordance with our results but highlighted an inhibition of osteosarcoma cell migration *in vitro* [32]. However, in that study, migration has been analyzed after 24h of PRI-724 treatment with a dose 2-fold more elevated than the dose used in our study. Thus, we can hypothesize that the authors used a too high dose to observe specific effects on cell migration and/or that treatment was too long to observe only the effects of PRI-724 on cell migration without the reduced proliferation affecting the results. Indeed, our real time migration assay indicated that after 24h of treatment, we did not observe an enhanced migratory effect of ICG-001 anymore, or even a low decrease in cell migration in SJS-1 cells, probably due to a predominant effect on cell proliferation rather than on cell migration (Figure

5B). Moreover, we confirmed that ICG-001 promotes cell migration in our mouse pre-clinical model of osteosarcoma as we observed a significant increase in lung metastatic dissemination (Figure 6). Interestingly, a recent study is in accordance with our results, describing that Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Like-1 (SPARCL1) protein suppresses osteosarcoma metastasis through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [33].

Finally, our results sustain that the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma development is highly complex since we highlighted a beneficial effect of ICG-001 on osteosarcoma cell proliferation on the one hand, but, a pro-metastatic role of this β -catenin inhibitor, on the other hand. To our knowledge, it is the first description of a “dual effect” of a Wnt/ β -catenin inhibitor on osteosarcoma development. Indeed, previous studies described either an oncogenic or a tumor suppressive role of β -catenin in osteosarcoma development and lung metastasis [13–16] but no studies have shown a pro-proliferative and anti-metastatic role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma. Moreover, it is important to consider the heterogeneity of osteosarcomas during analyses about the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma cell lines. Indeed, as we observed in this study, MG-63 cells express low β -catenin compared to KHOS and SJSA-1 cells and consequently are less sensitive to ICG-001. To conclude, our study seems to add another level of complexity about the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma pathogenesis, suggesting that the effect of β -catenin in osteosarcoma development could depend on the transcriptional co-activators with which it is associated to regulate its target genes expression.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture and chemicals reagents

KHOS (ATCC-CRL 1544), MG63 (ATCC-CRL 1427) and SJSA1 (ATCC-CRL 2098) human osteosarcoma cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest), at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Wnt3a was diluted in Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA). ICG-001 (R&D Systems) was diluted in Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma), and DMSO was used as control vehicle (Vh).

4.2. RNA seq analysis

RNA seq data were downloaded from Gene expression Omnibus database (GSE99671, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE99671>). These published data allow the comparison of differential expression of β -catenin in Reads Per Kilobase Million (RPKM) between 15 human osteosarcoma tumors and their paired normal bone tissues [17]. Statistical analysis was performed with Graphpad Prism Software, using Wilcoxon matched-paired test, p-value = 0.0006. Gene Set enrichment analysis (GSEA) was also performed using GSEA software (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>). Wnt target genes are from the Molecular Signature Database [34].

4.3. Luciferase gene reporter assay

Cells were co-transfected with M50 Super 8x TOPFlash-Firefly luciferase (gift from Randall Moon, Addgene #12456, (TCF/LEF)_s-lux) and phRLMLP-Renilla luciferase expression vector (Promega #AF025844) as transfection control, by using JetPEI (Polyplus-transfection). After transfection, cells were starved overnight with low FBS concentrations (1%), and then treated with increasing concentrations of ICG-001 (1–10 μ M) and with 25ng/mL of Wnt3a during 24h in starved conditions. The Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) was used to determine Luciferase activity. The values are normalized by dividing the Firefly luminescence by the Renilla luminescence. Then values are relativized by adjusting the average value of the DMSO/Wnt3a condition to 1.

4.4. RT-qPCR

RNA from cell lines or from xenograft tumors were extracted with NucleoSpin RNA plus kit (Macherey-Nagel). Then 1-2µg of RNA was retro-transcribed in cDNA using Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer). qPCR was performed using SYBR Select Master Mix (Life Technologies), with 20ng cDNA by reaction, with primers sequences listed in the table 2. Target gene expression was normalized to 18S, β2M and GAPDH levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold (Ct) method was used to calculate relative quantification of target mRNAs.

Table 2. Primers used for qPCR experiments.

Genes	Primers sequences
<i>h18S</i>	Qf: cgattggatgggttagtgagg
	Qr: agttcgaccgtcttctcagc
<i>hAXIN2</i>	Qf: atgattccatgtccatgacg
	Qr: cttcacactgcatgcat
<i>hβ2M</i>	Qf: ttctggcctggaggctatc
	Qr: tcaggaaattgactttccattc
<i>hBIRC5</i>	Qf: aggaccaccgatctctacat
	Qr: aagtctggctcgttctcagtg
<i>hGAPDH</i>	Qf: tgggtgtgaaccatgagaagtag
	Qr: ggtgcaggaggcattgct

4.5. Western Blot

Cells were lysed in cold Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA) buffer supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and Na₃VO₄. Protein concentration was determined using BiCinchoninic acid Assay (BCA) Kit (Sigma). Protein (20µg) were denatured by Laemli Buffer at 95°C for 5 minutes, before to be loaded in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After electrophoresis separation, proteins were transferred to PolyVinylidene Fluoride (PVDF) 0.45µm membrane (Immobilon-FL, Merck Millipore). Membrane was saturated 1 hour at room temperature with Tris-Buffered Saline (TBS) 0.05% Tween (MM France), 3% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma), and was incubated overnight at 4°C under gentle agitation with primary antibodies in previous blocking buffer. Antibodies were used following the supplier recommendations: Survivin (Cell Signaling Technology (CST) #2808), Vinculin (CST #13901), Cyclin D1 (CST #2922), Cyclin D3 (CST #2936), Rb (CST #9309), Phospho-Rb Ser807/811 (CST #9308), p21 (CST #2947). Membrane was washed with TBS 0.05% Tween, and saturated 15 minutes with TBS 0.05% Tween 5% non-fat milk, before incubation 1h at room temperature with secondary antibodies HRP coupled (Horseradish Peroxidase). The labelled proteins were detected by chemiluminescent detection (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, ThermoFisher) using a Charged Coupled Device (CDD) camera (GBox, Syngene).

4.6. Proliferation assay (crystal violet staining)

2,000 KHOS and SJS1 cells and 3,000 MG63 cells were seeded in 96-well plate, in cell culture conditions. After adherence, cells were treated with increasing concentrations of ICG-001 (0.1-10µM) or DMSO during 24h, 48h and 72h. Cells were then fixed with 1% glutaraldehyde and stained by crystal violet. Finally, crystal violet staining was solubilized in Sorenson solution, and absorbance was measured at 570nm with Victor² (Perkin Elmer).

4.7. Trypan Blue counting

The cells were seeded in a 24-well plate, at 15,000 cells per well. After adherence, they were treated with ICG-001 10µM (or DMSO) for 72 h. At the end point, the supernatants were collected,

cells were washed with DPBS, which was also collected, trypsinized with Trypsine-EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid, Lonza) and harvested. Then, cell suspensions containing live and dead cells, were counted after Trypan Blue staining.

4.8. Cell cycle analysis by flow cytometry

Adherent cells were treated during 24h with ICG-001 or DMSO before collection of culture media. Then, cells were washed with DPBS, which was collected, trypsinized, and fixed using 70% ethanol during 30 minutes at 4°C. Cells were washed with DPBS, centrifuged, and resuspended in a phospho-citrate buffer (Na₂HPO₄ 0.2M, citric acid C₆H₈O₇ 0.1M, pH 7.5) for 30 minutes at room temperature. Cells were centrifuged and resuspended in DPBS 0.12% Triton 100X 0.12mM EDTA and 100µg/mL RNase A (Promega A797c), and incubated 30 minutes at 37°C. Then Propidium Iodide was added to a final concentration of 5mg/mL, for 20 minutes at 4°C. Cell distribution was observed by flow cytometry in Platform Cytocell in Nantes (LSRII, Becton Dickinson). Data were analyzed with Flowlogic software.

4.9. Thymidine synchronization (Double Block)

Adherent cells were treated with 2mM thymidine for 18h, washed twice with DPBS and left in DMEM 10% FBS for 8h. Then, cells were treated a second time with 2mM Thymidine for 16h. Finally, cells were washed twice with DPBS and treated with DMEM 10% FBS ICG-001 10µM (or DMSO) for 2, 8, 12 or 24h. Cell distribution was observed by flow cytometry in Platform Cytocell in Nantes (LSRII, Becton Dickinson), after 2h, 8, 12h and 24h or without any treatment. Data were analyzed with Flowlogic software.

4.10. Migration assay (Boyden Chambers)

Cells were pre-treated with 10µM ICG-001 (or vehicle) for 24 hours, before being seeded into a Boyden chamber with 8µm pores size (50,000 cells/insert) and incubated for 8 hours at 37°C. An FBS gradient was performed with 2% above and 10% below each Boyden chamber. Then, cells at the upper face were removed with a cotton swab and cells at the lower face of the membrane were fixed with DPBS 1% Glutaraldehyde and stained with crystal violet solution. Migratory cells were counted using Image J software, in 14 fields by insert, and then represented by the average of cells per field per insert. In order to compare independent experiments, the number of DMSO treated-migratory cells was expressed as 100%.

4.11. Real-time migration assay (xCELLigence®)

Cells were pre-treated with 10µM ICG-001 (or DMSO) for 24 hours, before being seeded into the upper well of a Cell Invasion Migration plate (60,000 cells/well, ACEA Biosciences, Inc.). Then, a FBS gradient of 2 to 10% was performed following the supplier's recommendations. The upper well is separated from the lower well by a membrane with 8µm pores. On the underside of the membrane, gold microelectrodes measure a current. When cells migrate through the membrane and adhere to the microelectrodes, they disrupt the current flow by increasing resistance. This parameter is monitored over time and allows the cell index to be calculated. For each experiment, the cell index of the ICG-001 (10µM) treated cells was relativized on the average of the cell index of the DMSO-treated cells, the DMSO value being set to 1.

4.12. Osteosarcoma xenograft murine model

Four-weeks females NMRI-nude mice (Elevages Janvier) were bred under pathogen-free conditions in the Experimental Therapeutic Unit at the Medical School of Nantes, in agreement with the animal experimentation committee N°6 and referenced under the project number APAFIS # 8405-2017010409498904 v3. The mice were anesthetized with an isoflurane / air mixture (Fluorene 5%, 1L/min) and 1 million KHOS cells was injected intramuscular close to the proximal tibia surface. After 1 week, when the tumor became palpable, the mice received a daily intraperitoneal injection of ICG -

001 provided by CEISAM laboratory (Nantes) at 50mg/kg/day (or DMSO). Tumor growth was monitored every 2 days with calipers and calculated according to the following formula: $V = 0.5 \times \text{Longest side} \times (\text{Shortest perpendicular side})^2$. The mice were euthanized when the tumor volume reached 2,500mm³.

4.13. Histological analysis

At sacrifice, lungs were removed and fixed with 10% paraformaldehyde for 24 hours. Lungs were rinsed with DPBS and metastases were counted with a binocular loupe. Finally, after embedding in paraffin, 3µm sections were cut at four different levels spaced 200µm each. The samples were then stained with Hematoxylin-Eosin, and metastases were counted after Nanozoomer acquisition.

4.14. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism Software. For in vivo experiments, the comparison of tumor growth between groups was performed by a two-way ANOVA. The survival curves were analyzed with a Log-rank (Mantel-Cox) test. Mann-Whitney test was performed to compare two groups. To compare more than 2 groups: ANOVA one-way was used when Brown-Forsythe showed variance equality, or Kruskal-Wallis in other cases. $\alpha = 0.05$ and $p\text{-value} \leq 0.05$ was considered statistically significant.

5. Abbreviations

ANOVA: analysis of variance
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ATCC: American Type Culture Collection
BCA: BiCinchoninic acid Assay
BSA: Bovine Serum Albumin
CBP: cAMP response element-binding protein
CDD: Charged Coupled Device
CDK: Cyclin-Dependent Kinase
CK1 α : Casein Kinase 1 α
CST: Cell Signaling Technology
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid
FBS: Fetal Bovine Serum
Fzd: Frizzled
GSEA: Gene Set enrichment analysis
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
HEK293: Human Embryonic Kidney
HE: Hematoxylin-Eosin
HRP: Horseradish Peroxidase
LRP: low-density lipoprotein receptor related protein
MSCs: mesenchymal stem cells
miR: micro-RNAs
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF: PolyVinylidene Fluoride
RIPA: Radio-Immuno-Precipitation Assay
RPKM: Reads Per Kilobase Million
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel
SOST: Sclerostin

SPARCL1: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine Like-1

TBS: Tris-Buffered Saline

TCF/LEF: T cell factor/lymphoid enhancer factor

Supplementary Materials: Supplementary figure S1: whole blot corresponding to SURVIVIN and VINCULIN expression (Figure 2c). Supplementary figure S2: whole blot corresponding to CYCLIN D1, CYCLIN D3, P21^{WAF1} and VINCULIN (Figure 4b). Supplementary figure S3: whole blot corresponding to P-RB and RB (Figure 4b).

Author Contributions: conceptualization, G.D. and B.B.L.R.; methodology, G.D., S.M., R.B. and M.C.; formal analysis, G.D. and B.B.L.R.; investigation, G.D, S.M., S.R., R.B., K.B., J.A. and M.C.; writing—original draft preparation, G.D. and B.B.L.R.; writing—review and editing, D.H., F.L., F.V. and F.R.; supervision, B.B.L.R and F.R.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: we thank Randall Moon (Addgene) for M50 Super 8x TOPFlash-Firefly luciferase expression vector. We thank members of Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell). We thank CHEM-Symbiose platform (CEISAM laboratory, Nantes) to synthesize ICG-001.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Desandes, E.; Lacour, B.; Belot, A.; Molinie, F.; Delafosse, P.; Tretarre, B.; Velten, M.; Sauleau, E.-A.; Woronoff, A.-S.; Guizard, A.-V.; et al. Cancer incidence and survival in adolescents and young adults in France, 2000-2008. *Pediatr Hematol Oncol* **2013**, *30*, 291–306.
- Broadhead, M.L.; Clark, J.C.M.; Myers, D.E.; Dass, C.R.; Choong, P.F.M. The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. *Sarcoma* **2011**, 2011.
- Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. *Int J Cancer* **2009**, *125*, 229–234.
- 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* **2009**, *115*, 1531–1543.
- Strauss, S.J.; Whelan, J.S. Current questions in bone sarcomas. *Curr Opin Oncol* **2018**, *30*, 252–259.
- Gordon, M.D.; Nusse, R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22429–22433.
- Stamos, J.L.; Weis, W.I. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5*, a007898.
- MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9–26.
- Anastas, J.N.; Moon, R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 11–26.
- Duchartre, Y.; Kim, Y.-M.; Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 141–149.
- Chen, C.; Zhao, M.; Tian, A.; Zhang, X.; Yao, Z.; Ma, X. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17570–17583.
- Iwaya, K.; Ogawa, H.; Kuroda, M.; Izumi, M.; Ishida, T.; Mukai, K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 525–529.
- Liu, W.; Zhao, Z.; Wang, Y.; Li, W.; Su, Q.; Jia, Q.; Zhang, J.; Zhang, X.; Shen, J.; Yin, J. Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/ β -catenin signaling pathway. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 343.
- Lu, Y.; Guan, G.-F.; Chen, J.; Hu, B.; Sun, C.; Ma, Q.; Wen, Y.-H.; Qiu, X.-C.; Zhou, Y. Aberrant CXCR4 and β -catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. *Oncol Lett* **2015**, *10*, 2123–2129.
- Cai, Y.; Mohseny, A.B.; Karperien, M.; Hogendoorn, P.C.W.; Zhou, G.; Cleton-Jansen, A.-M. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J. Pathol.* **2010**, *220*, 24–33.
- Du, X.; Yang, J.; Yang, D.; Tian, W.; Zhu, Z. The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 450.

- 536 17. Ho, X.D.; Phung, P.; Q Le, V.; H Nguyen, V.; Reimann, E.; Prans, E.; Kōks, G.; Maasalu, K.; Le, N.T.; H
537 Trinh, L.; et al. Whole transcriptome analysis identifies differentially regulated networks between
538 osteosarcoma and normal bone samples. *Exp Biol Med (Maywood)* **2017**, *242*, 1802–1811.
- 539 18. Stratford, E.W.; Daffinrud, J.; Munthe, E.; Castro, R.; Waaler, J.; Krauss, S.; Myklebost, O. The tankyrase-
540 specific inhibitor JW74 affects cell cycle progression and induces apoptosis and differentiation in
541 osteosarcoma cell lines. *Cancer Med* **2014**, *3*, 36–46.
- 542 19. Guo, Y.; Rubin, E.M.; Xie, J.; Zi, X.; Hoang, B.H. Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and
543 metastasis of osteosarcoma in an animal model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2039–2045.
- 544 20. Shimozaki, S.; Yamamoto, N.; Domoto, T.; Nishida, H.; Hayashi, K.; Kimura, H.; Takeuchi, A.; Miwa, S.;
545 Igarashi, K.; Kato, T.; et al. Efficacy of glycogen synthase kinase-3 β targeting against osteosarcoma via
546 activation of β -catenin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77038–77051.
- 547 21. Goldstein, S.D.; Trucco, M.; Bautista Guzman, W.; Hayashi, M.; Loeb, D.M. A monoclonal antibody against
548 the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget*
549 **2016**, *7*, 21114–21123.
- 550 22. Qie, S.; Diehl, J.A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med.* **2016**,
551 *94*, 1313–1326.
- 552 23. Boulaire, J.; Fotedar, A.; Fotedar, R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol. Biol.*
553 **2000**, *48*, 190–202.
- 554 24. Gartel, A.L.; Tyner, A.L. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* **1999**, *246*,
555 280–289.
- 556 25. Ramazzotti, G.; Billi, A.M.; Manzoli, L.; Mazzetti, C.; Ruggeri, A.; Erneux, C.; Kim, S.; Suh, P.-G.; Cocco, L.;
557 Faenza, I. IPMK and β -catenin mediate PLC- β 1-dependent signaling in myogenic differentiation.
558 *Oncotarget* **2016**, *7*, 84118–84127.
- 559 26. Kamei, J.; Toyofuku, T.; Hori, M. Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel
560 mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
561 **2003**, *312*, 380–387.
- 562 27. Quasnicka, H.; Slater, S.C.; Beeching, C.A.; Boehm, M.; Sala-Newby, G.B.; George, S.J. Regulation of
563 smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1
564 and p21 expression. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 1329–1337.
- 565 28. Xu, J.; Chen, Y.; Huo, D.; Khramtsov, A.; Khramtsova, G.; Zhang, C.; Goss, K.H.; Olopade, O.I. β -catenin
566 regulates Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2016**, *55*, 431–439.
- 567 29. Zou, J.; Zhang, W.; Li, X.-L. Effects of SOST Gene Silencing on Proliferation, Apoptosis, Invasion, and
568 Migration of Human Osteosarcoma Cells Through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Calcif. Tissue Int.*
569 **2017**, *100*, 551–564.
- 570 30. Martins-Neves, S.R.; Paiva-Oliveira, D.I.; Fontes-Ribeiro, C.; Bovée, J.V.M.G.; Clifton-Jansen, A.-M.; Gomes,
571 C.M.F. IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ β -catenin signaling in cancer stem-like cells and
572 inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Lett.* **2018**, *414*, 1–15.
- 573 31. Zhang, F.; Chen, A.; Chen, J.; Yu, T.; Guo, F. siRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion
574 and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2011**, *12*, 239–
575 245.
- 576 32. Fang, F.; VanCleave, A.; Helmuth, R.; Torres, H.; Rickel, K.; Wollenzien, H.; Sun, H.; Zeng, E.; Zhao, J.; Tao,
577 J. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36780–36792.
- 578 33. Zhao, S.-J.; Jang, Y.-Q.; Xu, N.-W.; Li, Q.; Zhang, Q.; Wang, S.-Y.; Li, J.; Wang, Y.-H.; Zhang, Y.-L.; Jang,
579 S.-H.; et al. SPARCL1 suppresses osteosarcoma metastasis and recruits macrophages by activation of
580 canonical WNT/ β -catenin signaling through stabilization of the WNT-receptor complex. *Oncogene* **2018**, *37*,
581 1049–1061.
- 582 34. Willert, J.; Epping, M.; Pollack, J.R.; Brown, P.O.; Nusse, R. A transcriptional response to Wnt protein in
583 human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev. Biol.* **2002**, *2*, 8.



1.3. Complément de discussion

Dans la littérature, les résultats portant sur l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement des ostéosarcomes sont discordants bien qu'une majorité d'entre eux démontrent que l'activation cette voie constitue un facteur de mauvais pronostic chez les patients. Dans ce contexte, étant donné qu'à ce jour, aucun essai clinique n'a permis d'augmenter les taux de survie depuis la mise en place des protocoles de chimiothérapie dans les années 1980, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire dans les cas d'ostéosarcome. Le ciblage de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/CBP par l'inhibiteur chimique ICG-001 entraînant une diminution de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine semblait donc représenter une stratégie intéressante.

Cette étude a tout d'abord permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité transcriptionnelle dépendante de la voie Wnt/ β -caténine par l'ICG-001 dans 3 lignées cellulaires d'ostéosarcome. Cet effet inhibiteur a pu être démontré d'une part, dans un modèle artificiel de gène rapporteur luciférase avec une diminution de l'activité luciférase dépendante de la β -caténine et des protéines de la famille TCF/LEF (M50 TOPFlash) ; et d'autre part, dans un modèle endogène (qPCR), l'ICG-001 réduisant l'expression des gènes cibles de la β -caténine tels que l'*AXIN2* et *BIRC5*. Cette inhibition de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine est associée à une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro*, avec un blocage des cellules en phases G0/G1 du cycle cellulaire, comme cela a déjà été observé dans d'autres études ciblant la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes (Chen et al., 2015; Dai et al., 2017). Le blocage du cycle cellulaire peut être attribué à la diminution de l'expression protéique des CYCLINES D1 et D3 nécessaires à l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et lors de la transition G1/S (Figure 16) (Lim and Kaldis, 2013). En effet, les CYCLINES D1 et D3 s'associent respectivement aux protéines CDK4 et CDK4/6 (cyclines dépendantes kinases) au cours de la phase G1 et permettent ainsi la phosphorylation de la protéine Rb, libérant les complexes de transcription des gènes nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire (Lim and Kaldis, 2013). De plus, l'augmentation de l'expression protéique de p21 en présence d'ICG-001 participe également à la régulation du cycle cellulaire en réprimant l'activité des complexes CYCLINE/CDK. Cette induction de l'expression de p21 suite à la réduction de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine a déjà pu être mise en évidence dans d'autres études (Kamei et al., 2003; Lim and Kaldis, 2013; Quasnichka et al., 2006; Xu et al., 2016).

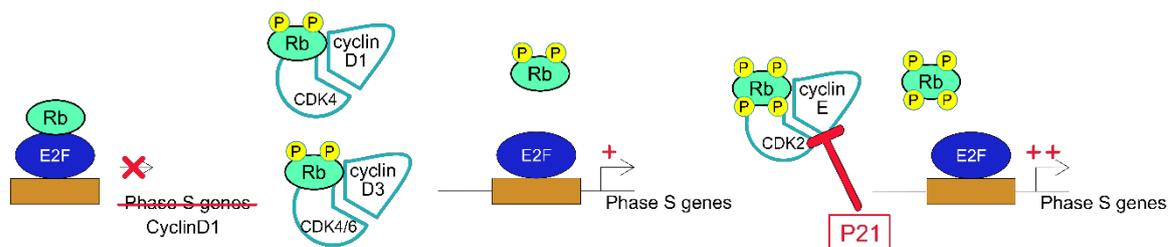


Figure 16 : Régulation de la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Cette transition fait intervenir les complexes CYCLINES/CDK responsables de la phosphorylation de la protéine Rb, levant ainsi la répression de la transcription. Le facteur de transcription E2F induit l'expression des gènes impliqués dans la phase S, la cellule rentre en interphase. La protéine p21 est capable d'inhiber l'activité des complexes CYCLINES/CDK, contrôlant la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. CDK : Cyclin Dependante Kinase.

Contrairement à ce qui est fréquemment rapporté dans la littérature, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine n'est pas suffisante dans notre modèle pour induire la mort par apoptose des cellules d'ostéosarcome (Dai et al., 2017; Ma et al., 2015; Stratford et al., 2014). Cependant, l'ICG-001 cible spécifiquement l'activité transcriptionnelle dépendante du complexe β -caténine/CBP alors qu'un effet pro-apoptotique a été décrit uniquement après inhibition de toute l'activité transcriptionnelle dépendante de la voie Wnt/ β -caténine. A titre d'exemple, des traitements avec des molécules qui inhibent les Tankyrases (JW24, IWR-1) permettent d'augmenter l'apoptose dépendante de la caspase 3 dans les cellules d'ostéosarcome (Martins-Neves et al., 2018; Stratford et al., 2014). Une étude semble néanmoins en accord avec les résultats que nous avons observés puisqu'une inhibition de l'expression de la β -caténine par siRNA n'induit que très peu l'apoptose des cellules MG63, suggérant un rôle limité de la β -caténine dans l'apoptose des cellules d'ostéosarcome (Zhang et al., 2011b).

Ces travaux ont ensuite permis de démontrer, de façon inattendue, une augmentation des capacités migratoires et métastatiques des cellules d'ostéosarcome en présence d'ICG-001. Or, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine a souvent été associée à une augmentation de la migration cellulaire *in vitro* ainsi qu'à la présence de métastases pulmonaires chez les patients atteints d'ostéosarcome. Par conséquent, l'inhibition de cette voie aboutit fréquemment à une diminution du potentiel métastatique des ostéosarcomes (Ma et al., 2015; Rubin et al., 2010; Zhao et al., 2015). Cette différence majeure pourrait s'expliquer par le fait que les autres études ciblent des acteurs en amont de l'activité transcriptionnelle de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et donc inhibant l'intégralité de la transcription dépendante de la β -caténine, ce qui suggère à nouveau que les cofacteurs transcriptionnels de la β -caténine n'ont pas tous les mêmes fonctions (Ma et al., 2005). Néanmoins, une étude

publiée à la fin de l'année 2018 a mis en évidence qu'un analogue structurel de l'ICG-001, le PRI-724, diminue la migration et l'invasion des cellules d'ostéosarcome 143B et SJSA1 (Fang et al., 2018) et va donc à l'encontre des résultats que nous avons observés. Cependant, les auteurs de cette étude ont, d'une part, traité les cellules d'ostéosarcome avec des concentrations plus de deux fois supérieures (25 μ M) à celle utilisée dans notre étude ; cette forte concentration pourrait être à l'origine d'effets non spécifiques à l'inhibition de l'interaction entre la β -caténine et CBP. D'autre part, la migration est évaluée après 24h de traitement au PRI-724 à une concentration réduisant la prolifération cellulaire. Il est donc possible qu'à ce temps, l'effet observé soit la résultante de l'action du PRI-724 sur la prolifération et sur la migration cellulaire. En effet, des expériences réalisées en temps réel nous ont permis de démontrer une augmentation de la migration cellulaire en présence d'ICG-001 jusqu' à 8 heures de traitement mais qui décroît au-delà, l'effet anti-prolifératif de l'ICG-001 devenant probablement prédominant. De plus, nos résultats *in vitro* ont été confirmés dans un modèle murin d'ostéosarcome, dans lequel une augmentation significative du nombre de métastases pulmonaires chez les souris traitées avec une dose quotidienne de 50mg/kg d'ICG-001 a été observée.

Les conclusions de notre étude préclinique ne confirment que partiellement celles issues de nos expériences *in vitro*. Bien que l'ICG-001 induise une diminution importante de la prolifération cellulaire *in vitro*, aucun effet n'a pu être observé sur la croissance tumorale dans notre modèle murin. L'implication forte du microenvironnement tumoral dans le développement de la tumeur primaire pourrait être à l'origine de cette différence. D'autres facteurs pro-tumoraux sont présents dans le microenvironnement tumoral, et peuvent soutenir la croissance tumorale tels que le TGF β ou les BMPs (Verrecchia and Rêdini, 2018). Ainsi, d'autres voies de signalisation pourraient être activées dans les cellules d'ostéosarcome et contrebalancer l'inhibition du cycle cellulaire observée en présence d'ICG-001, comme par exemple, l'activation de la transcription du gène *CCND1* (CYCLINE D1) par les facteurs JUN/FOS ou STAT3 (Duronio and Xiong, 2013). Un autre point très important concerne la biodisponibilité et la biodistribution de l'ICG-001, car la molécule très hydrophobe a été injectée dans un mélange de DMSO (dimethyl sulfoxide) et d'huile de sésame par voie intrapéritonéale et il n'a pas été possible d'évaluer sa présence au sein de la tumeur primaire. Les molécules hydrophobes n'étant pas aisément administrables, une gamme de doses croissantes aurait sûrement été préférable combinée à différentes formulations afin d'augmenter la solubilité et la diffusion du produit dans l'organisme (Allen and Cullis, 2004; Singh et al., 2017). Néanmoins, la stimulation de la dissémination métastatique chez les souris traitées à l'ICG-001 permet de conclure qu'au moins une fraction de la dose injectée est parvenue jusqu'aux cellules tumorales.

Bien que l'ICG-001 soit décrite comme une molécule très spécifique ne ciblant que l'interaction entre la β -caténine et CBP, des effets de l'ICG-001, indépendants de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, ont été mis en évidence notamment dans le blocage du cycle cellulaire (Wiese et al., 2017) et l'induction de l'apoptose dépendante des caspases (Grigson et al., 2015). En effet, dans des modèles cellulaires de gliomes pédiatriques de haut grade, malgré une très faible activité de la voie Wnt/ β -caténine en réponse à une stimulation au Wnt3a, un traitement à l'ICG-001 diminue la prolifération et la migration cellulaire *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo*. De plus, d'une part, l'ICG-001 augmente ou tend à augmenter l'expression de certains gènes cibles de la β -caténine (*AXIN2*, *CD44*, *BMP4*) en fonction des lignées cellulaires. D'autre part, la majorité des gènes sous-exprimés en présence d'ICG-001 sont des gènes, indépendants de la voie Wnt/ β -caténine, qui régulent le cycle cellulaire, ce qui est cohérent avec l'inhibition de la prolifération cellulaire (Wiese et al., 2017). Une seconde étude démontre que l'ICG-001 déclenche l'apoptose de cellules issues de myélome multiple de façon caspases-dépendante, en lien avec une augmentation de l'expression génique des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 (*PUMA* et *NOXA*). Cependant, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine ne semble pas être impliquée car l'expression de *BIRC5* (codant pour la protéine SURVIVINE) n'est pas diminuée (Grigson et al., 2015). Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que le cofacteur de transcription CBP devient disponible pour d'autres facteurs de transcription tels que p53 permettant l'expression de gènes tels que *PUMA* et *NOXA* (Grigson et al., 2015; Grossman, 2001; Yu and Zhang, 2008). Ces études suggèrent qu'une partie des effets de l'ICG-001 peuvent être médiés de façon indépendante de la voie Wnt/ β -caténine. Cependant, ces effets ne sont pas totalement indépendants de la voie canonique de Wnt, car c'est l'inhibition de cette voie de signalisation qui permet l'activation d'autres voies ou d'autres complexes transcriptionnels, avec notamment la libération de CBP des complexes transcriptionnels composés de la β -caténine et de TCF/LEF.

Nos résultats ont donc montré que l'ICG-001 augmente la migration des lignées cellulaires d'ostéosarcome humain utilisées dans le cadre de notre étude, et favorise le développement métastatique dans un modèle murin orthotopique de xénogreffe de cellules KHOS. Ces résultats ne font donc pas de l'ICG-001 un bon candidat pour une utilisation en clinique dans le cas des ostéosarcomes. En revanche, sur le plan de la biologie des ostéosarcomes, cette étude pose de nouvelles questions sur l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la dissémination métastatique et sur l'importance des co-activateurs composant le complexe de transcription avec la β -caténine.

2. Résultats Partie 2 : Mécanismes responsables des effets pro-migratoires et pro-métastatiques de l'ICG-001

2.1. Introduction

La première partie de ce travail de thèse a permis de confirmer que la voie canonique de Wnt joue un rôle clé dans le développement des ostéosarcomes mais a surtout ajouté un niveau de complexité dans la régulation de cette voie de signalisation. En effet, bien que l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine par l'ICG-001 permette de diminuer la prolifération des cellules issues d'ostéosarcome *in vitro*, elle exerce un rôle pro-migratoire *in vitro* et pro-métastatique dans un modèle murin orthotopique d'ostéosarcome. Cette étude suggère donc que le rôle joué par la β -caténine dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes pourrait être modulé par les co-activateurs transcriptionnels auxquels elle s'associe pour réguler la transcription de ces gènes cibles. Ainsi, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle dépendante du complexe transcriptionnel composé de la β -caténine et de CBP par l'ICG-001 induirait une modification phénotypique à l'origine de l'augmentation des propriétés migratoires des cellules d'ostéosarcome. La compréhension des mécanismes impliqués dans ces effets est donc indispensable à une meilleure appréhension de l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement métastatique des ostéosarcomes. Notre hypothèse de travail s'est donc basée sur le fait que l'ICG-001 pourrait être à l'origine d'une régulation transcriptionnelle induite par d'autres complexes de transcription incluant la β -caténine mais de façon indépendante de son interaction avec CBP. Plus précisément, au vu de la littérature, deux hypothèses de travail ont été avancées :

- Un déplacement d'équilibre transcriptionnel vers un complexe incluant la β -caténine et le co-activateur p300 (Figure 17A).

- La stimulation de la voie de signalisation du TGF β , qui joue un rôle pro-migratoire important dans l'ostéosarcome et qui pourrait être activée en réponse à l'inhibition de la voie de signalisation canonique de Wnt (Figure 17B).

Ces deux hypothèses de travail ont fait l'objet d'investigations au cours de la seconde partie de thèse.

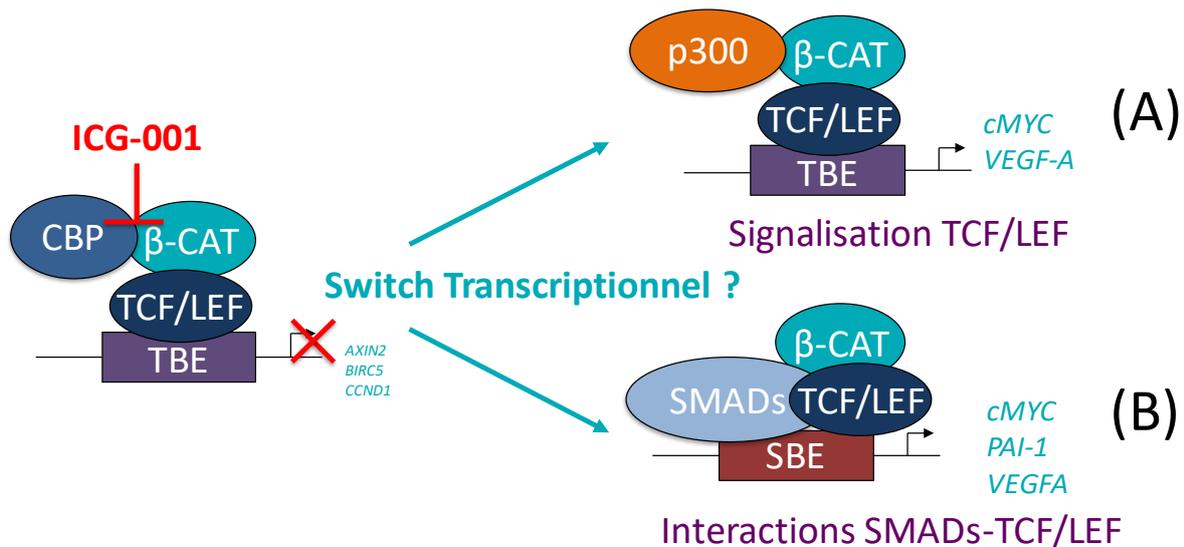


Figure 17 : Hypothèses avancées pour expliquer les effets pro-migratoires de l'ICG-001. L'ICG-001 inhibe la transcription dépendante du complexe CBP/β-caténine. **(A)** Cette inhibition pourrait favoriser la transcription dépendante des complexes β-caténine/p300 et ainsi activer la transcription des gènes cibles tels que *cMYC* et *VEGF-A*. **(B)** La β-caténine libérée suite à l'inhibition de l'interaction CBP/β-caténine par l'ICG-001 pourrait favoriser la création de complexes transcriptionnels avec les protéines SMADs de la voie de signalisation canonique du TGFβ. CBP : cAMP response element-binding protein ; SBE : SMADs Binding Element, région de fixation des facteurs de transcription SMADs. TBE : TCF/LEF Binding Element, région de fixation des facteurs de transcription TCF/LEF (T-Cell Factor /Lymphoid Enhancer-binding Factor) ; β-CAT : β-caténine.

La première hypothèse repose sur le fait que l'inhibition du complexe transcriptionnel β-caténine/CBP favorise l'activité transcriptionnelle de la β-caténine par la formation d'un complexe incluant p300. Les protéines CBP et p300 sont des protéines homologues qui, par leur fonction acétyltransférase, induisent l'acétylation des histones, empêchant ainsi le recrutement du répresseur Groucho/TLE et permettant le passage de la chromatine dans un état ouvert. Les cofacteurs CBP et p300 jouent un rôle majeur dans l'initiation de la transcription dépendante de la β-caténine et de TCF/LEF (Hecht et al., 2000; Holmqvist and Mannervik, 2013), bien qu'ils ne soient pas impliqués dans les mêmes complexes transcriptionnels. Ils sont responsables de la transcription différentielle des gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine permettant la régulation de fonctions cellulaires différentes. Ainsi, il a été décrit que le complexe β-caténine/CBP est primordial pour le maintien du caractère souche des cellules et leur prolifération cellulaire, alors que le complexe β-caténine/p300 est majoritairement impliqué dans la différenciation cellulaire (Ma et al., 2005; Miyabayashi et al., 2007; Takahashi-Yanaga and Kahn, 2010). Il a été démontré par *Ma et al.* que l'ICG-001 induisait le recrutement de p300 au lieu de CBP dans le complexe transcriptionnel β-

caténine/TCF/LEF sur le promoteur du gène *BIRC5*, ayant pour conséquence la répression de la transcription de ce gène dans la lignée cellulaire de cancer de côlon humain SW480 (Ma et al., 2005). De plus, *Miyabayashi et al.* ont mis en évidence un “switch” transcriptionnel d’un complexe β -caténine/CBP vers un complexe β -caténine/p300 en présence d’ICG-001 dans des cellules souches embryonnaires murines. La présence de CBP dans le complexe transcriptionnel β -caténine/TCF/LEF favorisait la prolifération cellulaire et le maintien de la pluripotence avec la transactivation des gènes *OCT4* et *SOX*, contrairement à la présence de p300 initiant la différenciation cellulaire associée à une augmentation de l’expression de *cMYC* (Miyabayashi et al., 2007). Pour étudier le rôle des cofacteurs transcriptionnels de la β -caténine (CBP et p300), deux inhibiteurs pharmacologiques sont fréquemment utilisés : l’ICG-001 décrit précédemment, et l’IQ-1 (Miyabayashi et al., 2007; Sasaki et al., 2013). L’IQ-1 se fixe sur la sous-unité PR72/130 de la phosphatase de Sérine/Thréonine PP2A, diminuant ainsi la phosphorylation de la protéine p300 (sur le résidu Sérine 89), bien que le mécanisme ne soit pas encore clairement identifié (Figure 18). Etant donné que la phosphorylation de la protéine p300 sur la Sérine 89 permet d’augmenter son affinité pour la β -caténine, l’IQ-1 favorise la formation des complexes β -caténine/CBP (Miyabayashi et al., 2007) et est donc utilisé pour réverser le déplacement d’équilibre transcriptionnel vers p300 induit par l’ICG-001.

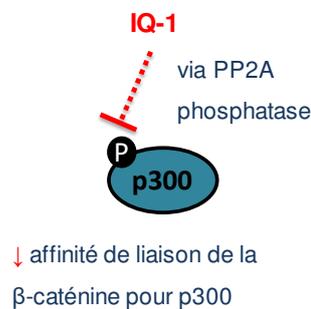


Figure 18 : Mécanisme d'action indirect de l'IQ-1. L'IQ-1 diminue la phosphorylation du cofacteur de transcription p300 de façon indirecte, au travers de l'activité de la phosphatase PP2A. La déphosphorylation de p300 diminue fortement l'affinité de l'interaction β -caténine/p300.

La seconde hypothèse de travail fait intervenir l'activation de la voie de signalisation TGF β /SMADs, qui a déjà été associée à une augmentation de la migration et de la dissémination métastatique des cellules d'ostéosarcome (Lamora et al., 2014, 2015). En effet, les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et TGF β /SMADs sont étroitement liées dans la biologie des cellules. Dans les chondrocytes, il a été rapporté que la protéine SMAD3 favorisait la translocation nucléaire de la β -caténine et que la formation d'un complexe β -caténine/SMAD3/4 stabilisait la protéine β -caténine et permettait ainsi d'augmenter son activité transcriptionnelle (*AXIN2*, *BIRC5*) (Zhang et al., 2010). Des études ont également

montré des interactions entre les protéines SMAD3 et β -caténine dans des complexes transcriptionnels régulant les gènes cibles *PAI-1*, *VEGF-A* et *GLI2* (Clifford et al., 2008; Dennler et al., 2009; Fuxe et al., 2010). De même, un complexe transcriptionnel β -caténine/CBP/SMAD3 est impliqué dans l'activation du gène α -SMA via des domaines SBE (SMADs Binding Element) sur son promoteur, dans les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires (Zhou et al., 2012). L'activation de la voie de signalisation TGF β /SMADs peut être ciblée par l'utilisation de la molécule chimique SD-208, inhibiteur spécifique du récepteur T β RI, empêchant ainsi l'activation de la cascade de signalisation et donc limitant la disponibilité de SMAD3 dans le compartiment nucléaire (Figure 19).

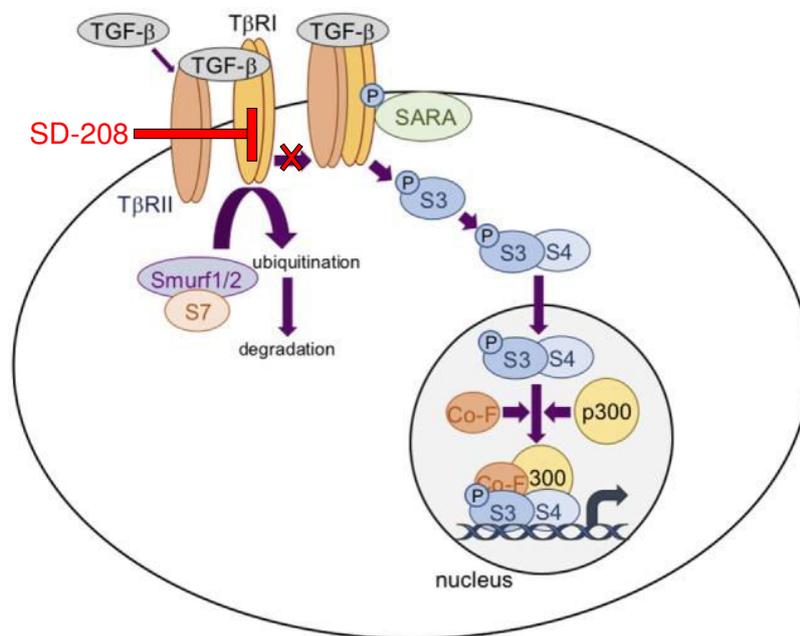


Figure 19 : Action du SD-208 sur la voie de signalisation canonique du TGF β . L'activation par le TGF β (Tumor Growth Factor) de la voie de signalisation induit l'hétérotétramérisation des dimères T β RI et T β RII, conduisant à la phosphorylation des récepteurs T β RI, libérant leur activité Sérine/Thréonine kinase. SMAD3 (S3) est phosphorylée et activé par T β RI, ce qui permet sa dissociation avec la protéine SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) et son association avec le médiateur SMAD4 (S4). Le complexe protéique S3/S4 est alors importé dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cibles. La protéine SMAD7 (S7) recrute les E3-ubiquitine ligases Smurf1-2 conduisant à la dégradation des récepteurs T β RI, régulant négativement la voie de signalisation du TGF β (Verrecchia and Rédini, 2018). Le SD-208 agit au niveau des récepteurs de la voie de signalisation du TGF β en inhibant l'activité du récepteur T β RI. Co-F : co-facteur.

Afin de tester les deux hypothèses formulées précédemment, différentes approches ont été mises en place pour essayer d'inhiber complètement ou partiellement les effets d'un traitement ICG-001 sur le profil transcriptomique des cellules d'ostéosarcome. Tout d'abord, une approche pharmacologique avec l'IQ-1 a été mise en place pour évaluer la potentielle implication de p300 dans les effets observés suite à un traitement à l'ICG-001. Cette approche a été complétée par la génération de cellules KHOS transduites avec des shRNA spécifiquement dirigés contre p300. Ensuite, la seconde hypothèse a été testée avec l'utilisation du SD-208 pour déterminer le rôle de la voie du TGF β dans les modifications transcriptomiques et phénotypiques observées en présence d'ICG-001. Une approche moléculaire a également été développée par transfection des cellules KHOS avec un siSMAD3. Le ciblage de ces différentes voies de signalisation a pour objectif de décrypter les mécanismes impliqués dans les effets transcriptomiques et pro-migratoires se mettant en place dans les cellules d'ostéosarcome suite à l'inhibition du complexe transcriptionnel CBP/ β -caténine.

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Culture cellulaire et réactifs

Les lignées cellulaires d'ostéosarcome humain KHOS (ATCC-CRL 1544, American Type Culture Collection), MG63 (ATCC-CRL 1427) et SJSA1 (ATCC-CRL 2098) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) additionné de 10% de SVF (sérum de veau fœtal, HyClone, Utah, USA) et placées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

Le Wnt3a recombinant humain (R&D systems, 5036-WN-010) a été dilué dans du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) supplémenté de 0,1% BSA (Bovine Serum Albumin). Le TGF β 1 provient de R&D systems (Minneapolis). L'ICG-001 (R&D Systems, 4505/10), le SD-208 (Sigma, S7071) et l'IQ-1 (Sigma, SML1147) ont été dilués dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde, Sigma) qui a donc été utilisé comme contrôle.

2.2.2. Génération de cellules modifiées stablement avec un shRNA

La génération de cellules exprimant stablement des shRNA dirigés spécifiquement contre l'ARNm de p300 a été réalisée à l'aide de particules lentivirales produites sur la base du système "Vira Power Lentiviral expression system" (Invitrogen). Les cellules HEK293FT ont été co-transfectées avec des plasmides auxiliaires et un plasmide d'intérêt : shRNA CT (shCT, MISSION® pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA, SHC002, Sigma) ou shRNA EP300 (shEP300 n°39885 et n°39886, Sigma). Les surnageants

contenant les particules lentivirales ont été collectés après 48h de transfection et ont été concentrés par ultracentrifugation. Les cellules KHOS ont été transduites avec les différentes particules lentivirales avec une MOI de 20 (Multiplicity Of Infection). Les cellules KHOS non transduites ont été appelées NT. Une pression de sélection a été appliquée au cours de l'entretien des cellules avec un traitement à la Puromycine à une concentration de 5µg/mL (Sigma, P8833-25MG), qui n'a pas été maintenu lors des expérimentations.

2.2.3. siRNA interférence

Les cellules KHOS ont étéensemencées en plaque 6 puits pour atteindre 50-70% de confluence au moment de la transfection. Les siRNA utilisés ont été : le siRNA Control-A (siRNA-A, Santa Cruz, sc-37007) et le siRNA SMAD3 (h) (Santa Cruz, sc-38376). Les transfections ont été réalisées avec de la Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific, 13778075) et du milieu Opti-MEM (Opti-Minimum Essential Medium, ThermoFisher, 11058-02) en suivant les recommandations des fournisseurs. Les cellules non transfectées ont été appelées Nt. Les expériences utilisant des cellules transfectées avec des siRNA ont été réalisées 24h après transfection.

2.2.4. Gène rapporteur luciférase

Cette technique permet d'étudier la réponse transcriptionnelle dépendante de la β -caténine en réponse au Wnt3a. Dans cette étude, deux plasmides ont été utilisés :

- Le plasmide contrôle pRL-TK (Dennler, 1998) contenant le promoteur faible HSV-TK contrôlant la transcription du gène codant la luciférase Renilla. Ce plasmide est co-transfecté avec le plasmide d'intérêt dans les cellules afin de normaliser les variations d'efficacité de transfection.

- Le plasmide M50 Super 8x TOPFlash (gracieusement donné par Randall Moon (Addgene plasmid # 12456 ; <http://n2t.net/addgene:12456> ; RRID:Addgene_12456)) comportant le gène rapporteur codant la luciférase Firefly sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant 7 fois l'élément de réponse au complexe β -caténine/TCF/LEF (TBE, TCF/LEF Binding Element).

Les cellules KHOS, à 50-60% de confluence, ont été co-transfectées avec 100ng du plasmide pRL-TK, et 250ng du plasmide TOPFlash, grâce à l'agent de transfection Jet PEI selon les recommandations du fournisseur (Polyplus Transfection). Le milieu de transfection a été remplacé par du DMEM sans SVF, 6h après la transfection. Après 16h, les cellules ont été traitées pendant 24h selon les différentes conditions : contrôle, DMSO, Wnt3a (25ng/mL), ICG-001 (5µM), IQ-1 (0,1, 1, 5 et 10µM). Dans les conditions avec inhibiteurs, le

traitement Wnt3a a été appliqué 1h après le début du traitement inhibiteur. L'extraction des protéines et la mesure des activités luciférase ont été réalisées avec le kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), et un luminomètre à deux injecteurs (Berthold), selon les recommandations du fournisseur. Les rapports de luminescence émise par la luciférase Firefly sur la luminescence émise par la luciférase Renilla ont été relativisés sur les conditions contrôles Wnt3a de chacune des expériences pour l'analyse des résultats.

2.2.5. RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction)

Les cellules KHOS, MG63, SJSa1 ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Les cellules adhérentes ont été traitées selon les différentes conditions : DMSO, ICG-001 (5-10 μ M), IQ-1 (1-10 μ M), SD-208 (10 μ M) pendant 24h. L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit NucleoSpin RNA selon les recommandations du fournisseur (Macherey Nagel, Düren, Allemagne). La concentration en acides nucléiques de chaque échantillon a ensuite été mesurée par spectrophotométrie à 260nm au Nanodrop (Thermo Scientific, Labtech, France). Les RT ont été réalisées à partir de 2 μ g d'ARN avec le kit Maxima H Minus First Strand cDNA synthesis (Fisher Scientific, 10430470) selon les recommandations du fournisseur. Les qPCR ont été réalisées en utilisant le SYBR select Master Mix (Life Technologies) avec 20ng d'ADNc par réaction, dans un thermocycleur Quant Studio 7 (Life Technologies). Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le tableau 1. Les gènes de référence 18S, GAPDH (Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase) et β 2M (β -2-Microglobuline) ont été utilisés comme contrôles endogènes pour normaliser les résultats. L'analyse repose ensuite sur le principe du cycle seuil (Threshold Cycle Ct) et le calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permettant de comparer l'expression relative normalisée des différents gènes.

Gènes	Séquences des amorces	Gènes	Séquences des amorces
<i>h18S</i>	Qf: cgattggatggttagtgagg	<i>hGAPDH</i>	Qf: tgggtgtgaacctgagaagtatg
	Qr: agttcgaccgtcttctcagc		Qr: ggtgcaggaggcattgct
<i>hAXIN2</i>	Qf: atgattccatgtccatgacg	<i>hMYC</i>	Qf : caccagcagcgactctga
	Qr: cttcacactgcatgattt		Qr : gatccagactctgacctttgc
<i>hβ2M</i>	Qf: ttctggcctggaggctatc	<i>hPAI-1</i>	Qf : gcttttgtgtgcctggtagaaa
	Qr: tcaggaaattgactttcattc		Qr : tggcaggcagtacaagagtga
<i>hBIRC5</i>	Qf: aggaccaccgcatctctacat	<i>hSMAD3</i>	Qf : tgctctccaatgtcaacagg
	Qr: aagtctggctcgttctcagt		Qr : gacctcccctccgatgtagt
<i>hCBP</i>	Qf : cgtgtcacagggacaggtg	<i>hVEGF-A</i>	Qf : ccttgctgctctacctccac
	Qr : gtgactgtgtcactggaggg		Qr : ccacttcgtgatgattctgc
<i>hEP300</i>	Qf : tgatgcctcgaataactccacaa		
	Qr : catagcccataggcgggtg		

Tableau 1 : Séquences des couples d'amorces utilisés pour les qPCR.

2.2.6. Western Blot

Les cellules KHOS ont étéensemencées à raison de 200 000 cellules par puits. Les cellules adhérentes ont été privées de nutriments pendant 4h avec du DMEM 0%SVF, puis les traitements DMSO ou ICG-001 (10µM) ont été ajoutés pendant 15min, 60min ou 180min. Les protéines ont été extraites avec un kit d'enrichissement nucléaire et cytoplasmique selon le protocole du fournisseur (Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Scientific #78835). Les protéines extraites ont été dosées à l'aide d'un kit de dosage protéique BCA (acide bicinchoninique, kit Sigma) puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines P-cJUN Ser63 (Cell Signaling Technology #9261), VINCULIN (Cell Signaling Technology #13901) et HISTONE H3 (Active Motif #MABI 0301).

2.2.7. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Les cellules KHOS et MG63 ont étéensemencées à 200 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Après adhérence des cellules, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM 5% SVF contenant le DMSO ou l'ICG-001 (5-10 μ M), dans un volume final de 1,5mL par puits. Après 48h ou 72h de traitement, les milieux ont été récoltés et congelés à -20°C. L'ELISA a été réalisé avec le kit Human VEGF DuoSet ELISA (R&D Systems, DY293B-05), selon les recommandations du fournisseur. Afin de prendre en compte l'effet anti-prolifératif de l'ICG-001 (observable dès 24h de traitement aux concentrations de 5 ou 10 μ M), les résultats ont été normalisés sur la quantité totale de protéines par puits, obtenue à l'aide d'un dosage protéique BCA (acide bicinchoninique, kit Sigma).

2.2.8. Test de prolifération cellulaire

Les cellules KHOS ont étéensemencées en plaque 96 puits à 2 000 cellules par puits. Les cellules ont été traitées pendant 24h, 48h ou 72h avec du DMSO, de l'ICG-001 (0,1 à 10 μ M) et/ou de l'IQ-1 (0,001 à 10 μ M). Ensuite, les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde 1% final (Sigma) puis rincées à l'eau distillée, et colorées avec du Cristal Violet (Sigma). Les puits ont été rincés à l'eau distillée, avant d'être séchés pendant 24h. Le Cristal Violet a été solubilisé avec une solution de Sorenson, et l'absorbance a été lue à 570nm avec l'appareil Victor² (Perkin Elmer).

2.2.9. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules KHOS ont étéensemencées à raison de 200 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Les cellules adhérentes ont été traitées pendant 24h ou 48h avec le DMSO, l'ICG-001 (5 μ M) et/ou l'IQ-1 (5-10 μ M). Les milieux de culture, de lavage et les cellules ont été récoltés. Les cellules ont été fixées pendant 30 minutes à 4°C avec de l'éthanol 70% puis lavées, centrifugées et resuspendues dans du tampon phospho-citrate (Na₂HPO₄ 0,2M, acide citrique C₆H₈O₇ 0,1M, pH 7,5) pendant 30 minutes à température ambiante afin d'être perméabilisées. Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans du DPBS additionné de 0,12% Triton 100X, 0,12mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, Lonza) et 100 μ g/mL RNase A (Promega A797c), et incubées 30 minutes à 37°C afin d'éliminer les brins d'ARN pouvant biaiser l'analyse. Un intercalant de l'ADN, l'iodure de propidium a été ajouté à une concentration finale de 5 μ g/mL, pendant 20 minutes à 4°C. La fluorescence émise par l'iodure de propidium a été observée par cytométrie en flux à la plateforme Cytocell (LSRII, Becton Dickinson). Les données recueillies ont été analysées avec le logiciel

Flowlogic, permettant d'obtenir la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

2.2.10. Test de migration cellulaire en chambre de Boyden

Les cellules KHOS ont étéensemencées en plaque 6 puits à 200 000 cellules par puits. Les cellules adhérentes ont été pré-traitées pendant une durée de 24h avec les molécules suivantes : DMSO, ICG-001 (5-10 μ M), IQ-1 (10 μ M), SD-208 (10 μ M). Les cellules ont ensuite été décollées, comptées etensemencées dans les chambres de Boyden (filtre pores de 8 μ m) à 50 000 cellules par insert dans du DMEM 2% SVF, pour une durée de 8h à 37°C. Un gradient de concentration en SVF a été créé en ajoutant du DMEM 10% SVF au fond des puits. Après 8h, les cellules ayant migrées ont été fixées au glutaraldéhyde 1% puis, après lavage à l'eau distillée, colorées au Cristal Violet. Les photos des inserts ont été prises au microscope (Axioskop 40, Zeiss) au grossissement X20. Les champs (14 par insert) ont ensuite été traités par le logiciel Image J permettant de comptabiliser le nombre de cellules, qui a été représenté avec les moyennes du nombre de cellules par champs par insert, la valeur de la condition DMSO de chaque expérience a été placée à 100. De plus, au moment de l'ensemencement dans les inserts, chaque condition expérimentale a étéensemencée dans des puits de plaque 96 puits, afin de vérifier l'homogénéité desensemencements en réalisant un test de viabilité cellulaire 8h après l'ensemencement. En cas d'ensemencement hétérogène, une correction a été appliquée sur les résultats.

2.2.11. Analyses Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux groupes. $\alpha=0,05$ et une p-value $\leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

2.3. Résultats

2.3.1. L'ICG-001 augmente l'expression de plusieurs gènes cibles de la β -caténine dans les cellules d'ostéosarcome

Notre précédente étude a permis de mettre en évidence un effet antiprolifératif mais pro-migratoire et pro-métastatique de l'ICG-001, un inhibiteur de la transcription dépendante de la β -caténine et de du co-activateur transcriptionnel CBP. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que des mécanismes indépendants de l'interaction β -caténine/CBP pouvaient se mettre en place au sein des cellules d'ostéosarcome en présence d'ICG-001 pour participer à l'induction de la migration observée en réponse à cet inhibiteur. Dans un premier temps, l'expression de différentes cibles transcriptionnelles de la β -caténine a donc été analysée par RT-qPCR dans les trois lignées cellulaires d'ostéosarcome humain KHOS, MG63 et SJSA1 suite à un traitement par l'ICG-001 pendant 24h. L'ICG-001 augmente significativement l'expression des gènes *cMYC*, *PAI-1* et *VEGF-A* dans les cellules KHOS, MG63 et SJSA1, à l'exception du gène *PAI-1* dans les cellules SJSA-1 (augmentation non significative) (Figure 20A). De plus, l'induction de l'expression du gène *VEGF-A* se traduit par une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules KHOS et MG63. En effet, le traitement à l'ICG-001 permet d'induire une augmentation d'un facteur proche de 2 pour les cellules KHOS et proche de 3 pour les cellules MG63 comparativement aux conditions contrôles (Figure 20B). Cette hausse de la sécrétion de VEGF est observée après 48h et se maintient après 72h de traitement ICG-001.

Ces premiers résultats nous ont permis de poser deux hypothèses quant à l'augmentation de ces gènes cibles de la β -caténine en présence d'ICG-001. D'une part, la transactivation des gènes *cMYC* et *VEGF-A* pourraient résulter d'un "switch" transcriptionnel de CBP vers p300 en présence d'ICG-001 (Ma et al., 2005; Miyabayashi et al., 2007; Takahashi-Yanaga and Kahn, 2010). En effet, le cofacteur CBP n'étant plus capable d'interagir avec la β -caténine, celle-ci pourrait se lier à la protéine p300, qui intervient dans la transcription de gènes cibles différents. D'autre part, l'augmentation de l'expression des gènes *VEGF-A* et *PAI-1* ainsi que l'augmentation des capacités migratoires des cellules d'ostéosarcome pourraient être expliquée par une activation de la voie de signalisation du TGF β (Clifford et al., 2008; Lamora et al., 2014, 2015).

La diminution d'une partie de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine pourrait ainsi être responsable de l'augmentation de l'activité d'une autre voie de signalisation telle que la voie canonique du TGF β , de façon β -caténine dépendante ou indépendante.

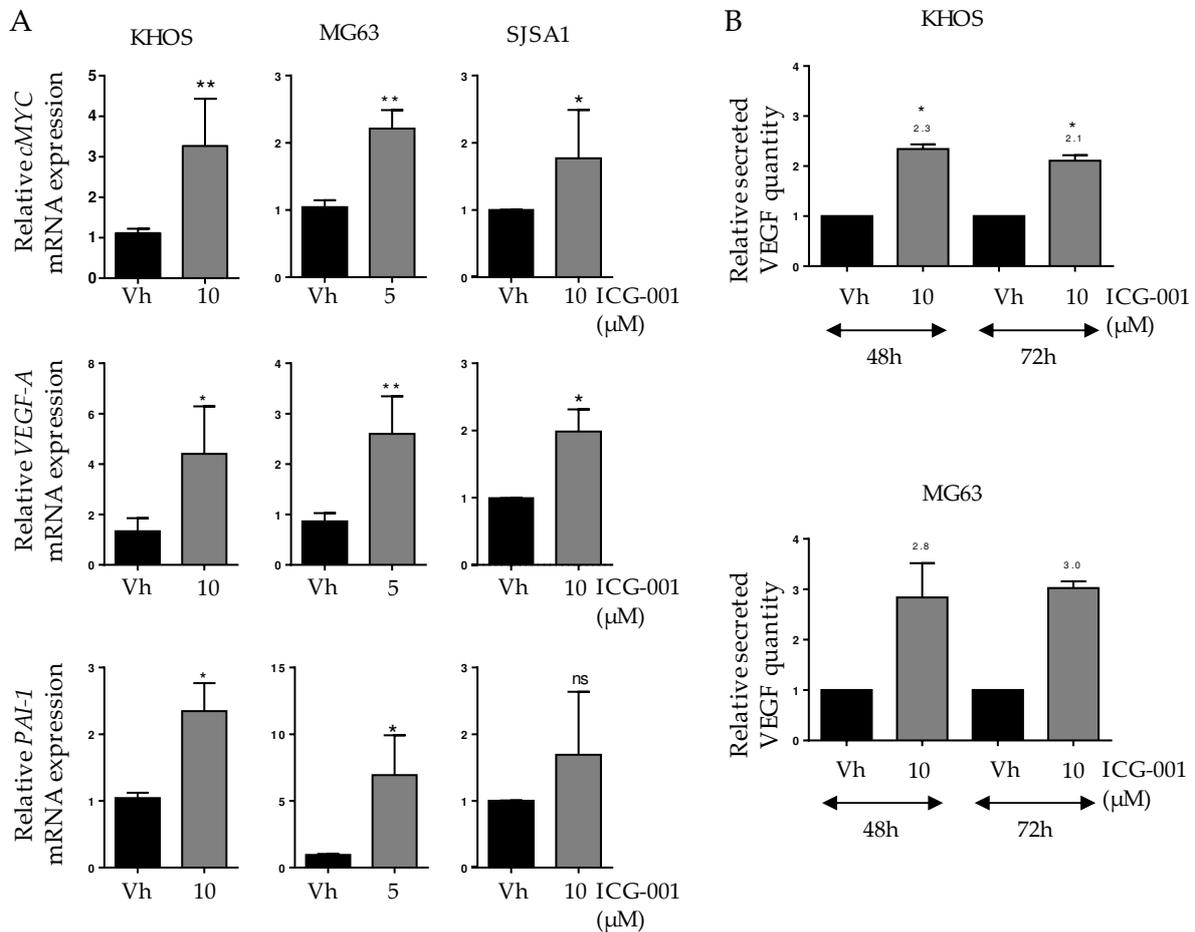


Figure 20 : L'ICG-001 augmente l'expression des gènes *cMYC*, *VEGF-A*, *PAI-1* et la sécrétion de VEGF. (A) Les cellules KHOS, MG63 et SJSA1 ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle véhicule (Vh, DMSO) ou avec l'ICG-001 (5-10 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) des expressions relatives normalisées des gènes *cMYC*, *VEGF-A* et *PAI-1*, déterminées par RT-qPCR (N \geq 3). Mann-Whitney *, p<0,05 et **, p<0,01 versus DMSO. **(B)** Les cellules KHOS ou MG63 ont été traitées pendant 48h ou 72h, avec le contrôle véhicule (DMSO) ou avec l'ICG-001 (5-10 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de la quantité relative de VEGF dans le milieu de culture, normalisées par la quantité totale de protéines, obtenues par ELISA (N=3 KHOS, N=2 MG63). Mann-Whitney *, p<0,05 versus DMSO. VEGF-A : Vascular endothelial growth factor A.

2.3.2. Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001

L'IQ-1 est un inhibiteur pharmacologique bloquant de façon indirecte l'interaction entre la β -caténine et p300 et favorisant ainsi la formation de complexe β -caténine /CBP aux dépends d'un complexe β -caténine/p300. Tout d'abord, l'effet de l'IQ-1 sur la régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine a été testé par la technique de gène rapporteur en réponse à une stimulation par Wnt3a. La présence de Wnt3a augmente fortement l'activité luciférase, traduisant une augmentation de la transcription dépendante de la β -caténine et du facteur de transcription TCF/LEF. Le traitement des cellules KHOS avec des concentrations croissantes d'IQ-1 (0,1 à 10 μ M), ne semble pas modifier l'activité luciférase induite par Wnt3a, suggérant que l'implication de p300 dans la transcription dépendante de la β -caténine n'est pas prédominante dans ces cellules (Figure 21A). Une diminution de 65% de l'activité luciférase induite par Wnt3a est observée dans les cellules KHOS en réponse à un traitement à l'ICG-001 par rapport aux cellules stimulées au Wnt3a mais non traitées (Figure 21B). L'administration d'IQ-1 semble restaurer partiellement l'activité luciférase en présence d'ICG-001 de manière concentration-dépendante. En effet, l'inhibition de 65% de l'activité luciférase induite par l'ICG-001 seul est réduite à 44% avec la concentration de 5 μ M d'IQ-1, et à 29% en présence d'IQ-1 à 10 μ M (Figure 21B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'interaction entre la β -caténine et p300 reverse partiellement les effets de l'ICG-001, en favorisant potentiellement la transcription dépendante du complexe β -caténine/CBP.

La modulation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine a ensuite été investiguée par RT-qPCR, en présence d'ICG-001 combiné à l'IQ-1. Comme décrit précédemment, l'expression de *AXIN2* et de *BIRC5* est diminuée en présence d'ICG-001 et l'ajout d'IQ-1 ne modifie pas cette réduction d'expression, confirmant que le complexe transcriptionnel responsable de l'expression de ces deux gènes implique la β -caténine et CBP. Concernant les gènes dont l'expression est stimulée par l'ICG-001, on peut noter qu'un traitement avec l'IQ-1 ne semble pas ou peu modifier l'induction de l'expression de *PAI-1* identifiée en présence d'ICG-001 (Figure 21C). De façon intéressante, un traitement avec IQ-1 prévient partiellement l'induction de l'expression de *cMYC* dépendante de l'ICG-001 quelle que soit la concentration utilisée (1 ou 10 μ M). En effet, l'ajout d'IQ-1, aux concentrations de 1 μ M et 10 μ M, permet de réduire respectivement de 28% et de 24% l'induction de l'expression de *cMYC* dépendante de l'ICG-001 utilisé à la concentration de 10 μ M. De même, en présence d'une concentration plus faible d'ICG-001 (1 μ M), la

stimulation de l'expression de *cMYC* est réduite de 21% et de 39% en présence d'IQ-1 1µM ou d'IQ-1 10µM, respectivement (Figure 21C). Il est également important de noter qu'un traitement avec l'IQ-1 à 10µM seul réduit de 30% l'expression de *cMYC* comparativement à la condition véhicule DMSO. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de *cMYC* pourrait être, au moins partiellement, sous le contrôle d'un complexe transcriptionnel impliquant la β -caténine et p300. Seule la plus forte concentration d'IQ-1 (10µM) est capable de diminuer l'expression de *VEGF-A* de 20%, seule ou en combinaison avec de l'ICG-001 (Figure 21C). Ces résultats suggèrent donc que la régulation de *VEGF-A* par un complexe impliquant la β -caténine et p300 reste minoritaire dans les cellules KHOS.

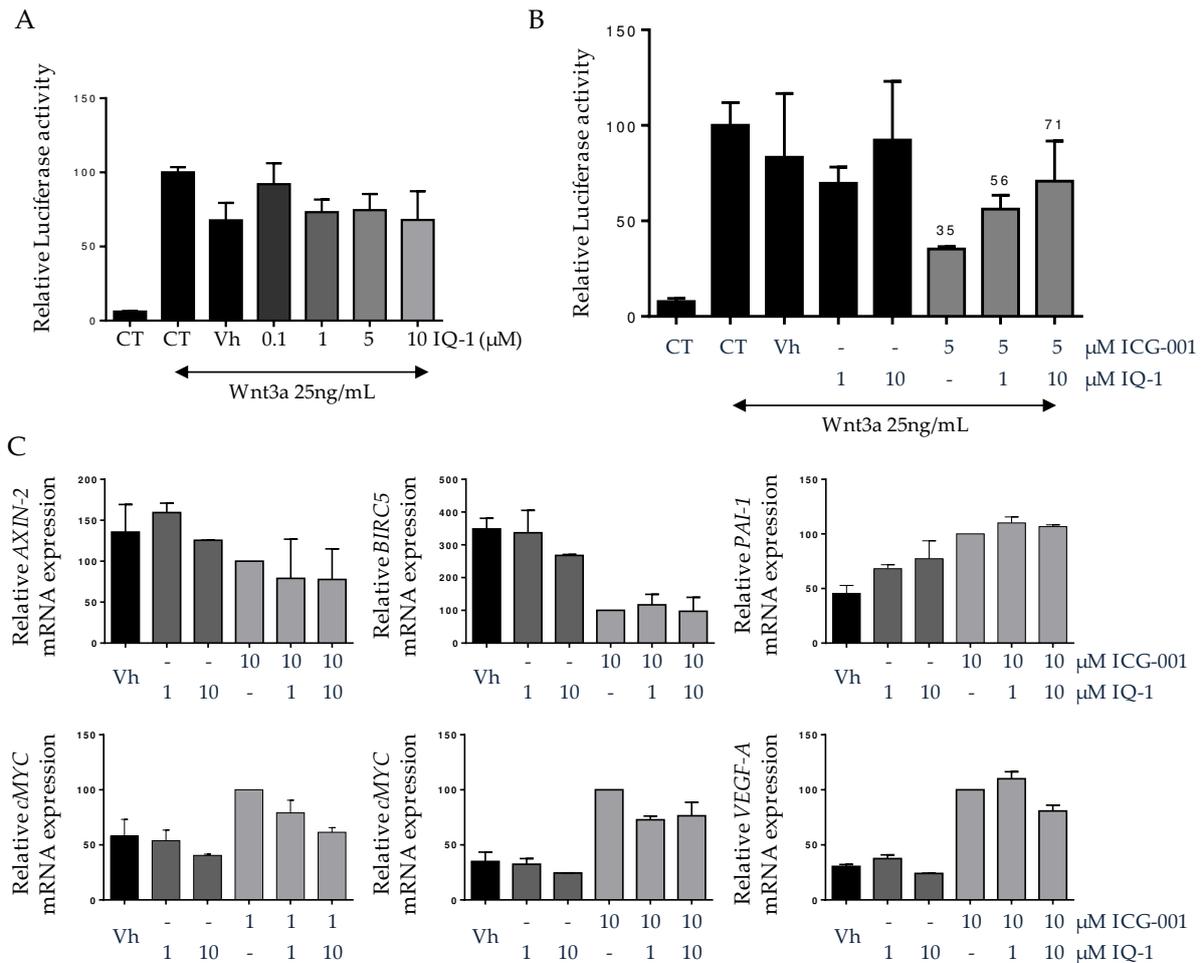
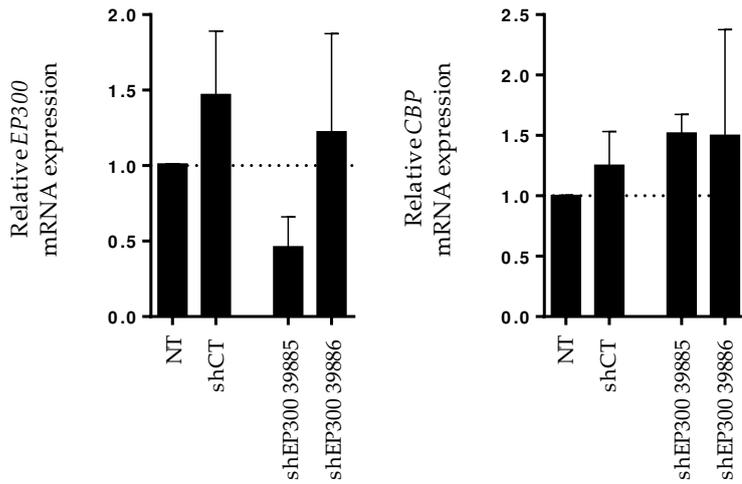


Figure 21 : Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 avec l'IQ-1 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001. (A) Les cellules KHOS ont été co-transfectées avec les constructions plasmidiques TOPFLASH et pRL-TK, puis traitées avec le contrôle véhicule (Vh, DMSO) ou avec l'ICG-001 (0,1-10 μ M) pendant 1h. Puis, les cellules ont été traitées avec du Wnt3a (25ng/mL) pendant 24h. Les histogrammes représentent les moyennes relatives (SD) de duplicats techniques (N=1), du rapport des activités luciférase Firefly/Renilla. **(B)** Les cellules KHOS ont été co-transfectées avec les constructions plasmidiques TOPFLASH et pRL-TK, puis traitées avec le contrôle véhicule (Vh, DMSO) l'ICG-001 (5 μ M) ou l'IQ-1 (1-10 μ M) pendant 1h. Puis, les cellules ont été traitées avec du Wnt3a (25ng/mL) pendant 24h. Les histogrammes représentent les moyennes relatives (SD) de duplicats techniques (N=1), du rapport des activités luciférase Firefly/Renilla. **(C)** Les cellules KHOS ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle véhicule (DMSO) ou avec l'ICG-001 (1-10 μ M) et/ou avec l'IQ-1 (1-10 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de l'expression relative normalisée des gènes indiqués en ordonnées, déterminées par RT-qPCR (N=2). Les conditions ICG-001 1 μ M ou ICG-001 10 μ M sont rapportées à la valeur de 100 fixée pour le contrôle véhicule.

Afin de compléter les résultats concernant l'implication de p300 dans la régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine et les effets de l'ICG-001, des shRNA dirigés spécifiquement contre les ARNm de p300 ont été produits pour modifier stablement les cellules KHOS. Après vérification par RT-qPCR, seul le shEP300 39885 diminue l'expression du gène *EP300* de 54% par rapport aux cellules non transduites, et d'environ 69% par rapport aux cellules transduites avec le shCT. Le shEP300 39886 ne permet pas, quant à lui, de réduire stablement le niveau d'expression des ARNm de p300 (Figure 22A). Etant donné que p300 et CBP appartiennent à la même famille, l'expression de CBP a été analysée afin de vérifier qu'un mécanisme compensatoire conduisant à la surexpression de CBP ne se mettait pas en place dans les cellules. Comme observé sur la Figure 22A, la diminution d'expression de *EP300* ne semble pas ou très peu moduler celle de *CBP*. Au vu de ces résultats, les effets de l'ICG-001 n'ont été investigués que dans les cellules KHOS shEP300 39885. Tout d'abord, la diminution d'expression des gènes *AXIN2* et *BIRC5* n'est pas modulée par la diminution de l'expression de p300 confirmant les résultats obtenus en présence d'IQ-1 et donc l'implication majeure d'un complexe transcriptionnel impliquant la β -caténine et CBP dans la régulation de ces gènes (Figure 22B). Contrairement à l'effet, bien que partiel, observé en présence d'IQ-1, la modification des cellules avec le shEP300 ne module pas l'expression *cMYC* et *VEGF-A* en présence d'ICG-001 à la concentration de 10 μ M (Figure 22B). En revanche, l'analyse de l'expression de *PAI-1* montre une augmentation plus importante en présence d'ICG-001 dans les cellules shEP300 39885. Ce résultat reste cependant à nuancer car aucune augmentation de l'expression de *PAI-1* n'a pu être observée suite au traitement à l'ICG-001 dans les cellules NT et shCT (Figure 22B), contrairement à ce qui a été observé précédemment dans les cellules KHOS (Figure 20A). Finalement, les différents ciblage de p300 dans les cellules KHOS semblent en faveur d'une implication modérée mais présente de p300 dans le changement de profil transcriptomique induit par l'ICG-001.

A



B

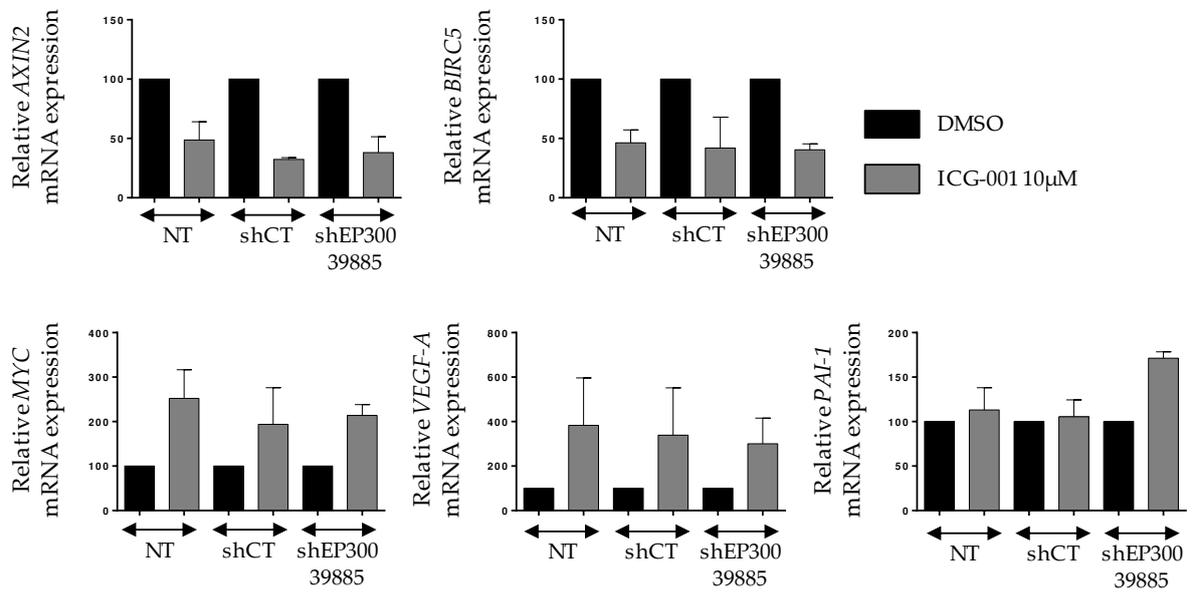


Figure 22 : Le ciblage du cofacteur transcriptionnel p300 avec un shEP300 semble modifier le profil transcriptomique des cellules KHOS en présence et en absence d'ICG-001. (A) Validation par RT-qPCR des lignées cellulaires KHOS shEP300 (N=1). **(B)** Les cellules KHOS NT, shCT et shEP300 39885 ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle véhicule (DMSO) ou avec l'ICG-001 (10µM). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de l'expression relative normalisée des gènes indiqués en ordonnées, déterminées par RT-qPCR (N=2). Les conditions DMSO de chacune des lignées ont été fixées à 100.

2.3.3. La réponse aux inhibiteurs ICG-001 et IQ-1 semble hétérogène au sein des lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome

La modulation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine en présence d'ICG-001 en combinaison avec l'IQ-1 a été investiguée par RT-qPCR, dans la lignée cellulaire MG63 de la même façon que pour la lignée cellulaire KHOS. Tout d'abord, l'ICG-001 à une concentration de 5 μ M induit l'expression des gènes *MET* et *JUN* d'un facteur supérieur à 2, cette augmentation n'ayant pas été observée dans les cellules KHOS. De plus, un traitement avec l'IQ-1 en présence ou en absence d'ICG-001 semble capable de diminuer leurs expressions, suggérant l'implication d'un complexe composé de la β -caténine et de p300 dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes (Figure 23).

Ensuite, de façon similaire aux cellules KHOS, l'induction ICG-001-dépendante de l'expression du gène *cMYC* est réduite de 28% et de 20% en présence d'IQ-1 à des concentrations de 1 μ M et 10 μ M respectivement (Figure 23). L'expression de *VEGF-A*, également fortement induite par l'ICG-001 ne semble pas être modulée par l'IQ-1 dans les cellules MG63. En revanche, la différence majeure entre les cellules MG63 et KHOS est observée au niveau de l'expression du gène *PAI-1*. Comparativement aux cellules KHOS, l'induction de *PAI-1* en présence d'ICG-001 est fortement réduite en présence d'IQ-1 aux concentrations de 1 μ M (62%) et 10 μ M (78%) (Figure 23). Ces données mettent en évidence que certains mécanismes de régulation transcriptionnelle diffèrent d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome à l'autre. Dans cette étude, il semblerait que le profil transcriptomique des cellules MG63 après un traitement à l'ICG-001 soit différent de celui des cellules KHOS. D'une part, l'augmentation de l'expression des gènes *MET* et *JUN* par l'ICG-001 n'est observée que dans les cellules MG63, et, d'autre part, l'expression de *PAI-1* semble être régulée par un complexe transcriptionnel incluant la β -caténine et p300 dans ces cellules alors qu'elle semble être indépendante de p300 dans les cellules KHOS. En conclusion, l'hétérogénéité tumorale des ostéosarcomes complexifie la compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine dans ces cellules. Un mécanisme de régulation identifié dans une lignée cellulaire ne pourra pas forcément être transposé à une autre lignée d'ostéosarcome.

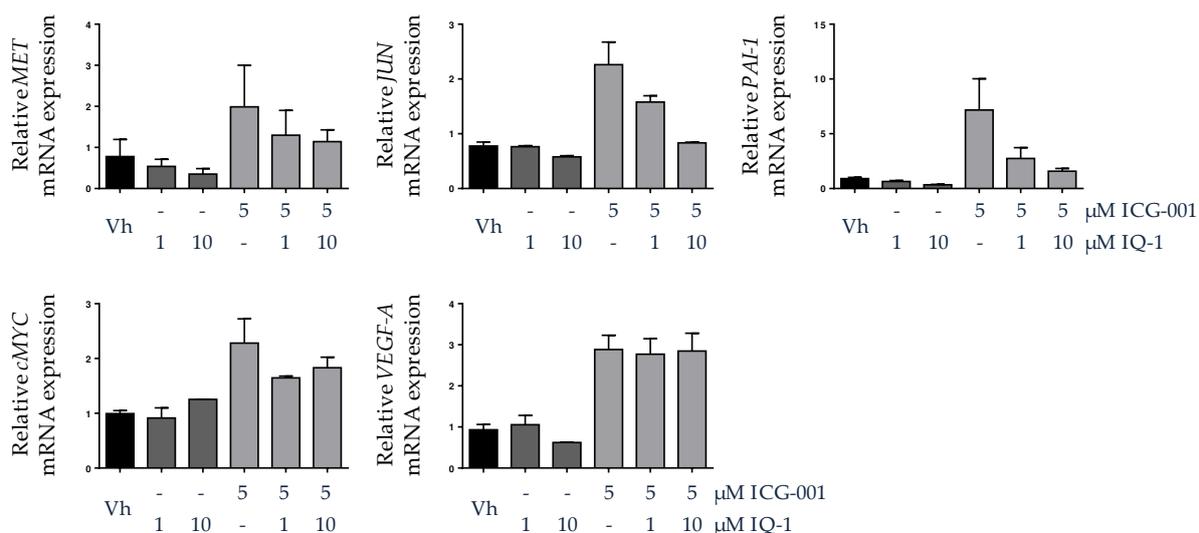


Figure 23 : Modifications du profil transcriptomique des cellules MG63 entre un traitement ICG-001 seul et la combinaison ICG-001/IQ-1. Les cellules MG63 ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle DMSO (Vh) ou l'ICG-001 (5 μ M) et/ou l'IQ-1 (1-10 μ M). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de l'expression relative normalisée des gènes indiqués en ordonnées, déterminées par RT-qPCR (N=2).

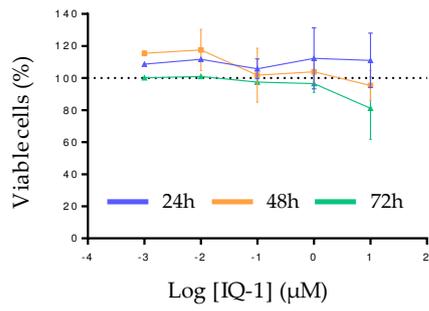
2.3.4. Le ciblage de p300 ne semble pas affecter la prolifération cellulaire mais pourrait impacter la migration cellulaire induite par l'ICG-001

L'ICG-001 inhibant fortement la prolifération des cellules KHOS, la régulation de cette fonction semble être majoritairement sous le contrôle de gènes dont l'expression dépend de la β -caténine et de CBP. Afin de compléter ces résultats obtenus précédemment, l'effet de l'IQ1 sur la prolifération des cellules KHOS, traitées pendant 24, 48 et 72h avec des concentrations croissantes d'IQ-1 (de 0,001 à 10 μ M) a été analysé. Tout d'abord, un traitement IQ-1 seul n'affecte pas significativement la prolifération cellulaire, bien qu'une légère diminution soit observée après 72h de traitement à la concentration de 10 μ M (Figure 24A). Dans un second temps, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes d'ICG-001 qui inhibe fortement la prolifération cellulaire de manière concentration-dépendante, en combinaison avec une concentration fixe d'IQ-1 de 10 μ M. Quel que soit le temps de traitement utilisé (24h ou 48h), l'IQ1 n'est pas capable de moduler la diminution de viabilité cellulaire induite par l'ICG-001 dans les cellules KHOS, les courbes en présence ou non d'IQ-1 étant quasiment superposées (Figure 24B). Ces résultats ont ensuite été complétés par des analyses du cycle cellulaire après marquage des cellules à l'iodure de propidium. L'ICG-001 induit un blocage des cellules KHOS en phase G0/G1, le pourcentage de cellules dans cette phase du cycle cellulaire passant de 43% en présence

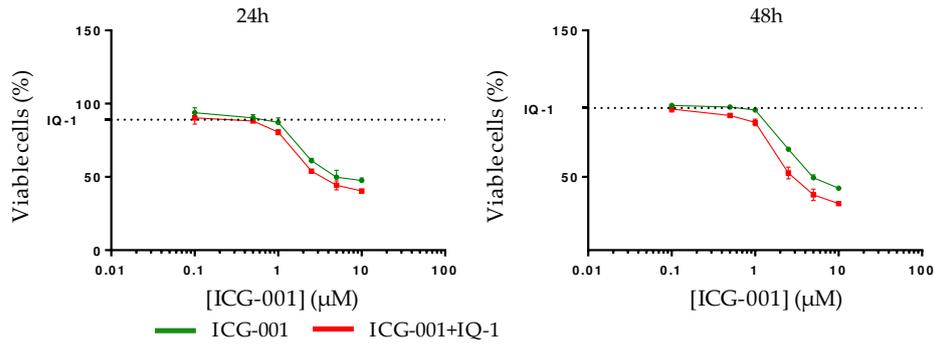
de DMSO à 78% après 24h de traitement à une concentration de 5 μ M d'ICG-001 (Figure 24C). L'ajout de différentes concentrations d'IQ-1 (1-10 μ M) ne semble pas modifier la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, que ce soit dans les conditions contrôle ou en présence d'ICG-001 (Figure 24C). Ces résultats confirment donc que la prolifération des cellules KHOS semble être majoritairement contrôlée par la β -caténine en association avec CBP, p300 ne semblant pas jouer de rôle clé dans ce mécanisme.

Suite à l'étude précédente, nous avons émis l'hypothèse qu'un "switch transcriptionnel" pourrait être à l'origine de l'effet pro-migratoire et pro-métastatique de l'ICG-001 dans les cellules d'ostéosarcome. C'est pourquoi, l'impact de l'IQ-1 et de l'inhibition de p300 par un shRNA sur la migration cellulaire a été investigué. D'une part, l'IQ-1 seul à la concentration de 10 μ M, ne semble pas influencer la migration des cellules KHOS (Figure 16D). Cependant, alors que l'ICG-001 induit une augmentation d'un facteur 2 de la migration cellulaire, l'ajout d'IQ1 (10 μ M) en combinaison avec l'ICG-001 diminue de 15% la migration cellulaire en comparaison de l'ICG-001 seul (Figure 24D). Ce résultat intéressant nécessite d'être confirmé en reproduisant cette expérience. D'autre part, alors que la migration des cellules NT ou shCT augmente d'un facteur supérieur à 2 en présence d'ICG-001, la migration des cellules shEP300 39885 n'est multipliée que par 1,38 comparativement à leurs contrôles respectifs (Figure 24E). Ces résultats suggèrent donc que p300 pourrait jouer un rôle, bien que partiel, dans l'induction de la migration observée en présence d'ICG-001. Cependant, il est probable qu'il ne s'agisse pas du seul mécanisme impliqué dans la modification du transcriptome et du profil migratoire observée dans les cellules d'ostéosarcome suite à un traitement à l'ICG-001. L'autre hypothèse avancée est la potentielle implication de la voie de signalisation du TGF β dans l'augmentation de la migration cellulaire en présence d'ICG-001. La voie de signalisation TGF β /SMADs a donc été ciblée à l'aide de l'inhibiteur pharmacologique SD-208.

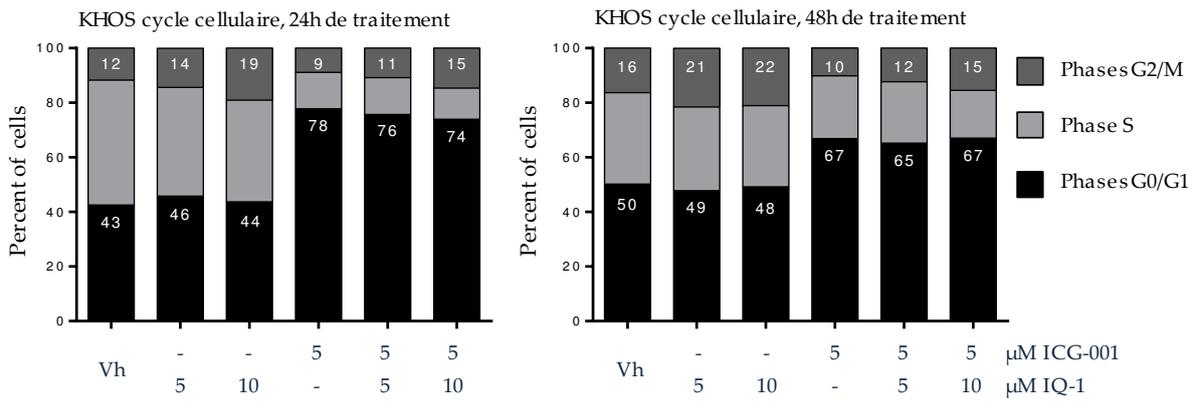
A



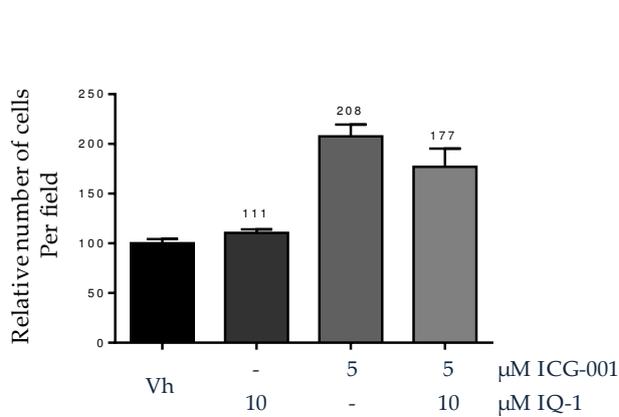
B



C



D



E

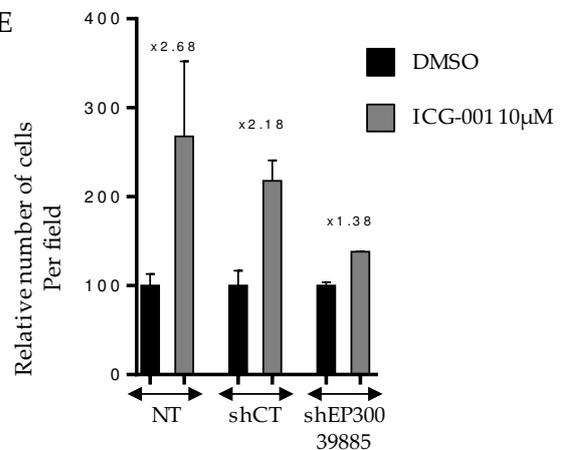


Figure 24 : Le ciblage de p300 ne semble pas affecter la prolifération cellulaire mais pourrait impacter la migration cellulaire induite par l'ICG-001. (A) Les cellules KHOS ont été traitées pendant 24h, 48h (N=3) ou 72h (N=2), avec des concentrations croissantes d'IQ-1 (0,001 à 10 μ M). A la fin des temps de traitement, un test de viabilité cellulaire au cristal violet a été réalisé. Les valeurs représentées sont les moyennes (SD) relativisées par rapport à la condition DMSO (ligne pointillée à 100) des différentes expériences réalisées. **(B)** Les cellules KHOS ont été traitées pendant 24h ou 48h (N=1, n=3), avec une gamme de concentrations croissantes d'ICG-001 (0,1 à 10 μ M), combinée ou non avec un traitement avec l'IQ-1 (10 μ M). A la fin des temps de traitement, un test de viabilité au cristal violet a été réalisé. Les valeurs représentées sont les moyennes (SD) relativisées par rapport à la condition DMSO (à 100). La ligne pointillée indique la valeur moyenne de la condition traitée uniquement avec de l'IQ-1 (10 μ M). **(C)** Les cellules KHOS ont été traitées pendant 24h (N=2) ou 48h (N=1) avec du DMSO, de l'ICG-001 (5 μ M) et/ou de l'IQ-1 (5-10 μ M). A la fin des temps de traitement, le cycle cellulaire a été analysé par marquage des cellules avec de l'iodure de propidium puis analyse de la fluorescence par cytométrie en flux. La répartition des cellules a été observée dans les différentes phases du cycle cellulaire. **(D)** Les cellules KHOS ont été pré-traitées avec le contrôle véhicule (Vh, DMSO), de l'ICG-001 (5 μ M), de l'IQ-1 (10 μ M) ou une combinaison d'ICG-001 (5 μ M) et d'IQ-1 (10 μ M) pendant 24h. Les cellules ont ensuite étéensemencées en chambre de Boyden pour une durée de 8h. Les histogrammes représentent les moyennes (SD) d'une expérience réalisée en duplicat (N=1, n=2). **(E)** Les cellules KHOS NT, shCT ou shEP300 39885 ont été pré-traitées avec le contrôle véhicule (Vh, DMSO) ou de l'ICG-001 (10 μ M) pendant 24h. Les cellules ont ensuite étéensemencées en chambre de Boyden pour une durée de 8h. Les histogrammes représentent les moyennes (SD) d'une expérience réalisée en duplicat (N=1, n=2).

2.3.5. Le ciblage de la voie du TGF β ne semble pas affecter la migration induite par l'ICG-001 dans les cellules KHOS

Afin d'évaluer une potentielle implication de la voie canonique du TGF β dans les effets observés en présence d'ICG-001 dans les cellules KHOS, une analyse de l'expression des gènes cibles de la β -caténine a été réalisée suite à un traitement des cellules par la combinaison SD-208/ICG-001. Comme démontré à plusieurs reprises, l'ICG-001 inhibe l'expression des gènes *AXIN2* et *BIRC5*. En revanche, l'ajout de SD-208 à la concentration de 10 μ M semble restaurer l'expression des gènes *AXIN2* et *BIRC5* à leurs niveaux de base, indiquant que la voie de signalisation du TGF β semble jouer un rôle dans la régulation de ces gènes dans les cellules KHOS (Figure 25A). Le SD-208 utilisé seul à 10 μ M diminue fortement les expressions des gènes *cMYC*, *VEGF-A* et *PAI-1*. Ces résultats, en accord avec la littérature décrivant ces gènes comme étant également des cibles de la voie de signalisation du TGF β , rendent difficile l'analyse des résultats obtenus suite à un traitement combinant l'ICG-001 et le SD-208. Néanmoins, cette association semble potentialiser l'augmentation de l'expression des gènes *cMYC* et *VEGF-A*, par rapport au traitement ICG-

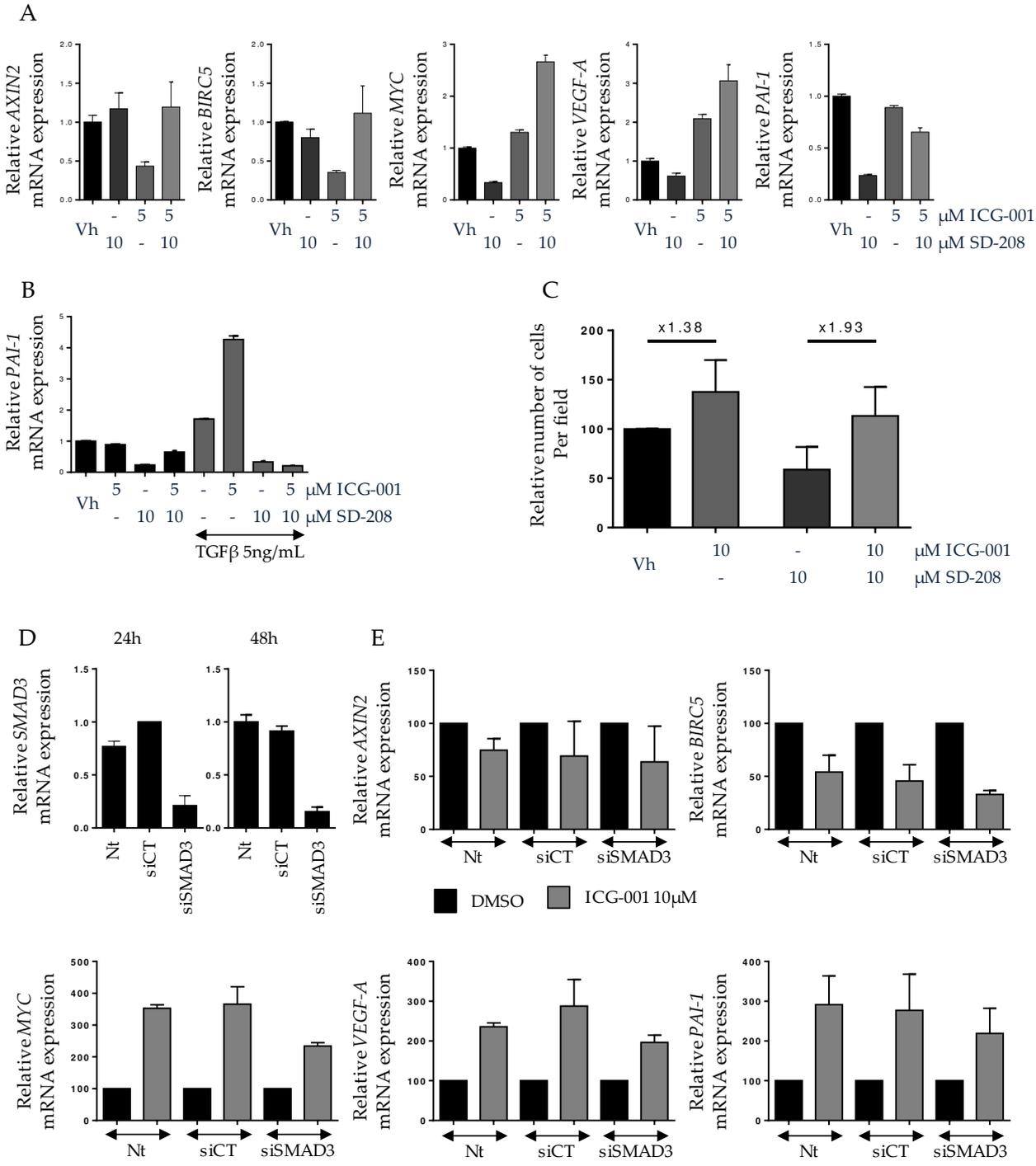
001 seul (Figure 25A), ce qui pourrait être en accord avec une augmentation de la transcription dépendante de la β -caténine et de p300 suite à une inhibition soit du complexe β -caténine/CBP, soit d'un complexe impliquant SMAD3. Concernant le gène *PAI-1*, le traitement ICG-001 à une concentration de 5 μ M ne semble pas suffisante pour augmenter son expression. En revanche, alors que le SD-208 seul diminue de 76% l'expression de *PAI-1*; cette réduction n'est plus que de 35% lorsque l'ICG-001 est combiné au SD-208 (Figure 25A). De plus, l'ICG-001 semble potentialiser l'augmentation de l'expression de *PAI-1* en réponse à une stimulation avec du TGF β 1 (Figure 25B), effet inhibé par le SD-208. Ces différents résultats confirment donc que la régulation de *PAI-1* est dépendante de la voie de signalisation du TGF β dans les cellules KHOS et suggèrent que l'inhibition du complexe transcriptionnel β -caténine/CBP pourrait potentialiser l'activation de cette voie de signalisation.

Afin de déterminer si la potentialisation de la voie du TGF β en présence d'ICG-001 joue un rôle dans les effets pro-migratoires de cet inhibiteur, un test de migration cellulaire a été réalisé en présence de SD-208. Il faut tout d'abord noter que le SD-208 à une concentration de 10 μ M réduit la migration des cellules KHOS. Cependant, l'induction de la migration cellulaire par l'ICG-001 n'est pas modulée (voire même légèrement augmentée) par la présence de SD-208, suggérant que l'effet pro-migratoire est indépendant de l'activité de la voie canonique du TGF β (Figure 25C).

En parallèle des expériences avec le SD-208, les cellules KHOS ont été transfectées avec des siSMAD3 afin de mieux comprendre l'implication de SMAD3 dans les effets observés suite à un traitement par l'ICG-001. La diminution transitoire de l'expression de *SMAD3* est importante 24h et 48h après transfection avec une réduction d'environ 79% comparativement au siCT (Figure 25D). En revanche, contrairement aux résultats obtenus avec le SD-208, la transfection des cellules avec un siSMAD3 ne prévient pas la diminution de l'expression des gènes *AXIN2* et *BIRC5* en présence d'ICG-001 (Figure 25E). De plus, bien que les effets observés semblent très modérés, le siSMAD3 semble diminuer légèrement la stimulation de l'expression de *cMYC* (x 2,34 avec le siSMAD3 vs x 3,66 avec siCT), de *VEGF-A* (x 1,96 avec le siSMAD3 vs x2,88 avec siCT) et de *PAI-1* (x 2,19 avec le siSMAD3 vs x 2,77 avec siCT) par l'ICG-001 (Figure 25E). Ces résultats ne permettent donc pas de confirmer ceux obtenus suite à l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation du TGF β .

Pour terminer, la migration des cellules KHOS transfectées avec le siSMAD3 en présence ou en absence d'ICG-001 a été évaluée. L'inhibition de l'expression de SMAD3 ne semble pas affecter la stimulation de la migration cellulaire en présence d'ICG-001, suggérant que la protéine SMAD3 n'est pas impliquée les effets pro-migratoires de l'ICG-001

(Figure 25F). Les résultats obtenus suite à l'inhibition pharmacologique ou moléculaire de la voie de signalisation du TGFβ s'accordent donc sur le fait que cette voie de signalisation ne semble pas être impliquée dans les effets pro-migratoires de l'ICG-001.



F

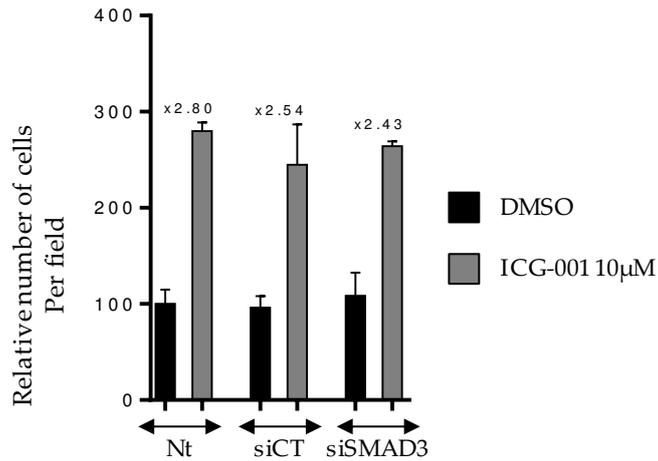


Figure 25 : Le ciblage de la voie du TGF β ne semble pas affecter la migration induite par l'ICG-001 dans les cellules KHOS. (A) (B) Les cellules KHOS ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle véhicule (DMSO) ou l'ICG-001 (5µM) et/ou le SD-208 (10µM) et/ou le TGF β (5ng/mL). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de l'expression relative normalisée des gènes indiqués en ordonnées, déterminées par RT-qPCR (N=1, n=2). Les conditions véhicule DMSO sont relativisées à 1. (C) Les cellules KHOS ont été pré-traitées avec le contrôle véhicule, l'ICG-001 (10µM), le SD-208 (10µM) ou une combinaison d'ICG-001 (10µM) et de SD-208 (10µM) pendant 24h. Les cellules ont ensuite étéensemencées en chambre de Boyden pour une durée de 8h. Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat (N=2, n=2). (D) Validation, par RT-qPCR, des cellules KHOS qui ont été transfectées avec un siCT ou avec un siSMAD3, 24h ou 48h après transfection (N=1, n=2). (E) Les cellules KHOS Nt, siCT et siSMAD3 ont été traitées pendant 24h, avec le contrôle véhicule ou l'ICG-001 (10µM). Les histogrammes représentent les moyennes (SD) de l'expression relative normalisée des gènes indiqués en ordonnées, déterminées par RT-qPCR (N=2, n=2)). Les conditions DMSO de chacune des lignées sont relativisées à 100. (F) Les cellules KHOS Nt, siCT ou siSMAD3 ont été pré-traitées avec le contrôle véhicule ou l'ICG-001 (10µM) pendant 24h. Les cellules ont ensuite étéensemencées en chambre de Boyden pour une durée de 8h. Les histogrammes représentent les moyennes (SD) d'une expérience réalisée en duplicat (N=1, n=2).

2.4. Discussion

Au cours de notre première étude, nous avons pu montrer que l'ICG-001 inhibe l'activité transcriptionnelle dépendante du complexe β -caténine/CBP, en association avec une diminution de la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Cependant, une induction de la migration cellulaire ainsi que de la dissémination métastatique *in vivo* ont également pu être observées, suggérant qu'un mécanisme secondaire à l'inhibition de l'interaction entre la β -caténine et CBP se mettait en place dans ces cellules. L'analyse de l'expression d'un nombre plus important de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine a ainsi permis de mettre en évidence l'augmentation de certains de ces gènes cibles tels *cMYC*, *VEGF-A*, *PAI-1* en présence d'ICG-001 dans les lignées cellulaires d'ostéosarcome (Figure 20A). Deux hypothèses ont alors été formulées, la première impliquant le remplacement du cofacteur de transcription CBP par p300 et donc modifiant le profil transcriptomique des cellules (Figure 14A). La seconde hypothèse implique l'activation de la voie de signalisation du TGF β et son interaction avec la voie Wnt/ β -caténine (Figure 14B). Concernant les gènes surexprimés suite au traitement à l'ICG-001, *cMYC* est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes favorisant la prolifération cellulaire. Une surexpression de *cMYC* est souvent associée à une prolifération excessive et à l'induction de l'oncogenèse dans différents cancers tels que le cancer colorectal ou des sarcomes indifférenciés des tissus mous (Barrios et al., 1994; Rennoll and Yochum, 2015; Smith et al., 2015). La régulation de l'expression de *cMYC* par l'ICG-001 a déjà été décrite dans un modèle cellulaire de cancer du côlon et est en accord avec les résultats que nous décrivons. En effet, une augmentation de l'expression de *cMYC* a été mise en évidence suite à un traitement à l'ICG-001, la transcription du gène étant activée par un complexe transcriptionnel incluant p300 (Ma et al., 2005). De plus, malgré l'induction de *cMYC*, l'ICG-001 induit un blocage du cycle cellulaire en phases G0/G1, associé à une inhibition de l'expression protéique de la CYCLINE D1 dans ces cellules issues de cancer du côlon. Le gène *PAI-1* est un gène codant pour une protéine impliquée dans la régulation de la protéolyse et le remodelage de la matrice extracellulaire. Son expression est principalement régulée par la voie canonique du TGF β mais peut également être modulée par la voie Wnt/ β -caténine. Les expressions protéique et transcriptomique de *PAI-1* induites par un traitement au TGF β 1 sont ainsi inhibées par l'ICG-001 dans des cellules épithéliales rénales, ce qui entraîne une diminution de la migration de ces cellules (Hao et al., 2011; He et al., 2010). Ces résultats décrits dans des lignées cellulaires non tumorales, bien qu'à l'encontre de ceux que nous avons obtenus, permettent néanmoins de confirmer une régulation croisée entre les voies de signalisation Wnt et TGF β . Le *VEGF-A* est un facteur pro-angiogénique jouant un rôle majeur dans la mise en place du réseau vasculaire (Hoeben et al., 2004). La transcription du gène *VEGF-A* est sous le

contrôle du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF/LEF comme en témoigne la présence de sites de liaison à TCF dans son promoteur (Zhang et al., 2001). Cependant, comme cela a pu être montré dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires, la voie Wnt/ β -caténine n'est pas la seule voie de signalisation régulant l'expression de ce gène pro-angiogénique (Qu et al., 2014). De plus, un traitement de 72h à l'ICG-001 induit une augmentation de l'expression du gène *VEGF-A* dans un modèle de cellules épicrodiques, en accord avec l'induction de *VEGF-A* observée en présence d'ICG-001 dans les cellules d'ostéosarcome (Sasaki et al., 2013). Un point commun important entre ces 3 gènes est que leur expression peut être régulée par différents mécanismes, notamment par le complexe transcriptionnel β -caténine/p300 (plutôt que β -caténine/CBP), ou par d'autres voies de signalisation complexifiant la compréhension des processus impliqués dans leur augmentation en présence d'ICG-001.

La première hypothèse établie à partir de ces résultats est la possibilité d'un "switch" transcriptionnel de CBP vers p300, induisant l'expression de gènes dépendant, au moins en partie, d'un complexe transcriptionnel composé de la β -caténine liée à ce cofacteur de transcription. C'est pourquoi, une approche pharmacologique utilisant la molécule chimique IQ-1, qui inhibe l'interaction entre la β -caténine et p300, a été mise en place. Tout d'abord, l'IQ-1, en diminuant l'affinité entre la β -caténine et p300 semble réduire l'inhibition ICG-001-dépendante de l'activité luciférase induite par le Wnt3a (Figure 21B). Ce résultat suggère que l'IQ-1 favorise l'activité transcriptionnelle dépendante du complexe β -caténine/CBP comme cela a été rapporté dans des cellules embryonnaires murines (Miyabayashi et al., 2007). En revanche, l'IQ-1 ne semble pas affecter la diminution d'expression des gènes *AXIN2* et *BIRC5* induite par l'ICG-001, confirmant que le complexe transcriptionnel régulant l'expression de ces gènes implique les protéines β -caténine et CBP (Figure 21C) (Ma et al., 2005). En accord avec la littérature, un traitement de 24h avec de l'IQ-1 a tendance à diminuer l'expression du gène *cMYC* en présence ou non d'ICG-001, suggérant l'implication d'un complexe transcriptionnel β -caténine/p300 dans la transcription de *cMYC* (Figure 21C) (Miyabayashi et al., 2007). En revanche, la diminution de l'expression de *VEGF-A* en présence d'IQ-1 semble plus faible et nécessite l'utilisation d'une concentration de 10 μ M pour être observée. Ces résultats suggèrent que l'initiation de la transcription de ce gène par un complexe dépendant de la β -caténine et de p300 ne constitue pas le mécanisme de régulation prédominant dans les cellules d'ostéosarcome KHOS (Figure 21C). De plus, l'IQ-1 n'exerce pas d'effet inhibiteur sur l'expression de *PAI-1* dans les cellules KHOS, donc sa régulation semble indépendante d'un complexe de transcription impliquant la β -caténine associée à p300 (Figure 21C). Cependant, des résultats divergents ont été obtenus dans les cellules MG63. En particulier, l'induction de *PAI-1* par l'ICG-001 dans les cellules MG63 est

réversée par des concentrations croissantes d'IQ-1 (Figure 23), suggérant l'implication de p300 dans la régulation transcriptionnelle de ce gène dans les cellules MG63. Ces résultats opposés permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité tumorale au sein des ostéosarcomes. Ainsi, différentes lignées cellulaires, même originaires d'une même pathologie, peuvent répondre de manière différente à des stimuli ou à des inhibiteurs. Des résultats obtenus dans une de ces lignées ne sont donc pas forcément transposables aux autres lignées. De plus, cette hétérogénéité tumorale se retrouve au sein d'une même tumeur, toutes les cellules ne répondant pas de façon équivalente au traitement.

L'inhibiteur IQ-1 se fixe sur les sous-unités régulatrices PR72/130 de l'enzyme Sérine/Thréonine phosphatase PP2A conduisant à la déphosphorylation de la protéine p300, via un mécanisme qui n'a pu être identifié à l'heure actuelle (Figure 18) (Miyabayashi et al., 2007). Cependant, la protéine PP2A, dont il existe environ 80 combinaisons possibles compte tenu des différentes sous-unités qui peuvent la composer, est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, et le métabolisme cellulaire (Sangodkar et al., 2016). Par conséquent, le ciblage de cette protéine pourrait être à l'origine d'effets secondaires en plus de la déphosphorylation de p300. C'est pourquoi, il était nécessaire de confirmer les résultats obtenus suite à un traitement par IQ-1 par une autre approche permettant un ciblage direct de la protéine p300. C'est pourquoi, une approche moléculaire par shRNA dirigé spécifiquement contre l'ARNm de p300 a été mise au point dans un second temps, mais seul le shRNA 39885 a permis d'obtenir une inhibition de l'expression de *EP300* de 54% et de 69% par rapport aux cellules NT et shCT respectivement (Figure 22A). Cette inhibition d'expression de *EP300* diminue l'expression basale de *cMYC* (10%), mais augmente l'expression de *PAI-1* d'un facteur 2,5 dans les cellules shEP300, comparativement aux cellules KHOS transduites avec le shCT, ou non transduites. Comme observé suite au traitement avec l'IQ-1, le shEP300 a tendance à légèrement diminuer l'induction des gènes *cMYC* et *VEGF-A*, indiquant que p300 pourrait jouer un rôle, bien que partiel, dans la régulation de l'expression de ces gènes. Cependant, ces observations devront être confirmées avec un autre shRNA peut-être plus efficace que le shEP300 39885. En parallèle, l'utilisation du shEP300 semble confirmer la légère augmentation de l'expression de *PAI-1* observée en présence d'IQ-1, suggérant que la régulation transcriptionnelle de *PAI-1* est indépendante d'un complexe de transcription β -caténine/p300 (Figure 22B).

Les résultats obtenus au cours de cette étude semblent donc en faveur de la mise en place d'une régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine et de p300 suite au blocage de l'activité du complexe impliquant la β -caténine et CBP. Néanmoins, ce "switch transcriptionnel de CBP vers p300" ne permet pas à lui seul d'expliquer les effets observés sur la modulation de la transcription dépendante de la β -caténine induite par le traitement à l'ICG-001. C'est pourquoi, une seconde hypothèse impliquant la voie de signalisation du TGF β a été avancée.

L'activation de la transcription de *VEGF-A* et de *PAI-1* et l'augmentation de la migration cellulaire constituent des arguments en faveur d'une activation de la voie de signalisation du TGF β en présence d'ICG-001 (Benckert et al., 2003; Dennler, 1998). Les effets d'un inhibiteur chimique de la voie du TGF β ont donc été évalués dans les cellules d'ostéosarcome. Tout d'abord, l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β par le SD-208 permet de restaurer l'expression de l'*AXIN2* et de *BIRC5* en présence d'ICG-001 (Figure 25A). Ces résultats sont en cohérence avec la littérature qui décrit un rôle inhibiteur de la voie de signalisation du TGF β sur l'expression du gène *AXIN2*, d'une part, lors de la maturation des chondrocytes (Dao et al., 2007) et de *BIRC5*, d'autre part, dans des cellules épithéliales de prostate (Chen et al., 2016). Ensuite, l'inhibiteur chimique de la voie du TGF β (SD-208) utilisé seul diminue l'expression de *VEGF-A*, de *PAI-1* et de *cMYC* (Figure 25A), ce qui est également en accord avec la littérature. En effet, le gène *VEGF-A* est un gène cible de la voie du TGF β , avec la présence d'un complexe transcriptionnel β -caténine/SMAD3 au niveau de son promoteur (Clifford et al., 2008). Il en est de même pour l'expression du gène *PAI-1*, qui est connu depuis de nombreuses années comme étant la signature de l'activation de la voie de signalisation du TGF β (Dennler, 1998). En revanche, si la régulation de l'expression de *cMYC* par la voie de signalisation du TGF β semble faire consensus, les effets de l'activation de cette voie sur l'expression de *cMYC* varient selon les modèles cellulaires étudiés. Ainsi, il a été montré que la stimulation des cellules de cancer de l'ovaire par le TGF β transactive le gène *cMYC* (Choi et al., 1997) alors qu'un traitement au TGF β réduit l'expression de *cMYC* dans des kératinocytes humains immortalisés (Yagi et al., 2002). En revanche dans notre étude, le SD-208 combiné à l'ICG-001 potentialise l'augmentation de l'expression de *cMYC* et de *VEGF-A* (Figure 25A) suggérant que cette augmentation en présence d'ICG-001 est indépendante de la voie du TGF β , mais pourrait être liée à la transcription dépendante de p300. L'expression de *PAI-1* semble, quant à elle, être sous la dépendance de la voie de signalisation du TGF β , car un traitement simultané de TGF β 1 et d'ICG-001 potentialise l'expression du gène *PAI-1*, ce qui est complètement réprimé en présence de SD-208 (Figure 25B).

Cependant, les différents résultats obtenus en présence de SD-208 ne semblent pas se confirmer avec l'utilisation d'un siRNA dirigé contre SMAD3. Les mécanismes d'action différents, entre l'inhibiteur SD-208 ciblant toute la voie de signalisation du TGF β et le siSMAD3 plus spécifique que la molécule chimique, pourraient expliquer ces divergences. En effet, un siSMAD3 n'affecte pas les expressions de SMAD2 et SMAD4, protéines pouvant également jouer un rôle de facteur de transcription en absence de SMAD3 (Lucarelli et al., 2018).

La modulation de l'expression des gènes *c-MYC*, *VEGF-A* et *PAI-1* peut être associée à l'augmentation de la migration observée en présence d'ICG-001 étant donné que ces gènes ont déjà été décrits comme favorisant la migration cellulaire. En effet, différentes approches moléculaires (shRNA ou siRNA dirigés contre cMYC), ont mis en évidence que la sous-expression de cMYC inhibait la migration et l'invasion cellulaire dans des modèles de carcinome hépatocellulaire et d'ostéosarcome (Huang et al., 2015a; Xu et al., 2014; Zhao et al., 2013). La protéine PAI-1 est également impliquée dans la migration cellulaire et dans la néoangiogenèse en permettant le recrutement et la migration de cellules endothéliales (Czekay et al., 2011; Isogai et al., 2001). Ainsi, une forte expression de la protéine PAI-1 est corrélée à l'augmentation de la migration cellulaire et de la dissémination métastatique dans les ostéosarcomes (Hirahata et al., 2016). De même, le VEGF est un facteur pro-angiogénique très connu pour induire la migration des cellules endothéliales, et qui joue donc un rôle primordial dans la formation de nouveaux vaisseaux, étape nécessaire au processus métastatique (Wang et al., 2011). Ainsi, son implication dans la régulation de la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules tumorales, telles que les cellules de carcinome hépatocellulaire, a pu être démontrée (Zhang et al., 2012). L'analyse de la régulation transcriptionnelle de ces gènes en présence d'ICG-001 semble être en faveur d'une induction de *cMYC* et de *VEGF-A* dépendante, au moins en partie, d'un complexe incluant la β -caténine et p300, alors que l'expression de *PAI-1* semble être modulée partiellement par la voie de signalisation du TGF β . C'est pourquoi, l'implication de p300 et de la voie de signalisation du TGF β a été analysée dans les effets pro-migratoires de l'ICG-001.

D'une part, les résultats obtenus indiquent que p300 pourrait être impliquée au moins partiellement dans l'augmentation de la migration induite par l'ICG-001. En effet, la migration des cellules transduites pour exprimer un shRNA dirigé contre p300, en présence d'ICG-001 est plus faible que celle des cellules non transduites ou transduites avec un shRNA contrôle (Figure 24E). Cela semble être confirmé avec un traitement IQ-1, bien que l'effet observé soit beaucoup plus modéré (Figure 24D). L'implication de p300 dans les processus migratoires a déjà été décrite dans la littérature mais n'est pas reproductible dans tous les

modèles cellulaires utilisés. D'une part, dans des lignées cellulaires de cancer pulmonaire ou de carcinome nasopharyngé, l'expression de la protéine p300 augmente la migration et l'invasion cellulaire, associées à des marqueurs de l'EMT, résultats en accord avec notre étude (Hou et al., 2018; Liao et al., 2017). D'autre part, une lignée cellulaire de carcinome de côlon déficiente pour p300 est devenue plus agressive avec une augmentation du profil migratoire et invasif, associé à la présence de marqueurs de l'EMT, suggérant un rôle anti-migratoire de p300 (Krubasik et al., 2006). De plus, une étude réalisée dans un modèle de cellules épicrodiques, importantes pour la régénération tissulaire après un infarctus du myocarde, démontre que l'ICG-001 augmente l'expression du *VEGF-A* et de marqueurs de l'EMT (*VIMENTINE*) favorisant la différenciation des cellules vers un profil migratoire permettant la colonisation de la zone infarctée. De façon intéressante, cet effet est inhibé par un traitement IQ-1, suggérant l'implication de p300 dans cet effet pro-migratoire comme semble l'indiquer notre étude (Sasaki et al., 2013).

D'autre part, bien que plusieurs études aient mis en évidence un effet pro-migratoire et pro-métastatique de la voie de signalisation du TGF β dans les ostéosarcomes (Lamora et al., 2014, 2015) les deux approches (pharmacologique et moléculaire) s'accordent sur le fait que la voie de signalisation TGF β /SMADs ne semble pas être impliquée dans l'augmentation de la migration induite par un traitement par l'ICG-001. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β par le SD-208 ne semble pas réduire l'induction de la migration cellulaire en présence d'ICG-001 (Figure 25C), ce qui est confirmé par l'utilisation d'un siSMAD3 dans les cellules KHOS (Figure 25F).

Cependant, il est prudent de ne pas tirer de conclusions définitives sur les résultats obtenus dans cette partie, car même si les diverses approches (pharmacologique et moléculaire) semblent aboutir à des conclusions similaires, le nombre de réplicats biologiques doit être augmenté. De plus, les conclusions ne peuvent pas être étendues à l'ensemble des lignées cellulaires d'ostéosarcome, compte tenu de l'hétérogénéité de réponse observée entre les cellules KHOS et MG63. Des investigations devront être menées pour confirmer ces résultats dans les cellules MG63, ainsi que dans d'autres lignées cellulaires d'ostéosarcome.

Discussion générale

Perspectives

Conclusion

Discussion générale

L'ostéosarcome constitue la plus fréquente des tumeurs malignes primitives de l'os et survient principalement sur une population jeune avec une médiane d'âge de 18 ans. La survie des patients n'a pas évolué depuis de nombreuses années atteignant 60 à 70% à 5 ans dans les meilleures séries mais seulement 30% en présence de métastases. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement des ostéosarcomes est donc indispensable à l'optimisation des protocoles thérapeutiques. Dans ce contexte, ces travaux de thèse se sont concentrés sur la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dont la dérégulation a été mise en évidence dans les ostéosarcomes sans que son implication ne soit complètement élucidée.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que la β -caténine semble jouer des rôles distincts dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes en fonction des co-activateurs transcriptionnels auxquels elle se lie, ajoutant encore un niveau de complexité quant à l'implication de cette protéine dans la progression des ostéosarcomes. En effet, l'association de la β -caténine avec CBP semble activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération des lignées d'ostéosarcome, une inhibition de l'interaction entre ces deux protéines par l'ICG-001 permettant ainsi de réduire la prolifération de ces cellules en association avec un blocage du cycle cellulaire. Cependant, de façon inattendue, le traitement à l'ICG-001 favorise la migration des cellules d'ostéosarcome KHOS, MG63 et SJSA1 *in vitro*, ainsi que la dissémination métastatique dans un modèle préclinique murin d'ostéosarcome. En parallèle, l'ICG-001 augmente l'expression de certains gènes cibles de la β -caténine tels que *cMYC*, *VEGF-A* et *PAI-1*. Ces résultats soulèvent donc de nouvelles questions sur le rôle que jouent les cofacteurs associés à la β -caténine dans les modifications phénotypiques pouvant se produire dans les cellules d'ostéosarcome au cours du développement de la tumeur. Le cofacteur de transcription p300 est un homologue de CBP mais n'est pas ciblé par l'ICG-001. De plus, un déplacement d'équilibre transcriptionnel d'un complexe incluant la β -caténine et CBP vers un complexe composé de la β -caténine et de p300 en présence d'ICG-001 a déjà été observé dans différentes lignées cellulaires (Ma et al., 2005; Miyabayashi et al., 2007; Sasaki et al., 2013). Par conséquent, afin d'investiguer le rôle potentiel de p300 dans les changements de profils transcriptomiques observés, deux approches ont été privilégiées : la première, par l'utilisation de la molécule chimique IQ-1 qui diminue l'affinité entre la β -caténine et p300, et une seconde approche moléculaire utilisant un shRNA dirigé spécifiquement contre l'ARNm de p300. Les résultats de ces deux approches indiquent que le complexe transcriptionnel incluant la β -caténine et p300 semble impliqué dans l'augmentation de l'expression des

gènes *cMYC* et *VEGF-A* et pourrait participer à l'induction de la migration des cellules d'ostéosarcome. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune preuve directe de ce "switch" transcriptionnel d'un complexe β -caténine/CBP vers un complexe β -caténine/p300 dans les ostéosarcomes n'a pu être apportée (co-immunoprécipitation β -caténine/p300 en présence d'ICG-001).

Malgré la complexité de la voie de signalisation canonique de Wnt, de nouvelles publications continuent de démontrer l'intérêt de cibler cette voie dans les ostéosarcomes. D'une part, des molécules de diverses origines (Icariin, Polyphyllin I, acide ursolique) ont montré des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques dans différentes lignées cellulaires telles que 143B et HOS MNNG *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une diminution de la migration et de l'invasion cellulaire *in vitro*. Les effets anti-tumoraux de ces molécules ont été imputés à une diminution de l'activation de la voie canonique de Wnt et de l'expression de la β -caténine (Chang et al., 2017; Ren et al., 2018; Zhang et al., 2016b). D'autre part, des études ont décrit les effets d'un ciblage direct de la voie Wnt/ β -caténine par des inhibiteurs des Tankyrases (IWR-1 et FH535) qui augmentent la stabilité du complexe de dégradation de la β -caténine, et par conséquent, diminuent l'expression protéique de la β -caténine. L'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules MG63 et HOS MNNG entraîne une diminution de la viabilité cellulaire en association avec un blocage du cycle cellulaire et une induction de l'apoptose (Gustafson et al., 2017; Martins-Neves et al., 2018). Bien que ces études récentes démontrent l'intérêt de cibler la voie Wnt/ β -caténine dans les ostéosarcomes, elles n'évaluent que les conséquences d'une diminution de la β -caténine, et donc d'une inhibition globale de la voie de signalisation, sans tenir compte du fait que la β -caténine puisse intervenir dans plusieurs complexes transcriptionnels et ainsi réguler différentes fonctions cellulaires.

La complexité de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine réside dans le fait qu'elle est modulée par de multiples acteurs (agonistes, antagonistes, récepteurs, co-récepteurs, cofacteurs transcriptionnels) et qu'elle peut interagir avec d'autres voies de signalisation. L'activité transcriptionnelle finale qui résulte de l'activation de cette voie est donc finement régulée (Cruciat and Niehrs, 2013; Komiyama and Habas, 2008; MacDonald et al., 2009). Par conséquent, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine intervient dans de nombreuses fonctions biologiques, rendant difficile la compréhension des mécanismes inhérents à cette voie de signalisation très conservée au cours de l'évolution (Clevers, 2006; Komiyama and Habas, 2008). Un autre point dont il faut tenir compte est la variation de son niveau d'activation en fonction des types cellulaires. Ainsi, une activation plus importante a pu être observée dans des cellules souches en comparaison de cellules à leur stade ultime de différenciation (Duchartre et al., 2016). De même, les niveaux d'activation de base de cette voie de

signalisation varient en fonction du type de cancers. Ainsi, certains types de cancers tels que les carcinomes colorectaux sont qualifiés de cancers "Wnt-dépendants", c'est-à-dire qu'il se développent suite à une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine (80% de mutation inactivatrices d'APC conduisant à une protéine tronquée dans les cancers colorectaux sporadiques) (Kwong and Dove, 2009). Néanmoins, l'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine en oncologie est synonyme d'une forte agressivité tumorale chez les patients (Ghosh et al., 2019; Janssens et al., 2006; Zhan et al., 2017). En ce qui concerne l'ostéosarcome, le niveau d'activation de la voie Wnt/ β -caténine peut varier d'un patient à l'autre, ce qui explique pourquoi toutes les lignées cellulaires issues d'ostéosarcome humain ne présentent pas le même niveau d'activation de cette voie de signalisation et ne répondent donc pas de façon similaire à un traitement ciblant la β -caténine.

La complexité de la voie Wnt/ β -caténine provient également du fait qu'elle peut interagir avec d'autres voies de signalisation, notamment la voie du TGF β et la voie Hippo/YAP. Les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et du TGF β présentent de nombreuses régulations croisées dans des fonctions biologiques variées, notamment l'EMT et le développement de tissus fibreux. Les publications étudiant les relations entre les différentes voies de signalisation sont de plus en plus nombreuses, car ces régulations croisées semblent être à l'origine de la modulation de nombreuses fonctions cellulaires. Bien que des interactions entre les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Hippo/YAP aient pu être mises en évidence, ces régulations n'ont pas été analysées dans les ostéosarcomes durant ce travail de thèse. Depuis quelques années, il y a un intérêt croissant à étudier la voie de signalisation Hippo et son implication en oncologie, en particulier dans le développement des ostéosarcomes. En effet une expression élevée des protéines YAP/TAZ est corrélée avec un mauvais pronostic chez les patients atteints d'ostéosarcome (Bouvier et al., 2016). De plus, des régulations croisées entre les voies de signalisation Hippo/YAP et Wnt/ β -caténine ont été mises en évidence et dépendent de l'état d'activation de la voie de signalisation Hippo. Lorsque la voie de signalisation Hippo est inactive, comme observé dans les ostéosarcomes, la localisation nucléaire du complexe YAP/TEAD stimule la transcription dépendante du complexe β -caténine/TCF. La protéine YAP peut également s'associer directement à la β -caténine afin de réguler la transcription d'autres gènes tels que *SOX2* et *SNAI2* (Konsavage and Yochum, 2013; Zhang et al., 2013). En revanche, lorsque la voie Hippo est active, les protéines YAP/TAZ sont séquestrées dans le cytoplasme et participent à la dégradation de la β -caténine (Azzolin et al., 2014). Ces études démontrent donc que la voie de signalisation Hippo peut impacter l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine bien que ces régulations croisées restent à étudier dans les ostéosarcomes (Bernascone and Martin-Belmonte, 2013).

Enfin, la voie de signalisation Wnt ne se limite à la voie canonique dépendante de la β -caténine. Cependant, seules quelques études décrivent l'implication des voies non canoniques de Wnt dans le développement des ostéosarcomes. Une surexpression du ligand Wnt5a (activateur des voies non canoniques) ainsi que du récepteur ROR2 (récepteur des voies non canoniques) a été observée dans des tumeurs issues de patients atteints d'ostéosarcome comparativement à des tissus osseux d'individus sains, ainsi que dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome comparativement à des hMSC (Lu et al., 2012; Morioka et al., 2009). De plus, une forte expression de ces marqueurs corrèle avec les cas d'ostéosarcome métastatique ou agressif (Lu et al., 2012; Morioka et al., 2009). Il a également été rapporté que la signalisation Wnt5a/ROR2 active les propriétés invasives des cellules d'ostéosarcome SaOS2, et participe à la dégradation de la matrice extracellulaire via la sécrétion de MMP-13 (Enomoto et al., 2009). Ce résultat est confirmé par l'inhibition de l'expression de ROR2 avec un siRNA ou un miRNA (miR-24), qui réduit la migration et l'invasion cellulaire, alors qu'une surexpression de ROR2 produit les effets inverses dans les cellules U2OS et SaOS (Morioka et al., 2009; Zhang et al., 2015). Les voies de signalisation non canoniques de Wnt sont donc des cibles potentielles pour diminuer le potentiel migratoire des cellules d'ostéosarcome, et l'étude d'autres acteurs de ces voies de signalisation serait nécessaire. De plus, il serait intéressant d'investiguer les régulations croisées entre les voies de signalisation canonique et non canoniques de Wnt (Pinzón-Daza et al., 2014).

Malgré un effet anti-prolifératif majeur *in vitro*, aucun ralentissement de la croissance tumorale dans un modèle murin d'ostéosarcome n'a pu être observé suite à un traitement par ICG-001. Ces résultats mettent en évidence les difficultés de transposer des résultats obtenus *in vitro* à un modèle préclinique. En expérimentation, la culture de lignées cellulaires tumorales en monocouche (2D) constitue généralement la première approche utilisée *in vitro* pour tester des molécules à potentiel thérapeutique car elle est simple et peu coûteuse. Cependant, ces études sont insuffisantes pour valider l'efficacité des agents testés, en particulier parce qu'elles ne prennent pas en compte la complexité structurale, l'hétérogénéité et les interactions avec le microenvironnement (Wilding and Bodmer, 2014). C'est pourquoi, de nouveaux modèles d'études en 3D et notamment des ostéosarcomes sont en développement afin d'essayer de reproduire une partie de la complexité tissulaire avec la culture simultanée de 2 ou 3 acteurs cellulaires (De Luca et al., 2018; Gaebler et al., 2017; Monteiro et al., 2019). Ces modèles constituent donc une étape intermédiaire entre la culture en monocouche et les modèles animaux qui permettent l'étude de la physiologie ou du développement pathologique spontané ou induit dans un organisme complet (ou

presque). Le modèle expérimental, induit par xénogreffe chez la souris et utilisé dans cette étude permet de reproduire la pathologie humaine de l'ostéosarcome et d'étudier les effets bénéfiques ou toxiques d'une molécule pharmacologique (diminution/inhibition de la croissance tumorale, répression de la dissémination métastatique, perte de poids, mort soudaine, perte de poils, comportements agressifs...). La qualité première de notre modèle murin de xénogreffe en site orthotopique (injection de cellules d'ostéosarcome humain KHOS en site paratibial chez des souris athymiques) réside en l'apparition de signes cliniques identiques à ceux de la pathologie chez l'Homme dans un microenvironnement tumoral osseux, à savoir des lésions ostéolytiques pouvant entraîner une fracture de l'os péri-tumoral mais aussi la production de matrice ostéoïde par les cellules tumorales visibles en radiographie, et surtout une dissémination métastatique préférentiellement pulmonaire (Jacques et al., 2018). En revanche, ce modèle préclinique montre des limites telles que l'absence de système immunitaire adaptatif, qui joue un rôle important dans le développement tumoral des ostéosarcomes chez l'Homme (Heymann et al., 2019). Bien que la validation de données obtenues *in vitro* dans des modèles précliniques constitue une étape essentielle et indispensable avant tout essai clinique chez l'Homme, il reste difficile de prédire l'efficacité des molécules chez l'Homme à partir des résultats obtenus dans ces modèles, peut-être à cause du manque d'hétérogénéité des lignées cellulaires utilisées (Denayer et al., 2014; Martić-Kehl et al., 2012). Pour pallier en partie ces problèmes, des modèles PDX (Patients Derived Xenograft, tumeurs issues de patients greffées dans un modèle animal) sont de nouveau utilisés après leurs premiers essais dans les années 1980. Ces modèles permettent de mieux représenter l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs d'ostéosarcome comparativement à des lignées cellulaires établies, et reproduisent également l'hétérogénéité inter-tumeur/patient (Blattmann et al., 2015; Lu et al., 2018).

Depuis plusieurs années, la prise de conscience que deux patients avec la même pathologie cancéreuse peuvent avoir des tumeurs présentant des caractéristiques moléculaires différentes menant à des inégalités de réponses aux agents de chimiothérapie a fait émerger le concept de médecine personnalisée (ou médecine de précision). L'objectif de la médecine personnalisée est d'identifier et de fournir à chaque patient la prise en charge thérapeutique la plus adaptée aux caractéristiques de sa tumeur. La première étape consiste à effectuer une recherche prospective de mutations ou d'altérations génétiques, par un séquençage entier des exons à partir des biopsies de tumeurs primaires ou métastatiques, ou des pièces de résections (Figure 26). Cependant, ce séquençage haut débit ne permet ni de déterminer si les altérations peuvent être ciblées en clinique, ni d'évaluer la chimio-sensibilité des tumeurs. Il est donc associé à la réalisation de cultures

organoïdes (succès de génération pour presque 40% des patients, la réussite dépendant de la quantité de matériel recueillis) ou de PDX, permettant un screening de molécules afin d'identifier celles présentant la plus grande efficacité pour chaque patient. Avec l'évolution des techniques expérimentales, un délai de 2 semaines entre la biopsie et l'identification des molécules d'intérêt a pu être établi, ce qui pourrait rendre faisable ce type de protocole en clinique (Pauli et al., 2017). Cette médecine personnalisée pose néanmoins le problème de l'analyse des données générées qui nécessite une organisation majeure afin de pouvoir corrélérer les données génomiques aux paramètres cliniques des patients. En effet, de nombreuses données primordiales sont malheureusement souvent manquantes et notamment la proportion de cellules tumorales dans l'échantillon, le grade de la tumeur au diagnostic, le type de tissu (Rubin, 2015).

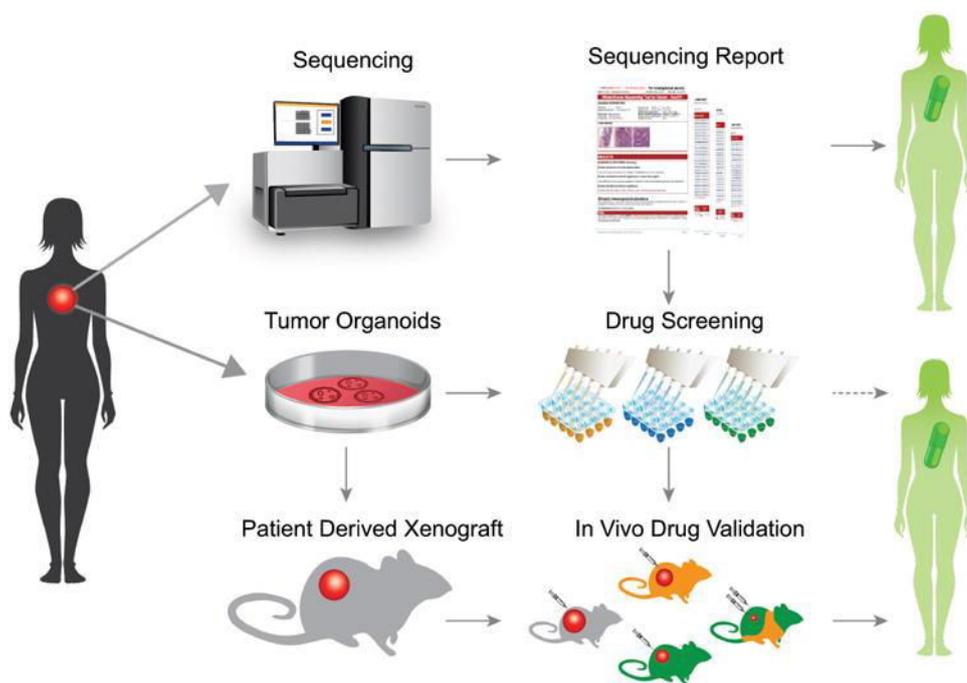


Figure 26 : Modélisation du concept de médecine personnalisée. Illustration du protocole de médecine personnalisée mis en place dans l'étude de Pauli et collègues. Un échantillon de la tumeur primaire est envoyé pour un séquençage entier des exons, et pour une analyse histologique. Un autre est mis en culture, puis l'organoïde est séquençé et histologiquement analysé afin d'être comparé aux analyses directement réalisées à partir de la tumeur primaire. Les cultures organoïdes sont ensuite utilisées pour tester des molécules anti-cancéreuses et greffer des souris. Les modèles précliniques de xéno greffes sont utilisés pour valider les molécules d'intérêt précédemment identifiées avec les cultures organoïdes. Ces approches pourraient permettre d'identifier de nouveaux agents pour une validation lors d'essais cliniques (Pauli et al., 2017).

Outre les différences inter-patients, l'hétérogénéité au sein même de la tumeur fait franchir un nouveau palier à la complexité de la prise en charge thérapeutique des cancers. Certaines altérations génétiques affectent toutes les cellules de la tumeur, alors que d'autres sont uniquement retrouvées dans quelques clones cellulaires. Ces altérations peuvent conférer aux cellules tumorales des capacités de résistance aux traitements. Dans ce contexte, la prise en charge thérapeutique sélectionne les cellules présentant ces altérations et favorise leur émergence. Donc les caractéristiques des cellules tumorales et de la tumeur peuvent évoluer au cours de la prise en charge thérapeutique (Tannock and Hickman, 2016).

Les ostéosarcomes sont des tumeurs très hétérogènes comme cela a pu être mis en évidence suite à l'analyse des exomes, par des séquençages haut débit, des tumeurs primaires comparativement aux métastases correspondantes, mais aussi au sein de la tumeur primaire en elle-même (séquençage entier des exons après génération de plusieurs fragments de tumeur séparés les uns des autres d'au moins 2mm) (Schiavone et al., 2019; Wang et al., 2019). En effet, les échantillons issus de fragments métastatiques présentent généralement un nombre plus important d'altérations génétiques que ceux issus de la tumeur primaire. Il est donc possible que la sensibilité aux agents de chimiothérapie diffère entre la tumeur primaire et les lésions métastatiques chez un même patient (Wang et al., 2019). Ces différences génétiques peuvent en partie s'expliquer par le fait que seuls certains clones sont capables de quitter la tumeur primaire, de survivre dans la circulation sanguine ou lymphatique, d'envahir le tissu pulmonaire, de proliférer dans un nouveau microenvironnement, dans lequel elles peuvent potentiellement acquérir de nouvelles altérations génétiques. L'hétérogénéité intra-tumorale des ostéosarcomes est également très forte, à cause de la contribution des cellules stromales et des cellules souches cancéreuses, ainsi que des évolutions clonales linéaires ou parallèles des tumeurs (Schiavone et al., 2019). D'une part, le modèle linéaire repose sur le fait que des mutations se succèdent et s'accumulent à partir des cellules d'origine conduisant à une tumeur oligo-clonale (Figure 27a). D'autre part, le modèle parallèle est basé sur l'évolution de plusieurs clones subissant des mutations génétiques différentes à partir d'une même population cellulaire d'origine, conduisant à une tumeur poly-clonale (Figure 27b) (Dagogo-Jack and Shaw, 2018). Ces deux types d'évolution sont retrouvés dans les ostéosarcomes, compliquant toujours un peu plus la compréhension de la biologie de ces tumeurs (Wang et al., 2019).

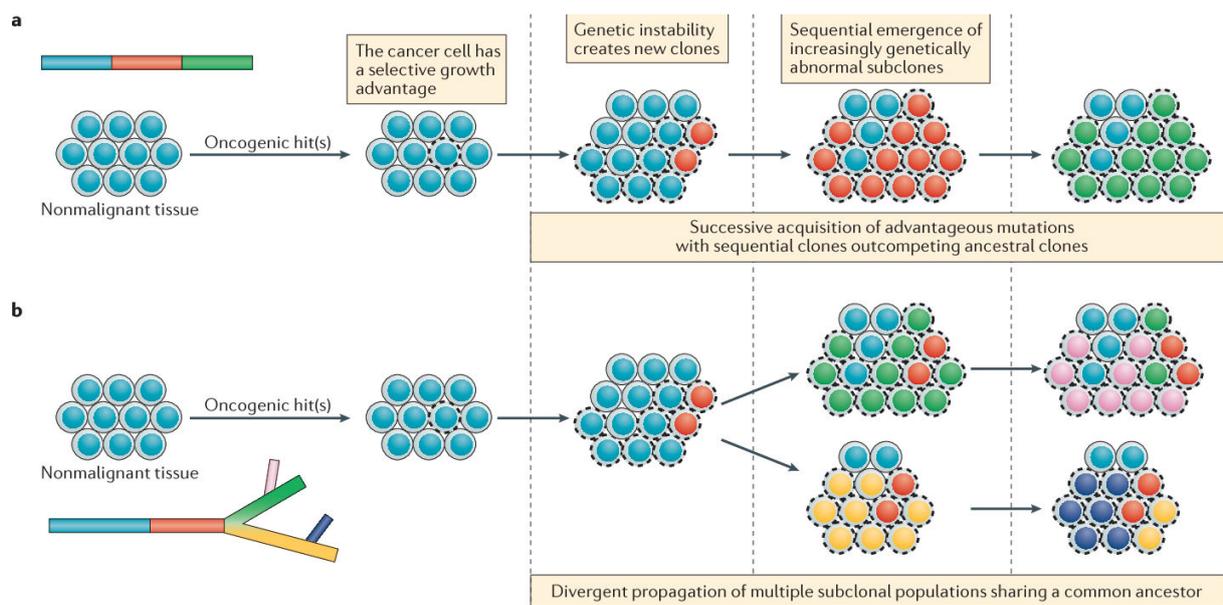


Figure 27 : Modèles d'évolution de la tumeur. (a) Le modèle d'évolution linéaire propose l'acquisition d'un avantage décisif par certains clones les amenant à remplacer progressivement les autres cellules tumorales, tout en conservant les altérations génétiques présentes dans les clones précédents. **(b)** Le modèle d'évolution parallèle est basé sur l'émergence de populations clonales à partir de la cellule d'origine et/ou à partir de nouveaux clones. Ces nouvelles altérations génétiques ne permettent pas de surclasser les autres clones déjà présents dans la tumeur (Dagogo-Jack and Shaw, 2018).

Perspectives

Ces travaux de thèse ne nous ont pas permis à l'heure actuelle d'identifier avec certitude, ni les mécanismes de régulation transcriptionnelle qui se mettaient en place dans les cellules d'ostéosarcome suite à l'inhibition de l'interaction entre la β -caténine et son cofacteur CBP, ni les mécanismes à l'origine de l'induction de la migration cellulaire. Les effets de l'ICG-001 sur l'augmentation des caractéristiques migratoires des cellules d'ostéosarcome sont précoces (24h de pré-traitement), bien que cet inhibiteur agisse au niveau d'un complexe transcriptionnel. Cela pourrait indiquer un autre effet, tel que la stabilisation d'une protéine ou une cascade de phosphorylation. Un screening de quelques protéines dont la fonction est régulée par phosphorylation a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la protéine cJUN phosphorylée (P-cJUN) dans le noyau après des temps de traitement courts à l'ICG-001 (10 μ M) dans les cellules KHOS (Figure 28). La protéine JNK (cJUN N-terminal Kinase) est responsable de la phosphorylation de cJUN sur les résidus Sérine 63 ou 73, permettant son activation pour participer au complexe de transcription AP-1 (homo- ou hétérodimère des protéines cJUN, JUN D, FOS B, FRA-1, FRA-2). Etant donné que CBP peut être recruté dans le complexe AP-1 lors de la transcription et interagir avec P-cJUN au sein de ce complexe (Zanger et al., 2001), une nouvelle hypothèse peut être formulée : le CBP n'interagissant plus avec la β -caténine est disponible pour se lier à P-cJUN permettant sa stabilisation dans le noyau et l'activation de la transcription dépendante de CBP/P-cJUN (Arias et al., 1994). Il a également été démontré qu'une augmentation de la phosphorylation de cJUN accroît le phénotype migratoire et invasif des cellules d'ostéosarcome, associé à la surexpression des MMP-1, MMP-2, MMP-9 (Kimura et al., 2011; Leaner et al., 2009; Zhuo et al., 2017). Ainsi, dans des cellules d'ostéosarcome, l'inhibition de la phosphorylation de cJUN ou du complexe AP-1 permet de diminuer la migration et l'invasion cellulaire (Leaner et al., 2009; Zhuo et al., 2017). De plus, un siRNA dirigé spécifiquement contre cJUN est responsable d'une réduction de l'invasion des cellules 143B (Kimura et al., 2011). Ces études mettent donc en évidence l'importance de la phosphorylation de cJUN dans l'induction des capacités migratoires des cellules d'ostéosarcome. Par conséquent, il s'agit d'une piste à investiguer pour essayer de décrypter le mécanisme sous-jacent à l'augmentation de la migration en présence d'ICG-001.

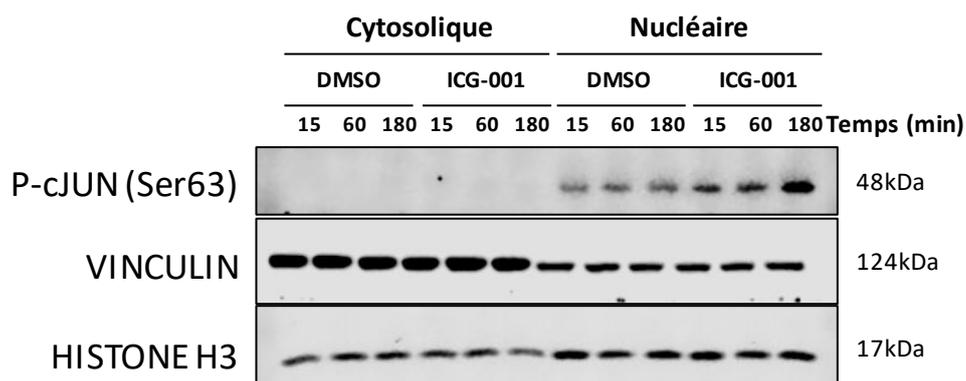


Figure 28 : Accumulation nucléaire de P-cJUN après un traitement par l'ICG-001. Les cellules KHOS ont été privées de nutriments pendant 4h avec du DMEM 0%SVF, puis les traitements DMSO ou ICG-001 (10 μ M) ont été ajoutés pendant 15min, 60min ou 180min. Les protéines ont été extraites avec un kit d'enrichissement nucléaire et cytoplasmique (N=1).

La néoangiogenèse tumorale et la dissémination métastatique sont deux phénomènes étroitement liés en cancérologie. Le VEGF est le facteur pro-angiogénique majeur impliqué dans le recrutement de cellules endothéliales et la formation nouveaux vaisseaux sanguins, permettant d'irriguer la tumeur en nutriments et en dioxygène (Hoeben et al., 2004). De plus, la néoangiogenèse est nécessaire à l'intravasation des cellules tumorales qui constitue une étape clé du processus de dissémination métastatique (Bielenberg and Zetter, 2015; Liu et al., 2011). Etant donné que l'ICG-001 augmente également l'expression du gène *VEGF-A*, dans les cellules d'ostéosarcome ainsi que la sécrétion de VEGF dans le milieu de culture, il serait intéressant d'investiguer son rôle dans les processus angiogéniques et plus généralement l'implication de la β -caténine. En effet, cette dernière fait partie du complexe transcriptionnel activant la transcription du gène *VEGF-A* et joue un rôle majeur dans l'initiation de l'angiogenèse, comme cela a été décrit dans le cancer du côlon (Clifford et al., 2008; Easwaran et al., 2003; Zhang et al., 2001). De plus, chez les patients atteints d'ostéosarcome, des niveaux d'expression élevés de VEGF corrént avec des taux de survie plus faibles. Par conséquent, l'étude de l'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans l'angiogenèse associée au développement des ostéosarcomes présente un réel intérêt. Dans un premier temps, des tests de tubulogenèse permettant d'observer la formation de tubes ou structures capillaires-like en 2D à partir de cellules endothéliales pourraient être réalisés en présence de milieux de culture issus de cellules d'ostéosarcome traitées avec de l'ICG-001 (Auerbach et al., 2003). La limite principale de ce test est l'absence d'information sur la fonctionnalité des structures formées, mais il permettra de déterminer les conditions optimales pour des expériences de matrigel plug (Auerbach et al., 2003). Brièvement, ce test consiste à mélanger des cellules endothéliales (qui pour notre étude seraient pré-traitées avec des milieux conditionnés de

cellules d'ostéosarcome traitées avec de l'ICG-001) avec du matrigel plug (4 °C) pour ensuite les injecter en sous-cutané à des souris immunodéprimées. Les implants sont récoltés après plusieurs jours (7 à 21 jours selon les protocoles) et coupés en deux. La première partie est utilisée en histologie afin d'observer les marqueurs de la néoangiogenèse (exemple : CD31, CD146), alors que la seconde est pesée puis broyée afin de doser l'hémoglobine recueillie (normalisée sur la masse totale de la partie d'implant), permettant de confirmer la présence d'hématies dans les vaisseaux et donc leur fonctionnalité. Ces études nous permettront de déterminer si les milieux conditionnés de cellules tumorales traitées avec l'ICG-001 favorisent l'angiogenèse, ce processus pouvant en partie expliquer l'augmentation de la dissémination métastatique observée *in vivo* suite à un traitement par ICG-001.

Enfin, en collaboration avec le Dr L. Garzia (Institut de Recherche du Centre Universitaire de Santé McGill, Montréal), une analyse transcriptomique à haut débit par RNAseq est en cours de réalisation sur des échantillons provenant de notre étude. Les ARNm issus des lignées cellulaires d'ostéosarcome humain KHOS, MG63 et SJSA traitées ou non avec de l'ICG-001 (10µM) pendant 24h (N=2) seront analysés, ainsi que des fragments de tumeurs primaires provenant de notre étude préclinique, soit 6 souris traitées avec du DMSO et 7 souris traitées avec 50mg/kg/jour d'ICG-001. Dans un premier temps, ces expériences permettront de confirmer les résultats observés au niveau des grandes fonctions biologiques impactées par l'ICG-001 : diminution de la prolifération, blocage du cycle cellulaire, absence de mort cellulaire, augmentation de la migration cellulaire. Dans un second temps, l'analyse du transcriptome de nos échantillons pourrait permettre d'investiguer les modifications de profils transcriptionnels de façon plus globale, et ainsi d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets pro-migratoires de l'ICG-001.

Conclusion

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est dérégulée dans les ostéosarcomes, et sa suractivation est corrélée à un mauvais pronostic, réduisant la survie globale et la survie sans événement (métastases pulmonaires) des patients. Un ciblage de l'intégralité de cette voie de signalisation diminue fortement la prolifération et la migration cellulaire des ostéosarcomes *in vitro* et *in vivo*, mais les essais cliniques utilisant cette stratégie thérapeutique révèlent des effets secondaires importants sur le tissu osseux, obligeant l'arrêt de certains protocoles. Dans ce contexte, un nouvel inhibiteur ciblant uniquement une partie de l'activité transcriptionnelle de la voie canonique de Wnt (complexe β -caténine/CBP), l'ICG-001, montre des effets anti-tumoraux intéressants mais n'avait jamais été testé dans des cellules d'ostéosarcome avant le début de mes travaux de thèse. Cet inhibiteur montre un intérêt particulier car il pourrait permettre une inhibition de la croissance tumorale tout en réduisant potentiellement les effets secondaires induits par un ciblage total de la voie Wnt/ β -caténine puisqu'une partie de la régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine reste active. Notre étude a démontré que l'ICG-001, en inhibant l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/CBP (diminution de l'*AXIN2* et de *BIRC5*), diminue la prolifération cellulaire par blocage du cycle cellulaire en phases G0/G1 sans induire la mort des cellules d'ostéosarcome. Cependant, l'ICG-001 n'affecte pas la croissance tumorale dans un modèle préclinique murin de xénogreffe en site orthotopique (cellules KHOS). En revanche, l'ICG-001 induit l'expression de gènes décrits comme étant des gènes cibles de la β -caténine tels que *cMYC*, *VEGF-A* et *PAI-1*. De plus, de façon surprenante, il favorise la migration des lignées cellulaires d'ostéosarcome *in vitro*, ainsi que la dissémination métastatique pulmonaire *in vivo*. Malgré l'absence d'éléments directs, plusieurs arguments expérimentaux et bibliographiques indiquent une potentielle implication du cofacteur transcriptionnel p300 dans l'induction de l'expression de *cMYC* et *VEGF-A* ainsi que dans les processus de migration cellulaire et de dissémination métastatique. Néanmoins la complexité de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et les différents effets observés en fonction de l'hétérogénéité des lignées cellulaires d'ostéosarcome rendent actuellement impossible toutes conclusions définitives sur le rôle du complexe transcriptionnel β -caténine/p300 dans la progression de l'ostéosarcome. En conclusion, ces résultats démontrent pour la première fois que la régulation transcriptionnelle dépendante de la β -caténine est modulée par les cofacteurs auxquels elle s'associe dans les cellules d'ostéosarcome, permettant une régulation fine des processus de prolifération et de migration cellulaires.

Bibliographie

Bibliographie

Abarrategi, A., Tornin, J., Martinez-Cruzado, L., Hamilton, A., Martinez-Campos, E., Rodrigo, J.P., González, M.V., Baldini, N., Garcia-Castro, J., and Rodriguez, R. (2016). Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int.* 2016, 3631764.

Adamopoulos, C., Gargalionis, A.N., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2016). Deciphering signaling networks in osteosarcoma pathobiology. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 241, 1296–1305.

Ali, N., Venkateswaran, G., Garcia, E., Landry, T., McColl, H., Sergi, C., Persad, A., Abuetabh, Y., Eisenstat, D.D., and Persad, S. (2019). Osteosarcoma progression is associated with increased nuclear levels and transcriptional activity of activated β -Catenin. *Genes Cancer* 10, 63–79.

Allen, T.M., and Cullis, P.R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303, 1818–1822.

Allison, D.C., Carney, S.C., Ahlmann, E.R., Hendifar, A., Chawla, S., Fedenko, A., Angeles, C., and Menendez, L.R. (2012). A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012, 704872.

Andresen, K.J., Sundaram, M., Unni, K.K., and Sim, F.H. (2004). Imaging features of low-grade central osteosarcoma of the long bones and pelvis. *Skeletal Radiol.* 33, 373–379.

Anninga, J.K., Gelderblom, H., Fiocco, M., Kroep, J.R., Taminiou, A.H.M., Hogendoorn, P.C.W., and Egeler, R.M. (2011). Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 2431–2445.

Appelman-Dijkstra, N.M., and Papapoulos, S.E. (2018). Paget's disease of bone. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 657–668.

Arensman, M.D., Telesca, D., Lay, A.R., Kershaw, K.M., Wu, N., Donahue, T.R., and Dawson, D.W. (2014). The CREB-binding protein inhibitor ICG-001 suppresses pancreatic cancer growth. *Mol. Cancer Ther.* 13, 2303–2314.

Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370, 226–229.

Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., and Akhtar, N. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 49, 32–40.

Ayerza, M.A., Farfalli, G.L., Aponte-Tinao, L., and Muscolo, D.L. (2010). Does increased rate of limb-sparing surgery affect survival in osteosarcoma? *Clin. Orthop.* 468, 2854–2859.

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158, 157–170.

Bacci, G., Picci, P., Ferrari, S., Orlandi, M., Ruggieri, P., Casadei, R., Ferraro, A., Biagini, R., and Battistini, A. (1993). Prognostic significance of serum alkaline phosphatase

measurements in patients with osteosarcoma treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 71, 1224–1230.

Bacci, G., Briccoli, A., Longhi, A., Ferrari, S., Mercuri, M., Faggioli, F., Versari, M., and Picci, P. (2005). Treatment and outcome of recurrent osteosarcoma: experience at Rizzoli in 235 patients initially treated with neoadjuvant chemotherapy. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 44, 748–755.

Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., and Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509–522.

Baron, R., and Gori, F. (2018). Targeting WNT signaling in the treatment of osteoporosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 40, 134–141.

Baron, R., and Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* 19, 179–192.

Barrios, C., Castresana, J.S., Ruiz, J., and Kreicbergs, A. (1994). Amplification of the c-myc proto-oncogene in soft tissue sarcomas. *Oncology* 51, 13–17.

Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., and Boutros, M. (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523–533.

Bastakoty, D., and Young, P.P. (2016). Wnt/ β -catenin pathway in tissue injury: roles in pathology and therapeutic opportunities for regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 3271–3284.

Benckert, C., Jonas, S., Cramer, T., Von Marschall, Z., Schäfer, G., Peters, M., Wagner, K., Radke, C., Wiedenmann, B., Neuhaus, P., et al. (2003). Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 63, 1083–1092.

Berman, S.D., Calo, E., Landman, A.S., Danielian, P.S., Miller, E.S., West, J.C., Fonhoue, B.D., Caron, A., Bronson, R., Bouxsein, M.L., et al. (2008). Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11851–11856.

Bernascone, I., and Martin-Belmonte, F. (2013). Crossroads of Wnt and Hippo in epithelial tissues. *Trends Cell Biol.* 23, 380–389.

Bernthal, N.M., Federman, N., Eilber, F.R., Nelson, S.D., Eckardt, J.J., Eilber, F.C., and Tap, W.D. (2012). Long-term results (>25 years) of a randomized, prospective clinical trial evaluating chemotherapy in patients with high-grade, operable osteosarcoma. *Cancer* 118, 5888–5893.

Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., et al. (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 776–790.

Bielack, S.S., Smeland, S., Whelan, J.S., Marina, N., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M.D., Gebhardt, M., Pápai, Z., Meyer, J., et al. (2015). Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in

Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 2279–2287.

Bielack, S.S., Hecker-Nolting, S., Blattmann, C., and Kager, L. (2016). Advances in the management of osteosarcoma. *F1000Research* *5*, 2767.

Bielenberg, D.R., and Zetter, B.R. (2015). The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J. Sudbury Mass* *21*, 267–273.

Bienz, M. (2005). beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol. CB* *15*, R64-67.

Bishop, M.W., Janeway, K.A., and Gorlick, R. (2016). Future directions in the treatment of osteosarcoma. *Curr. Opin. Pediatr.* *28*, 26–33.

Blattmann, C., Thiemann, M., Stenzinger, A., Roth, E.K., Dittmar, A., Witt, H., Lehner, B., Renker, E., Jugold, M., Eichwald, V., et al. (2015). Establishment of a patient-derived orthotopic osteosarcoma mouse model. *J. Transl. Med.* *13*, 136.

Bousquet, M., Noirod, C., Accadbled, F., Sales de Gauzy, J., Castex, M.P., Brousset, P., and Gomez-Brouchet, A. (2016). Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *27*, 738–744.

Bouvier, C., Macagno, N., Nguyen, Q., Loundou, A., Jiguet-Jiglaire, C., Gentet, J.-C., Jouve, J.-L., Rochwerger, A., Mattei, J.-C., Bouvard, D., et al. (2016). Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* *7*, 64702–64710.

Brard, C., Piperno-Neumann, S., Delaye, J., Brugières, L., Hampson, L.V., Le Teuff, G., Le Deley, M.-C., and Gaspar, N. (2019). Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open* *9*, e025877.

Bruland, O.S., Høifødt, H., Saeter, G., Smeland, S., and Fodstad, O. (2005). Hematogenous micrometastases in osteosarcoma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 4666–4673.

Bruland, Ø.S., Høifødt, H., Hall, K.S., Smeland, S., and Fodstad, Ø. (2009). Bone marrow micrometastases studied by an immunomagnetic isolation procedure in extremity localized non-metastatic osteosarcoma patients. *Cancer Treat. Res.* *152*, 509–515.

Buechling, T., Chaudhary, V., Spirohn, K., Weiss, M., and Boutros, M. (2011). p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands. *EMBO Rep.* *12*, 1265–1272.

Cai, W., Xu, Y., Yin, J., Zuo, W., and Su, Z. (2019). miR-552-5p facilitates osteosarcoma cell proliferation and metastasis by targeting WIF1. *Exp. Ther. Med.* *17*, 3781–3788.

Cai, Y., Mohseny, A.B., Karperien, M., Hogendoorn, P.C.W., Zhou, G., and Cleton-Jansen, A.-M. (2010). Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J. Pathol.* *220*, 24–33.

Calvert, G.T., Randall, R.L., Jones, K.B., Cannon-Albright, L., Lessnick, S., and Schiffman, J.D. (2012). At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond. *Sarcoma* 2012.

Chan, L.H., Wang, W., Yeung, W., Deng, Y., Yuan, P., and Mak, K.K. (2014). Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression. *Oncogene* 33, 4857–4866.

Chang, J., Li, Y., Wang, X., Hu, S., Wang, H., Shi, Q., Wang, Y., and Yang, Y. (2017). Polyphyllin I suppresses human osteosarcoma growth by inactivation of Wnt/ β -catenin pathway in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* 7.

Chen, C., Zhao, M., Tian, A., Zhang, X., Yao, Z., and Ma, X. (2015). Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget* 6, 17570–17583.

Chen, J., Sun, M., Hua, Y., and Cai, Z. (2014a). Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase level in osteosarcoma: a meta-analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140, 1205–1210.

Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., et al. (2014b). Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep.* 7, 104–112.

Chen, X., Duan, N., Zhang, C., and Zhang, W. (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J. Cancer* 7, 314–323.

Cho, Y., Jung, G.-H., Chung, S.-H., Kim, J.-Y., Choi, Y., and Kim, J.-D. (2011). Long-term survivals of stage IIb osteosarcoma: a 20-year experience in a single institution. *Clin. Orthop. Surg.* 3, 48–54.

Chodaparambil, J.V., Pate, K.T., Hepler, M.R.D., Tsai, B.P., Muthurajan, U.M., Luger, K., Waterman, M.L., and Weis, W.I. (2014). Molecular functions of the TLE tetramerization domain in Wnt target gene repression. *EMBO J.* 33, 719–731.

Choi, J.-Y., Hong, Y.-S., and Park, H.-Y. (1997). Stimulation of c-myc protooncogene expression by transforming growth factor α in human ovarian cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 29, 203–208.

Ciernik, I.F., Niemierko, A., Harmon, D.C., Kobayashi, W., Chen, Y.-L., Yock, T.I., Ebb, D.H., Choy, E., Raskin, K.A., Liebsch, N., et al. (2011). Proton-based radiotherapy for unresectable or incompletely resected osteosarcoma. *Cancer* 117, 4522–4530.

Cleton-Jansen, A.-M., Anninga, J.K., Briaire-de Bruijn, I.H., Romeo, S., Oosting, J., Egeler, R.M., Gelderblom, H., Taminiau, A.H.M., and Hogendoorn, P.C.W. (2009). Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumorigenic pathways. *Br. J. Cancer* 101, 1909–1918.

Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.

Clifford, R.L., Deacon, K., and Knox, A.J. (2008). Novel regulation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) by transforming growth factor (β)1: requirement for Smads, (β)-CATENIN, AND GSK3(β). *J. Biol. Chem.* 283, 35337–35353.

Cotterill, S.J., Wright, C.M., Pearce, M.S., Craft, A.W., and UKCCSG/MRC Bone Tumour Working Group (2004). Stature of young people with malignant bone tumors. *Pediatr. Blood Cancer* 42, 59–63.

Coudreuse, D.Y.M., Roël, G., Betist, M.C., Destrée, O., and Korswagen, H.C. (2006). Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* 312, 921–924.

Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.

Czekay, R.-P., Wilkins-Port, C.E., Higgins, S.P., Freytag, J., Overstreet, J.M., Klein, R.M., Higgins, C.E., Samarakoon, R., and Higgins, P.J. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 562481.

Daft, P.G., Yuan, K., Warram, J.M., Klein, M.J., Siegal, G.P., and Zayzafoon, M. (2013). Alpha-CaMKII plays a critical role in determining the aggressive behavior of human osteosarcoma. *Mol. Cancer Res. MCR* 11, 349–359.

Dagogo-Jack, I., and Shaw, A.T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 81–94.

Dai, G., Zheng, D., Wang, Q., Yang, J., Liu, G., Song, Q., Sun, X., Tao, C., Hu, Q., Gao, T., et al. (2017). Baicalein inhibits progression of osteosarcoma cells through inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 8, 86098–86116.

van Dalen, E.C., van der Pal, H.J.H., and Kremer, L.C.M. (2016). Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in people with cancer receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD005008.

Danieau, G., Morice, S., Rédini, F., Verrecchia, F., and Royer, B.B.-L. (2019). New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Dao, D.Y., Yang, X., Chen, D., Zuscik, M., and O’Keefe, R.J. (2007). Axin1 and Axin2 are regulated by TGF- and mediate cross-talk between TGF- and Wnt signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 82–99.

Davis, L.E., Bolejack, V., Ryan, C.W., Ganjoo, K.N., Loggers, E.T., Chawla, S., Agulnik, M., Livingston, M.B., Reed, D., Keedy, V., et al. (2019a). Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 37, 1424–1431.

Davis, S.L., Cardin, D.B., Shahda, S., Lenz, H.-J., Dotan, E., O’Neil, B.H., Kapoun, A.M., Stagg, R.J., Berlin, J., Messersmith, W.A., et al. (2019b). A phase 1b dose escalation study of Wnt pathway inhibitor vantictumab in combination with nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Invest. New Drugs.*

De Luca, A., Raimondi, L., Salamanna, F., Carina, V., Costa, V., Bellavia, D., Alessandro, R., Fini, M., and Giavaresi, G. (2018). Relevance of 3d culture systems to study osteosarcoma environment. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 37, 2.

Denayer, T., Stöhr, T., and Roy, M.V. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *Eur. J. Mol. Clin. Med.* *2*, 5.

Dennler, S. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGFbeta -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* *17*, 3091–3100.

Dennler, S., André, J., Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2009). Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factor-beta via SMAD3/beta-catenin cooperation. *J. Biol. Chem.* *284*, 31523–31531.

Dray, M.S., and Miller, M.V. (2008). Paget's osteosarcoma and post-radiation osteosarcoma: secondary osteosarcoma at Middlemore Hospital, New Zealand. *Pathology (Phila.)* *40*, 604–610.

Du, X., Yang, J., Yang, D., Tian, W., and Zhu, Z. (2014). The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC Cancer* *14*, 450.

Duchartre, Y., Kim, Y.-M., and Kahn, M. (2016). The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *99*, 141–149.

Duffaud, F., Mir, O., Boudou-Rouquette, P., Piperno-Neumann, S., Penel, N., Bompas, E., Delcambre, C., Kalbacher, E., Italiano, A., Collard, O., et al. (2019). Efficacy and safety of regorafenib in adult patients with metastatic osteosarcoma: a non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* *20*, 120–133.

Duronio, R.J., and Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a008904.

Eastell, R., O'Neill, T.W., Hofbauer, L.C., Langdahl, B., Reid, I.R., Gold, D.T., and Cummings, S.R. (2016). Postmenopausal osteoporosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* *2*, 16069.

Easwaran, V., Lee, S.H., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garrett, E., Wiesmann, M., Garcia, P.D., Fuller, J.H., Chan, V., et al. (2003). beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* *63*, 3145–3153.

Emami, K.H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D.H., Jeong, K.W., Eguchi, M., Moon, R.T., Teo, J.-L., Oh, S.W., Kim, H.Y., et al. (2004). A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12682–12687.

Enneking, W.F., Spanier, S.S., and Goodman, M.A. (1980). A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin. Orthop.* 106–120.

Enomoto, M., Hayakawa, S., Itsukushima, S., Ren, D.Y., Matsuo, M., Tamada, K., Oneyama, C., Okada, M., Takumi, T., Nishita, M., et al. (2009). Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene* *28*, 3197–3208.

Entz-Werlé, N., Stoetzel, C., Berard-Marec, P., Kalifa, C., Brugiere, L., Pacquement, H., Schmitt, C., Tabone, M.-D., Gentet, J.-C., Quillet, R., et al. (2005). Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer* *117*, 349–355.

Entz-Werle, N., Lavaux, T., Metzger, N., Stoetzel, C., Lasthaus, C., Marec, P., Kalifa, C., Brugieres, L., Pacquement, H., Schmitt, C., et al. (2007). Involvement of

MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia* N. Y. N 9, 678–688.

Fang, F., VanCleave, A., Helmuth, R., Torres, H., Rickel, K., Wollenzien, H., Sun, H., Zeng, E., Zhao, J., and Tao, J. (2018). Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* 9, 36780–36792.

Flores, R.J., Li, Y., Yu, A., Shen, J., Rao, P.H., Lau, S.S., Vannucci, M., Lau, C.C., and Man, T.-K. (2012). A systems biology approach reveals common metastatic pathways in osteosarcoma. *BMC Syst. Biol.* 6, 50.

Freeman, S.S., Allen, S.W., Ganti, R., Wu, J., Ma, J., Su, X., Neale, G., Dome, J.S., Daw, N.C., and Khoury, J.D. (2008). Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer* 113, 1453–1461.

Fuxe, J., Vincent, T., and Garcia de Herreros, A. (2010). Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 2363–2374.

Gaebler, M., Silvestri, A., Haybaeck, J., Reichardt, P., Lowery, C.D., Stancato, L.F., Zybarth, G., and Regenbrecht, C.R.A. (2017). Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Front. Oncol.* 7, 203.

Galluzzi, L., Spranger, S., Fuchs, E., and López-Soto, A. (2019). WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends Cell Biol.* 29, 44–65.

Gang, E.J., Hsieh, Y.-T., Pham, J., Zhao, Y., Nguyen, C., Huantes, S., Park, E., Naing, K., Klemm, L., Swaminathan, S., et al. (2014). Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 33, 2169–2178.

Gaspar, N., Occean, B.-V., Pacquement, H., Bompas, E., Bouvier, C., Brisse, H.J., Castex, M.-P., Cheurfa, N., Corradini, N., Delaye, J., et al. (2018). Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 88, 57–66.

Ghosh, N., Hossain, U., Mandal, A., and Sil, P.C. (2019). The Wnt signaling pathway: a potential therapeutic target against cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1443, 54–74.

Gianferante, D.M., Mirabello, L., and Savage, S.A. (2017). Germline and somatic genetics of osteosarcoma — connecting aetiology, biology and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 480–491.

Goldsberry, W.N., Londoño, A., Randall, T.D., Norian, L.A., and Arend, R.C. (2019). A Review of the Role of Wnt in Cancer Immunomodulation. *Cancers* 11.

Goldstein, S.D., Trucco, M., Bautista Guzman, W., Hayashi, M., and Loeb, D.M. (2016). A monoclonal antibody against the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget* 7, 21114–21123.

Gomez-Brouchet, A., Illac, C., Gilhodes, J., Bouvier, C., Aubert, S., Guinebretiere, J.-M., Marie, B., Larousserie, F., Entz-Werlé, N., de Pinieux, G., et al. (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 from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* 6, e1331193.

Grigorie, D., and Lerner, U.H. (2018). THE CRUCIAL ROLE OF THE WNT SYSTEM IN BONE REMODELLING. *Acta Endocrinol. Buchar. Rom.* 2005 14, 90–101.

Grigson, E.R., Ozerova, M., Pisklakova, A., Liu, H., Sullivan, D.M., and Nefedova, Y. (2015). Canonical Wnt pathway inhibitor ICG-001 induces cytotoxicity of multiple myeloma cells in Wnt-independent manner. *PloS One* 10, e0117693.

Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036–1045.

Grossman, S.R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.* 268, 2773–2778.

Guo, X., and Wang, X.-F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 19, 71–88.

Guo, Y., Zi, X., Koontz, Z., Kim, A., Xie, J., Gorlick, R., Holcombe, R.F., and Hoang, B.H. (2007). Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 25, 964–971.

Gustafson, C.T., Mamo, T., Shogren, K.L., Maran, A., and Yaszemski, M.J. (2017). FH535 Suppresses Osteosarcoma Growth In Vitro and Inhibits Wnt Signaling through Tankyrases. *Front. Pharmacol.* 8.

Gustafson, C.T., Mamo, T., Maran, A., and Yaszemski, M.J. (2018). Efflux inhibition by IWR-1-endo confers sensitivity to doxorubicin effects in osteosarcoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 150, 141–149.

Gutschner, T., and Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 9, 703–719.

Hadjidakis, D.J., and Androulakis, I.I. (2006). Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hao, S., He, W., Li, Y., Ding, H., Hou, Y., Nie, J., Hou, F.F., Kahn, M., and Liu, Y. (2011). Targeted inhibition of β -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1642–1653.

Harb, J., Lin, P.-J., and Hao, J. (2019). Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 12.

Haydon, R.C., Deyrup, A., Ishikawa, A., Heck, R., Jiang, W., Zhou, L., Feng, T., King, D., Cheng, H., Breyer, B., et al. (2002). CYTOPLASMIC AND/OR NUCLEAR ACCUMULATION OF THE β -CATENIN PROTEIN IS A FREQUENT EVENT IN HUMAN OSTEOSARCOMA. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 102, 338–342.

He, N., and Zhang, Z. (2015). Baicalein suppresses the viability of MG-63 osteosarcoma cells through inhibiting c-MYC expression via Wnt signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* *405*, 187–196.

He, F., Zhang, W., Shen, Y., Yu, P., Bao, Q., Wen, J., Hu, C., and Qiu, S. (2016). Effects of resection margins on local recurrence of osteosarcoma in extremity and pelvis: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Surg. Lond. Engl.* *36*, 283–292.

He, W., Tan, R., Dai, C., Li, Y., Wang, D., Hao, S., Kahn, M., and Liu, Y. (2010). Plasminogen activator inhibitor-1 is a transcriptional target of the canonical pathway of Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* *285*, 24665–24675.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* *332*, 458–461.

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F., and Kemler, R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of β -catenin in vertebrates. *EMBO J.* *19*, 1839–1850.

Henderson, B.R., and Fagotto, F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* *3*, 834–839.

Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M.-F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J.P., Gouin, F., and Redini, F. (2005). Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* *37*, 74–86.

Heymann, M.-F., Brown, H.K., and Heymann, D. (2016). Drugs in early clinical development for the treatment of osteosarcoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* *25*, 1265–1280.

Heymann, M.-F., Lézot, F., and Heymann, D. (2019). The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma. *Cell. Immunol.* *343*, 103711.

Hirahata, M., Osaki, M., Kanda, Y., Sugimoto, Y., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Takeshita, F., Fujiwara, T., Kawai, A., Ito, H., et al. (2016). PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by upregulating MMP-13 expression of human osteosarcoma. *Cancer Med.* *5*, 892–902.

Hoang, B.H. (2004). Dickkopf 3 Inhibits Invasion and Motility of Saos-2 Osteosarcoma Cells by Modulating the Wnt- Catenin Pathway. *Cancer Res.* *64*, 2734–2739.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* *56*, 549–580.

Holmboe, L., Andersen, A.M., Mørkrid, L., Slørdal, L., and Hall, K.S. (2012). High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *73*, 106–114.

Holmqvist, P.-H., and Mannervik, M. (2013). Genomic occupancy of the transcriptional co-activators p300 and CBP. *Transcription* *4*, 18–23.

Hou, X., Gong, R., Zhan, J., Zhou, T., Ma, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., Chen, G., Zhang, Z., Ma, S., et al. (2018). p300 promotes proliferation, migration, and invasion via inducing epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer* 18, 641.

Huang, J.-Y., Zhang, K., Chen, D.-Q., Chen, J., Feng, B., Song, H., Chen, Y., Zhu, Z., Lu, L., De, W., et al. (2015a). MicroRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6, 18613–18630.

Huang, Q., Shi, S.-Y., Jie, H.-B., and Xing, S.-X. (2019). LncRNA BE503655 inhibits osteosarcoma cell proliferation, invasion/migration via Wnt/ β -catenin pathway. *Biosci. Rep.*

Huang, Y.-J., He, A.-N., Sun, Y.-J., Shen, Z., Min, D.-L., and Yao, Y. (2015b). Continuous-infusion ifosfamide and doxorubicin combination as second-line chemotherapy for recurrent or refractory osteosarcoma patients in China: a retrospective study. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 2391–2395.

Hurlstone, A., and Clevers, H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* 21, 2303–2311.

Huvos, A.G., Rosen, G., and Marcove, R.C. (1977). Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 101, 14–18.

Ishibashi, M. (2019). Screening for natural products that affect Wnt signaling activity. *J. Nat. Med.*

Isogai, C., Laug, W.E., Shimada, H., Declerck, P.J., Stins, M.F., Durden, D.L., Erdreich-Epstein, A., and DeClerck, Y.A. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res.* 61, 5587–5594.

Iwao, K., Miyoshi, Y., Nawa, G., Yoshikawa, H., Ochi, T., and Nakamura, Y. (1999). Frequent β -Catenin Abnormalities in Bone and Soft-tissue Tumors. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 90, 205–209.

Jacques, C., Renema, N., Lezot, F., Ory, B., Walkley, C.R., Grigoriadis, A.E., and Heymann, D. (2018). Small animal models for the study of bone sarcoma pathogenesis: characteristics, therapeutic interests and limitations. *J. Bone Oncol.* 12, 7–13.

Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2014). Targeting the β -catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 27, 20–29.

Janssens, N., Janicot, M., and Perera, T. (2006). The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest. New Drugs* 24, 263–280.

Jentsch, T., Robl, B., Husmann, M., Bode-Lesniewska, B., and Fuchs, B. (2014). Worse prognosis of osteosarcoma patients expressing IGF-1 on a tissue microarray. *Anticancer Res.* 34, 3881–3889.

Jian, H., Shen, X., Liu, I., Semenov, M., He, X., and Wang, X.-F. (2006). Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 20, 666–674.

Jiang, K., Li, S., Li, L., Wang, X., Gu, Y., and Jin, Z. (2018). WNT6 is an effective marker for osteosarcoma diagnosis and prognosis. *Medicine (Baltimore)* *97*, e13011.

Jimeno, A., Gordon, M., Chugh, R., Messersmith, W., Mendelson, D., Dupont, J., Stagg, R., Kapoun, A.M., Xu, L., Uttamsingh, S., et al. (2017). A First-in-Human Phase I Study of the Anticancer Stem Cell Agent Ipafricept (OMP-54F28), a Decoy Receptor for Wnt Ligands, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *23*, 7490–7497.

Jin, Y.-R., and Yoon, J.K. (2012). The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 2278–2287.

Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K., and Perrimon, N. (1996). The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* *10*, 3116–3128.

Kager, L., Zoubek, A., Pötschger, U., Kastner, U., Flege, S., Kempf-Bielack, B., Branscheid, D., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Winkelmann, W., et al. (2003). Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 2011–2018.

Kahn, M. (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 513–532.

Kamei, J., Toyofuku, T., and Hori, M. (2003). Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 380–387.

Kansara, M., Tsang, M., Kodjabachian, L., Sims, N.A., Trivett, M.K., Ehrich, M., Dobrovic, A., Slavin, J., Choong, P.F.M., Simmons, P.J., et al. (2009). Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 837.

Kansara, M., Teng, M.W., Smyth, M.J., and Thomas, D.M. (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 722–735.

Kenkre, J.S., and Bassett, J. (2018). The bone remodelling cycle. *Ann. Clin. Biochem.* *55*, 308–327.

Kim, S.-E., Huang, H., Zhao, M., Zhang, X., Zhang, A., Semonov, M.V., MacDonald, B.T., Zhang, X., Garcia Abreu, J., Peng, L., et al. (2013). Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* *340*, 867–870.

Kimura, K., Ikoma, A., Shibakawa, M., Shimoda, S., Harada, K., Saio, M., Imamura, J., Osawa, Y., Kimura, M., Nishikawa, K., et al. (2017). Safety, Tolerability, and Preliminary Efficacy of the Anti-Fibrotic Small Molecule PRI-724, a CBP/ β -Catenin Inhibitor, in Patients with Hepatitis C Virus-related Cirrhosis: A Single-Center, Open-Label, Dose Escalation Phase 1 Trial. *EBioMedicine* *23*, 79–87.

Kimura, R., Ishikawa, C., Rokkaku, T., Janknecht, R., and Mori, N. (2011). Phosphorylated c-Jun and Fra-1 induce matrix metalloproteinase-1 and thereby regulate invasion activity of 143B osteosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 1543–1553.

Kobys, V.L., Konovalenko, V.F., Repina, N.V., Golovko, T.S., Gulak, L.O., Tarasova, T.O., Zaharycheva, E.V., and Matyushok, O.F. (2013). Treatment of large osteosarcoma in children: new approach. *Exp. Oncol.* *35*, 105–108.

Koduri, V., and Blacklow, S.C. (2007). Requirement for natively unstructured regions of mesoderm development candidate 2 in promoting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 maturation. *Biochemistry* *46*, 6570–6577.

Koide, M., and Kobayashi, Y. (2019). Regulatory mechanisms of sclerostin expression during bone remodeling. *J. Bone Miner. Metab.* *37*, 9–17.

Koirala, P., Roth, M.E., Gill, J., Piperdi, S., Chinai, J.M., Geller, D.S., Hoang, B.H., Park, A., Fremed, M.A., Zang, X., et al. (2016). Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* *6*, 30093.

Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* *4*, 68–75.

Konsavage, W.M., and Yochum, G.S. (2013). Intersection of Hippo/YAP and Wnt/ -catenin signaling pathways. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *45*, 71–79.

Krishnamurthy, N., and Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* *62*, 50–60.

Krubasik, D., Iyer, N.G., English, W.R., Ahmed, A.A., Vias, M., Roskelley, C., Brenton, J.D., Caldas, C., and Murphy, G. (2006). Absence of p300 induces cellular phenotypic changes characteristic of epithelial to mesenchyme transition. *Br. J. Cancer* *94*, 1326–1332.

Kundu, Z.S. (2014). Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* *48*, 238–246.

Kung, J.T.Y., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* *193*, 651–669.

Kushlinskii, N.E., Fridman, M.V., and Braga, E.A. (2016). Molecular Mechanisms and microRNAs in Osteosarcoma Pathogenesis. *Biochem. Biokhimiia* *81*, 315–328.

Kwong, L.N., and Dove, W.F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *656*, 85–106.

Labbé, E., Letamendia, A., and Attisano, L. (2000). Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8358–8363.

Labbé, E., Lock, L., Letamendia, A., Gorska, A.E., Gryfe, R., Gallinger, S., Moses, H.L., and Attisano, L. (2007). Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* *67*, 75–84.

Lamora, A., Talbot, J., Bougras, G., Amiaud, J., Leduc, M., Chesneau, J., Taurelle, J., Stresing, V., Le Deley, M.C., Heymann, M.F., et al. (2014). Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 5097–5112.

Lamora, A., Mullard, M., Amiaud, J., Brion, R., Heymann, D., Redini, F., and Verrecchia, F. (2015). Anticancer activity of halofuginone in a preclinical model of osteosarcoma: inhibition of tumor growth and lung metastases. *Oncotarget* 6, 14413–14427.

Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., et al. (2007). Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* 67, 7308–7318.

Le, P.N., McDermott, J.D., and Jimeno, A. (2015). Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol. Ther.* 146, 1–11.

Le Cesne, A., Marec-Berard, P., Blay, J.-Y., Gaspar, N., Bertucci, F., Penel, N., Bompas, E., Cousin, S., Toulmonde, M., Bessede, A., et al. (2019). Programmed cell death 1 (PD-1) targeting in patients with advanced osteosarcomas: results from the PEMBROSARC study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 119, 151–157.

Le Vu, B., de Vathaire, F., Shamsaldin, A., Hawkins, M.M., Grimaud, E., Hardiman, C., Diallo, I., Vassal, G., Bessa, E., Campbell, S., et al. (1998). Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumours during childhood. *Int. J. Cancer* 77, 370–377.

Leaner, V.D., Chick, J.F., Donninger, H., Linniola, I., Mendoza, A., Khanna, C., and Birrer, M.J. (2009). Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* 174, 265–275.

Leow, P.-C., Tian, Q., Ong, Z.-Y., Yang, Z., and Ee, P.-L.R. (2010). Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest. New Drugs* 28, 766–782.

Leow, P.-C., Bahety, P., Boon, C.P., Lee, C.Y., Tan, K.L., Yang, T., and Ee, P.-L.R. (2014). Functionalized curcumin analogs as potent modulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Eur. J. Med. Chem.* 71, 67–80.

Li, C., Shi, X., Zhou, G., Liu, X., Wu, S., and Zhao, J. (2013). The canonical Wnt-beta-catenin pathway in development and chemotherapy of osteosarcoma. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 18, 1384–1391.

Li, C., Wang, F., Wei, B., Wang, L., and Kong, D. (2019a). LncRNA AWPPH promotes osteosarcoma progression via activation of Wnt/ β -catenin pathway through modulating miR-93-3p/FZD7 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514, 1017–1022.

Li, N., Lu, N., and Xie, C. (2019b). The Hippo and Wnt signalling pathways: crosstalk during neoplastic progression in gastrointestinal tissue. *FEBS J.*

Li, R., Liu, J., Wu, H., Liu, L., Wang, L., and Zhang, S. (2014). TIKI2 suppresses growth of osteosarcoma by targeting Wnt/ β -catenin pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 392, 109–116.

Li, R., Liu, S., Li, Y., Tang, Q., Xie, Y., and Zhai, R. (2018). Long noncoding RNA AFAP1-AS1 enhances cell proliferation and invasion in osteosarcoma through regulating miR-4695-5p/TCF4- β -catenin signaling. *Mol. Med. Rep.* 18, 1616–1622.

Li, S., Chen, P., Pei, Y., Zheng, K., Wang, W., Qiu, E., and Zhang, X. (2019c). Addition of Zoledronate to Chemotherapy in Patients with Osteosarcoma Treated with Limb-Sparing Surgery: A Phase III Clinical Trial. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *25*, 1429–1438.

Li, V.S.W., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., et al. (2012). Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* *149*, 1245–1256.

Li, X., Zhang, Y., Wan, S., Li, H., Li, D., Xia, J., Yuan, Z., Ren, M., Yu, S., Li, S., et al. (2016). A comparative study between limb-salvage and amputation for treating osteosarcoma. *J. Bone Oncol.* *5*, 15–21.

Li, Y.-S., Liu, Q., He, H.-B., and Luo, W. (2019d). The possible role of insulin-like growth factor-1 in osteosarcoma. *Curr. Probl. Cancer* *43*, 228–235.

Liao, Z.-W., Zhao, L., Cai, M.-Y., Xi, M., He, L.-R., Yu, F., Zhou, T.-C., and Liu, M.-Z. (2017). P300 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a nasopharyngeal carcinoma cell line. *Oncol. Lett.* *13*, 763–769.

Lien, W.-H., and Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* *28*, 1517–1532.

Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3079–3093.

Lin, C.H., Guo, Y., Ghaffar, S., McQueen, P., Pourmorady, J., Christ, A., Rooney, K., Ji, T., Eskander, R., Zi, X., et al. (2013). Dkk-3, a secreted wnt antagonist, suppresses tumorigenic potential and pulmonary metastasis in osteosarcoma. *Sarcoma* *2013*, 147541.

Lin, H.-H., Feng, W.-C., Lu, L.-C., Shao, Y.-Y., Hsu, C.-H., and Cheng, A.-L. (2016). Inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway improves the anti-tumor effects of sorafenib against hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *381*, 58–66.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* *108*, 837–847.

Liu, W., Xu, J., Wang, M., Wang, Q., Bi, Y., and Han, M. (2011). Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int. J. Oncol.* *39*, 1213–1220.

Liu, W., Zhao, Z., Wang, Y., Li, W., Su, Q., Jia, Q., Zhang, J., Zhang, X., Shen, J., and Yin, J. (2018a). Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/ β -catenin signaling pathway. *Cell Death Dis.* *9*, 343.

Liu, X., Li, L., Lv, L., Chen, D., Shen, L., and Xie, Z. (2015a). Apigenin inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol. Rep.* *34*, 1035–1041.

Liu, Y., Wang, W., Xu, J., Li, L., Dong, Q., Shi, Q., Zuo, G., Zhou, L., Weng, Y., Tang, M., et al. (2013). Dihydroartemisinin inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Oncol. Rep.* *30*, 1723–1730.

Liu, Y., Liu, Y.-Z., Zhang, R.-X., Wang, X., Meng, Z.-J., Huang, J., Wu, K., Luo, J.-Y., Zuo, G.-W., Chen, L., et al. (2014). Oridonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Int. J. Oncol.* *45*, 795–803.

Liu, Y., Xu, Y., Lin, N., Jiang, S., Wang, Y., and Ye, Z. (2015b). High-dose methotrexate (HD-MTX) used as an adjunct with other chemotherapeutics for the treatment of osteosarcoma. *Cell Biochem. Biophys.* *71*, 1097–1104.

Liu, Y., Chen, H., Zheng, P., Zheng, Y., Luo, Q., Xie, G., Ma, Y., and Shen, L. (2017). ICG-001 suppresses growth of gastric cancer cells and reduces chemoresistance of cancer stem cell-like population. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *36*, 125.

Liu, Y., Sun, W., Ma, X., Hao, Y., Liu, G., Hu, X., Shang, H., Wu, P., Zhao, Z., and Liu, W. (2018b). Logistic regression analysis for the identification of the metastasis-associated signaling pathways of osteosarcoma. *Int. J. Mol. Med.* *41*, 1233–1244.

Longhi, A., Ferrari, S., Bacci, G., and Specchia, S. (2007). Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma. *Anticancer. Drugs* *18*, 737–744.

Lu, B.-J., Wang, Y.-Q., Wei, X.-J., Rong, L.-Q., Wei, D., Yan, C.-M., Wang, D.-J., and Sun, J.-Y. (2012). Expression of WNT-5a and ROR2 correlates with disease severity in osteosarcoma. *Mol. Med. Rep.* *5*, 1033–1036.

Lu, W., Chao, T., Ruiqi, C., Juan, S., and Zhihong, L. (2018). Patient-derived xenograft models in musculoskeletal malignancies. *J. Transl. Med.* *16*, 107.

Lu, Y., Guan, G.-F., Chen, J., Hu, B., Sun, C., Ma, Q., Wen, Y.-H., Qiu, X.-C., and Zhou, Y. (2015). Aberrant CXCR4 and β -catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. *Oncol. Lett.* *10*, 2123–2129.

Lucarelli, P., Schilling, M., Kreutz, C., Vlasov, A., Boehm, M.E., Iwamoto, N., Steiert, B., Lattermann, S., Wäsch, M., Stepath, M., et al. (2018). Resolving the Combinatorial Complexity of Smad Protein Complex Formation and Its Link to Gene Expression. *Cell Syst.* *6*, 75-89.e11.

Luke, J.J., Bao, R., Sweis, R.F., Spranger, S., and Gajewski, T.F. (2019). WNT/ β -catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *25*, 3074–3083.

Ma, H., Nguyen, C., Lee, K.-S., and Kahn, M. (2005). Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/ β -catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene* *24*, 3619–3631.

Ma, Y., Ren, Y., Han, E.Q., Li, H., Chen, D., Jacobs, J.J., Gitelis, S., O'Keefe, R.J., Konttinen, Y.T., Yin, G., et al. (2013). Inhibition of the Wnt- β -catenin and Notch signaling pathways sensitizes osteosarcoma cells to chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *431*, 274–279.

Ma, Y., Zhu, B., Liu, X., Yu, H., Yong, L., Liu, X., Shao, J., and Liu, Z. (2015). Inhibition of oleandrin on the proliferation and invasion of osteosarcoma cells in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *34*, 115.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.

Malhotra, S., and Kincade, P.W. (2009). Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 4, 27–36.

Marko, T.A., Diessner, B.J., and Spector, L.G. (2016). Prevalence of Metastasis at Diagnosis of Osteosarcoma: An International Comparison. *Pediatr. Blood Cancer* 63, 1006–1011.

Martić-Kehl, M.I., Schibli, R., and Schubiger, P.A. (2012). Can animal data predict human outcome? Problems and pitfalls of translational animal research. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 1492–1496.

Martin-Broto, J., Redondo, A., Valverde, C., Vaz, M.A., Mora, J., Garcia Del Muro, X., Gutierrez, A., Tous, C., Carnero, A., Marcilla, D., et al. (2017). Gemcitabine plus sirolimus for relapsed and progressing osteosarcoma patients after standard chemotherapy: a multicenter, single-arm phase II trial of Spanish Group for Research on Sarcoma (GEIS). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 2994–2999.

Martins-Neves, S.R., Paiva-Oliveira, D.I., Wijers-Koster, P.M., Abrunhosa, A.J., Fontes-Ribeiro, C., Bovée, J.V.M.G., Cleton-Jansen, A.-M., and Gomes, C.M.F. (2016). Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Lett.* 370, 286–295.

Martins-Neves, S.R., Paiva-Oliveira, D.I., Fontes-Ribeiro, C., Bovée, J.V.M.G., Cleton-Jansen, A.-M., and Gomes, C.M.F. (2018). IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ β -catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Lett.* 414, 1–15.

Meyerson, M., and Pellman, D. (2011). Cancer genomes evolve by pulverizing single chromosomes. *Cell* 144, 9–10.

Mialou, V., Philip, T., Kalifa, C., Perol, D., Gentet, J.-C., Marec-Berard, P., Pacquement, H., Chastagner, P., Defaschelles, A.-S., and Hartmann, O. (2005). Metastatic osteosarcoma at diagnosis: prognostic factors and long-term outcome--the French pediatric experience. *Cancer* 104, 1100–1109.

Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009a). International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 229–234.

Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009b). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* 115, 1531–1543.

Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., and Kulidjian, A.A. (2018). Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J* 4, 12.

Mita, M.M., Becerra, C., Richards, D.A., Mita, A.C., Shagisultanova, E., Osborne, C.R.C., O'Shaughnessy, J., Zhang, C., Henner, R., Kapoun, A.M., et al. (2016). Phase 1b study of WNT inhibitor vantictumab (VAN, human monoclonal antibody) with paclitaxel (P) in patients (pts) with 1st- to 3rd-line metastatic HER2-negative breast cancer (BC). *J. Clin. Oncol.* 34, 2516–2516.

Miyabayashi, T., Teo, J.-L., Yamamoto, M., McMillan, M., Nguyen, C., and Kahn, M. (2007). Wnt/ β -catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5668.

Mohamad, O., Imai, R., Kamada, T., Nitta, Y., Araki, N., and Working Group for Bone and Soft Tissue Sarcoma (2018). Carbon ion radiotherapy for inoperable pediatric osteosarcoma. *Oncotarget* 9, 22976–22985.

Mohseny, A.B., Szuhai, K., Romeo, S., Buddingh, E.P., Briaire-de Bruijn, I., de Jong, D., van Pel, M., Cleton-Jansen, A.-M., and Hogendoorn, P.C.W. (2009). Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of *Cdkn2*. *J. Pathol.* 219, 294–305.

Monteiro, C.F., Custódio, C.A., and Mano, J.F. (2019). Three-Dimensional Osteosarcoma Models for Advancing Drug Discovery and Development. *Adv. Ther.* 2, 1800108.

Moore, K.N., Gunderson, C.C., Sabbatini, P., McMeekin, D.S., Mantia-Smaldone, G., Burger, R.A., Morgan, M.A., Kapoun, A.M., Brachmann, R.K., Stagg, R., et al. (2019). A phase 1b dose escalation study of ipafricept (OMP54F28) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 154, 294–301.

Morioka, K., Tanikawa, C., Ochi, K., Daigo, Y., Katagiri, T., Kawano, H., Kawaguchi, H., Myoui, A., Yoshikawa, H., Naka, N., et al. (2009). Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Sci.* 100, 1227–1233.

Mortus, J.R., Zhang, Y., and Hughes, D.P.M. (2014). Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 804, 93–118.

Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 276–286.

Mu, Y., Zhang, L., Chen, X., Chen, S., Shi, Y., and Li, J. (2019). Silencing microRNA-27a inhibits proliferation and invasion of human osteosarcoma cells through the SFRP1-dependent Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biosci. Rep.* 39.

Mulligan, K.A., Fuerer, C., Ching, W., Fish, M., Willert, K., and Nusse, R. (2012). Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 370–377.

Mutsaers, A.J., and Walkley, C.R. (2014). Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 62, 56–63.

Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.

Ng, M., Tan, D.S., Subbiah, V., Weekes, C.D., Teneggi, V., Diermayr, V., Ethirajulu, K., Yeo, P., Chen, D., Blanchard, S., et al. (2017). First-in-human phase 1 study of ETC-159 an oral PORCN inhibitor in patients with advanced solid tumours. *J. Clin. Oncol.* 35, 2584–2584.

Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., and Silberstein, L.E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 126–131.

O’Kane, G.M., Cadoo, K.A., Walsh, E.M., Emerson, R., Dervan, P., O’Keane, C., Hurson, B., O’Toole, G., Dudeney, S., Kavanagh, E., et al. (2015). Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clin. Sarcoma Res.* 5, 17.

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

Ottaviani, G., and Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* *152*, 3–13.

Park, G.B., Kim, D.-J., Kim, Y.-S., Lee, H.-K., Kim, C.W., and Hur, D.Y. (2015). Silencing of galectin-3 represses osteosarcoma cell migration and invasion through inhibition of FAK/Src/Lyn activation and β -catenin expression and increases susceptibility to chemotherapeutic agents. *Int. J. Oncol.* *46*, 185–194.

Pauli, C., Hopkins, B.D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L., Rosati, R., et al. (2017). Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov.* *7*, 462–477.

Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J.J., Khosla, S., and Oursler, M.J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20764–20769.

Perry, J.A., Kiezun, A., Tonzi, P., Van Allen, E.M., Carter, S.L., Baca, S.C., Cowley, G.S., Bhatt, A.S., Rheinbay, E., Peadarallu, C.S., et al. (2014). Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E5564-5573.

Petersen, C.P., and Reddien, P.W. (2009). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* *139*, 1056–1068.

Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.

Pinzón-Daza, M.L., Salaroglio, I.C., Kopecka, J., Garzòn, R., Couraud, P.-O., Ghigo, D., and Riganti, C. (2014). The cross-talk between canonical and non-canonical Wnt-dependent pathways regulates P-glycoprotein expression in human blood-brain barrier cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 1258–1269.

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., et al. (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.

Poh, A.R., and Ernst, M. (2018). Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front. Oncol.* *8*, 49.

Polakis, P. (2012). Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Pridgeon, M.G., Grohar, P.J., Steensma, M.R., and Williams, B.O. (2017). Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr. Osteoporos. Rep.* *15*, 239–246.

Qu, B., Liu, B.-R., Du, Y.-J., Chen, J., Cheng, Y.-Q., Xu, W., and Wang, X.-H. (2014). Wnt/ β -catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.* *7*, 1175–1178.

Quasnichka, H., Slater, S.C., Beeching, C.A., Boehm, M., Sala-Newby, G.B., and George, S.J. (2006). Regulation of smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ. Res.* *99*, 1329–1337.

Rapkin, L., Qayed, M., Brill, P., Martin, M., Clark, D., George, B.A., Olson, T.A., Wasilewski-Masker, K., Alazraki, A., and Katzenstein, H.M. (2012). Gemcitabine and docetaxel (GEMDOX) for the treatment of relapsed and refractory pediatric sarcomas. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 854–858.

Regard, J.B., Zhong, Z., Williams, B.O., and Yang, Y. (2012). Wnt signaling in bone development and disease: making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Ren, H.-Y., Sun, L.-L., Li, H.-Y., and Ye, Z.-M. (2015). Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Level in Osteosarcoma: A Meta-Analysis of Published Data. *BioMed Res. Int.* *2015*, 160835.

Ren, Y., Zhu, F., and Liu, Z. (2018). Inhibitory effect of icariin on osteosarcoma cell proliferation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol. Lett.*

Rennoll, S., and Yochum, G. (2015). Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World J. Biol. Chem.* *6*, 290–300.

Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* *434*, 843–850.

Righi, A., Gambarotti, M., Longo, S., Benini, S., Gamberi, G., Cocchi, S., Vanel, D., Picci, P., Bertoni, F., Simoni, A., et al. (2015). Small cell osteosarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 36 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 691–699.

Ring, A., Nguyen, C., Smbatyan, G., Tripathy, D., Yu, M., Press, M., Kahn, M., and Lang, J.E. (2018). CBP/ β -Catenin/FOXM1 Is a Novel Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer. *Cancers* *10*.

Robertson, H., Hayes, J.D., and Sutherland, C. (2018). A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem. Pharmacol.* *147*, 77–92.

Rodon, J., Argilés, G., Connolly, R.M., Vaishampayan, U., Jonge, M. de, Garralda, E., Giannakis, M., Smith, D.C., Dobson, J.R., McLaughlin, M., et al. (2018). Abstract CT175: Biomarker analyses from a phase I study of WNT974, a first-in-class Porcupine inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *Cancer Res.* *78*, CT175–CT175.

Rodriguez, R., Rubio, R., and Menendez, P. (2012). Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Res.* *22*, 62–77.

Rosen, G. (1985). Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy for osteogenic sarcoma: a ten year experience. *Orthopedics* *8*, 659–664.

Rosen, G., Marcove, R.C., Caparros, B., Nirenberg, A., Kosloff, C., and Huvos, A.G. (1979). Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer* *43*, 2163–2177.

Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., Brabletz, T., and Bienz, M. (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *EMBO J.* *22*, 1101–1113.

Rubin, M.A. (2015). Health: Make precision medicine work for cancer care. *Nature* *520*, 290–291.

Rubin, E.M., Guo, Y., Tu, K., Xie, J., Zi, X., and Hoang, B.H. (2010). Wnt inhibitory factor 1 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* *9*, 731–741.

Sangle, N.A., and Layfield, L.J. (2012). Telangiectatic osteosarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *136*, 572–576.

Sangodkar, J., Farrington, C.C., McClinch, K., Galsky, M.D., Kastrinsky, D.B., and Narla, G. (2016). All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J.* *283*, 1004–1024.

Sasaki, T., Hwang, H., Nguyen, C., Kloner, R.A., and Kahn, M. (2013). The small molecule Wnt signaling modulator ICG-001 improves contractile function in chronically infarcted rat myocardium. *PLoS One* *8*, e75010.

Schiavone, K., Garnier, D., Heymann, M.-F., and Heymann, D. (2019). The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1139*, 187–200.

Schwarz, R., Bruland, O., Cassoni, A., Schomberg, P., and Bielack, S. (2009). The role of radiotherapy in osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* *152*, 147–164.

Shao, J., Wang, L., Zhong, C., Qi, R., and Li, Y. (2016). AHS1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *77*, 45–51.

Shimatani, A., Aono, M., Hoshi, M., Oebisu, N., Iwai, T., Takada, N., Hara, J., Nitani, C., and Nakamura, H. (2019). Secondary osteosarcoma in patients previously treated for childhood cancer: Three case reports. *Mol. Clin. Oncol.* *10*, 153–158.

Shimizu, T., Ishikawa, T., Sugihara, E., Kuninaka, S., Miyamoto, T., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., Tsunoda, T., Miya, F., Morioka, H., et al. (2010). c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* *29*, 5687–5699.

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., and Chourasia, M.K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *252*, 28–49.

Smith, D.C., Rosen, L.S., Chugh, R., Goldman, J.W., Xu, L., Kapoun, A., Brachmann, R.K., Dupont, J., Stagg, R.J., Tolcher, A.W., et al. (2013). First-in-human evaluation of the human monoclonal antibody vantictumab (OMP-18R5; anti-Frizzled) targeting the WNT pathway in a phase I study for patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* *31*, 2540–2540.

Smith, S.C., Buehler, D., Choi, E.-Y.K., McHugh, J.B., Rubin, B.P., Billings, S.D., Balzer, B., Thomas, D.G., Lucas, D.R., Goldblum, J.R., et al. (2015). CIC-DUX sarcomas

demonstrate frequent MYC amplification and ETS-family transcription factor expression. *Mod. Pathol.* *28*, 57–68.

Sottnik, J.L., Campbell, B., Mehra, R., Behbahani-Nejad, O., Hall, C.L., and Keller, E.T. (2014). Osteocytes serve as a progenitor cell of osteosarcoma. *J. Cell. Biochem.* *115*, 1420–1429.

Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a007898.

Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* *144*, 27–40.

Stratford, E.W., Daffinrud, J., Munthe, E., Castro, R., Waaler, J., Krauss, S., and Myklebost, O. (2014). The tankyrase-specific inhibitor JW74 affects cell cycle progression and induces apoptosis and differentiation in osteosarcoma cell lines. *Cancer Med.* *3*, 36–46.

Strauss, S.J., and Whelan, J.S. (2018). Current questions in bone sarcomas. *Curr. Opin. Oncol.* *30*, 252–259.

Tabatabai, R., Linhares, Y., Bolos, D., Mita, M., and Mita, A. (2017). Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics. *Target. Oncol.* *12*, 623–641.

Tai, D., Wells, K., Arcaroli, J., Vanderbilt, C., Aisner, D.L., Messersmith, W.A., and Lieu, C.H. (2015). Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *The Oncologist* *20*, 1189–1198.

Takahashi-Yanaga, F., and Kahn, M. (2010). Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells? *Clin. Cancer Res.* *16*, 3153–3162.

Tang, Q.-L., Zhao, Z.-Q., Li, J.-C., Liang, Y., Yin, J.-Q., Zou, C.-Y., Xie, X.-B., Zeng, Y.-X., Shen, J.-N., Kang, T., et al. (2011). Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells. *Cancer Lett.* *311*, 113–121.

Tannock, I.F., and Hickman, J.A. (2016). Limits to Personalized Cancer Medicine. *N. Engl. J. Med.* *375*, 1289–1294.

Tarek, N., and Lee, D.A. (2014). Natural killer cells for osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* *804*, 341–353.

Tawbi, H.A., Burgess, M., Bolejack, V., Van Tine, B.A., Schuetze, S.M., Hu, J., D'Angelo, S., Attia, S., Riedel, R.F., Priebat, D.A., et al. (2017). Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1493–1501.

Tian, X., Zhang, J., Tan, T.K., Lyons, J.G., Zhao, H., Niu, B., Lee, S.R., Tsatralis, T., Zhao, Y., Wang, Y., et al. (2013). Association of β -catenin with P-Smad3 but not LEF-1 dissociates *in vitro* profibrotic from anti-inflammatory effects of TGF- β 1. *J. Cell Sci.* *126*, 67–76.

Tran, F.H., and Zheng, J.J. (2017). Modulating the wnt signaling pathway with small molecules: Modulating the Wnt Signaling Pathway. *Protein Sci.* *26*, 650–661.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* *31*, 2714–2736.

Verrecchia, F., and R dini, F. (2018). Transforming Growth Factor- β Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol.* *8*, 133.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* *469*, 314–322.

Wang, D., Niu, X., Wang, Z., Song, C.-L., Huang, Z., Chen, K.-N., Duan, J., Bai, H., Xu, J., Zhao, J., et al. (2019). Multiregion Sequencing Reveals the Genetic Heterogeneity and Evolutionary History of Osteosarcoma and Matched Pulmonary Metastases. *Cancer Res.* *79*, 7–20.

Wang, D.-Y., Wu, Y.-N., Huang, J.-Q., Wang, W., Xu, M., Jia, J.-P., Han, G., Mao, B.-B., and Bi, W.-Z. (2016). Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance. *Chin. J. Cancer* *35*, 47.

Wang, X., Zheng, H., Shou, T., Tang, C., Miao, K., and Wang, P. (2017a). Effectiveness of multi-drug regimen chemotherapy treatment in osteosarcoma patients: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Orthop. Surg.* *12*, 52.

Wang, Y., Zang, Q.S., Liu, Z., Wu, Q., Maass, D., Dulan, G., Shaul, P.W., Melito, L., Frantz, D.E., Kilgore, J.A., et al. (2011). Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *301*, C695-704.

Wang, Y., Pan, P., Wang, Z., Zhang, Y., Xie, P., Geng, D., Jiang, Y., Yu, R., and Zhou, X. (2017b). β -catenin-mediated YAP signaling promotes human glioma growth. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *36*, 136.

Wang, Y.-H., Han, X.-D., Qiu, Y., Xiong, J., Yu, Y., Wang, B., Zhu, Z.-Z., Qian, B.-P., Chen, Y.-X., Wang, S.-F., et al. (2012). Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* *105*, 235–243.

Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGF β superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *2*, 47–63.

Weivoda, M.M., Ruan, M., Hachfeld, C.M., Pederson, L., Howe, A., Davey, R.A., Zajac, J.D., Kobayashi, Y., Williams, B.O., Westendorf, J.J., et al. (2016). Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *31*, 65–75.

Wiese, M., Walther, N., Diederichs, C., Schill, F., Monecke, S., Salinas, G., Sturm, D., Pfister, S.M., Dressel, R., Johnsen, S.A., et al. (2017). The β -catenin/CBP-antagonist ICG-001 inhibits pediatric glioma tumorigenicity in a Wnt-independent manner. *Oncotarget* *8*, 27300.

Wilding, J.L., and Bodmer, W.F. (2014). Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Res.* *74*, 2377–2384.

Wilusz, J.E., Sunwoo, H., and Spector, D.L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* *23*, 1494–1504.

Wu, B.-Q., Cao, Y., and Bi, Z.-G. (2017). Suppression of adriamycin resistance in osteosarcoma by blocking Wnt/ β -catenin signal pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *21*, 3185–3192.

Wu, J., Liao, Q., He, H., Zhong, D., and Yin, K. (2014). TWIST interacts with β -catenin signaling on osteosarcoma cell survival against cisplatin. *Mol. Carcinog.* *53*, 440–446.

Xia, P., Gu, R., Zhang, W., Shao, L., Li, F., Wu, C., and Sun, Y. (2019a). MicroRNA-377 exerts a potent suppressive role in osteosarcoma through the involvement of the histone acetyltransferase 1-mediated Wnt axis. *J. Cell. Physiol.*

Xia, P., Gao, X., Shao, L., Chen, Q., Li, F., Wu, C., Zhang, W., and Sun, Y. (2019b). Down-regulation of RAC2 by small interfering RNA restrains the progression of osteosarcoma by suppressing the Wnt signaling pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* *137*, 1221–1231.

Xiao, X., Wang, W., and Wang, Z. (2014). The role of chemotherapy for metastatic, relapsed and refractory osteosarcoma. *Paediatr. Drugs* *16*, 503–512.

Xiong, L., Jung, J.-U., Wu, H., Xia, W.-F., Pan, J.-X., Shen, C., Mei, L., and Xiong, W.-C. (2015). Lrp4 in osteoblasts suppresses bone formation and promotes osteoclastogenesis and bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 3487–3492.

Xu, L., and Massagué, J. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 209–219.

Xu, J., Chen, Y., Huo, D., Khramtsov, A., Khramtsova, G., Zhang, C., Goss, K.H., and Olopade, O.I. (2016). β -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* *55*, 431–439.

Xu, N., Li, Z., Yu, Z., Yan, F., Liu, Y., Lu, X., and Yang, W. (2014). MicroRNA-33b suppresses migration and invasion by targeting c-Myc in osteosarcoma cells. *PloS One* *9*, e115300.

Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002). c-*myc* is a Downstream Target of the Smad Pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 854–861.

Yamamoto, H., Komekado, H., and Kikuchi, A. (2006). Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev. Cell* *11*, 213–223.

Yamamoto, H., Sakane, H., Yamamoto, H., Michiue, T., and Kikuchi, A. (2008). Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Dev. Cell* *15*, 37–48.

Yang, Y., Han, L., He, Z., Li, X., Yang, S., Yang, J., Zhang, Y., Li, D., Yang, Y., and Yang, Z. (2018). Advances in limb salvage treatment of osteosarcoma. *J. Bone Oncol.* *10*, 36–40.

Yao, J., Qin, L., Miao, S., Wang, X., and Wu, X. (2016). Overexpression of miR-506 suppresses proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells by targeting astrocyte elevated gene-1. *Oncol. Lett.* *12*, 1840–1848.

Yu, J., and Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S71-83.

Zanger, K., Radovick, S., and Wondisford, F.E. (2001). CREB Binding Protein Recruitment to the Transcription Complex Requires Growth Factor-Dependent Phosphorylation of Its GF Box. *Mol. Cell* 7, 551-558.

Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36, 1461-1473.

Zhang, X., and Hao, J. (2015). Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am. J. Cancer Res.* 5, 2344-2360.

Zhang, C., Hu, Y., Wan, J., and He, H. (2015). MicroRNA-124 suppresses the migration and invasion of osteosarcoma cells via targeting ROR2-mediated non-canonical Wnt signaling. *Oncol. Rep.* 34, 2195-2201.

Zhang, F., Chen, A., Chen, J., Yu, T., and Guo, F. (2011a). Influence of β -catenin small interfering RNA on human osteosarcoma cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 31, 353-358.

Zhang, F., Chen, A., Chen, J., Yu, T., and Guo, F. (2011b). siRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 12, 239-245.

Zhang, J., Tian, X.-J., and Xing, J. (2016a). Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J. Clin. Med.* 5.

Zhang, L., Wang, J.-N., Tang, J.-M., Kong, X., Yang, J.-Y., Zheng, F., Guo, L.-Y., Huang, Y.-Z., Zhang, L., Tian, L., et al. (2012). VEGF is essential for the growth and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 39, 5085-5093.

Zhang, M., Wang, M., Tan, X., Li, T.-F., Zhang, Y.E., and Chen, D. (2010). Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 8703-8710.

Zhang, R.-X., Li, Y., Tian, D.-D., Liu, Y., Nian, W., Zou, X., Chen, Q.-Z., Zhou, L.-Y., Deng, Z.-L., and He, B.-C. (2016b). Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis by inactivating Wnt/ β -catenin signaling in human osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* 49, 1973-1982.

Zhang, W., Zhang, Q., Zheng, T.-T., Zhen, J.-C., and Niu, X.-H. (2016c). Delayed High-dose Methotrexate Excretion and Influencing Factors in Osteosarcoma Patients. *Chin. Med. J. (Engl.)* 129, 2530-2534.

Zhang, X., Gaspard, J.P., and Chung, D.C. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 61, 6050-6054.

Zhang, Y., He, Z., Duan, Y., Wang, C., Kamar, S., Shi, X., Yang, J., Yang, J., Zhao, N., Han, L., et al. (2018a). Does intensified chemotherapy increase survival outcomes of osteosarcoma patients? A meta-analysis. *J. Bone Oncol.* 12, 54-60.

Zhang, Y., Yang, J., Zhao, N., Wang, C., Kamar, S., Zhou, Y., He, Z., Yang, J., Sun, B., Shi, X., et al. (2018b). Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma. *Oncol. Lett.* *16*, 6228–6237.

Zhang, Y.-H., Li, B., Shen, L., Shen, Y., and Chen, X.-D. (2013). The role and clinical significance of YES-associated protein 1 in human osteosarcoma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *26*, 157–167.

Zhao, S., Kurenbekova, L., Gao, Y., Roos, A., Creighton, C.J., Rao, P., Hicks, J., Man, T.-K., Lau, C., Brown, A.M.C., et al. (2015). NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* *34*, 5069.

Zhao, Y., Jian, W., Gao, W., Zheng, Y.-X., Wang, Y.-K., Zhou, Z.-Q., Zhang, H., and Wang, C.-J. (2013). RNAi silencing of c-Myc inhibits cell migration, invasion, and proliferation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line: c-Myc silencing in hepatocellular carcinoma cell. *Cancer Cell Int.* *13*, 23.

Zhao, Y., Masiello, D., McMillian, M., Nguyen, C., Wu, Y., Melendez, E., Smbatyan, G., Kida, A., He, Y., Teo, J.-L., et al. (2016). CBP/catenin antagonist safely eliminates drug-resistant leukemia-initiating cells. *Oncogene* *35*, 3705–3717.

Zhou, B., Liu, Y., Kahn, M., Ann, D.K., Han, A., Wang, H., Nguyen, C., Flodby, P., Zhong, Q., Krishnaveni, M.S., et al. (2012). Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.* *287*, 7026–7038.

Zhou, Q., Deng, Z., Zhu, Y., Long, H., Zhang, S., and Zhao, J. (2010). mTOR/p70S6K signal transduction pathway contributes to osteosarcoma progression and patients' prognosis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *27*, 1239–1245.

Zhou, Q., Xian, M., Xiang, S., Xiang, D., Shao, X., Wang, J., Cao, J., Yang, X., Yang, B., Ying, M., et al. (2017). All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 547–559.

Zhuo, B., Shi, Y., Qin, H., Sun, Q., Li, Z., Zhang, F., Wang, R., and Wang, X. (2017). Interleukin-24 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via the JNK/c-Jun signaling pathways. *Oncol. Lett.* *13*, 4505–4511.

Zou, Y., Yang, J., and Jiang, D. (2015). Resveratrol inhibits canonical Wnt signaling in human MG-63 osteosarcoma cells. *Mol. Med. Rep.* *12*, 7221–7226.

Titre : Implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement tumoral primaire et métastatique des ostéosarcomes

Mots clés : Ostéosarcome, Wnt/ β -caténine, ICG-001, CBP/ β -caténine, Dissémination métastatique

Résumé : L'ostéosarcome est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez les enfants avec 150 nouveaux cas par an en France. La survie des patients n'a pas évolué depuis 30 ans, atteignant 70 % à 5 ans pour les patients présentant une forme localisée de la maladie, mais seulement 25 % en présence de métastases (20% des cas), aucun traitement ne montrant une efficacité suffisante chez ces patients métastatiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, une dérégulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine a été rapportée dans de nombreux cas d'ostéosarcome, mais son implication dans le développement de ces tumeurs reste controversée. Ainsi, nous avons évalué le potentiel anti-tumoral de l'ICG-001, une molécule ciblant spécifiquement l'interaction entre la protéine de

liaison CREB Binding Protein (CBP), et la β -caténine et inhibant ainsi la transcription dépendante de ce complexe, dans trois lignées cellulaires d'ostéosarcome humain, KHOS, MG63 et SJSA1. L'ICG-001 diminue la prolifération cellulaire mais, de façon surprenante, favorise la migration des cellules *in vitro* et le développement de métastases pulmonaires dans un modèle murin de xénogreffe induit par une injection para-tibiale de cellules KHOS. Cet effet pro-migratoire pourrait résulter en partie, d'un déplacement d'équilibre transcriptionnel d'un complexe se composant de la β -caténine et de CBP vers un complexe incluant la β -caténine et un autre cofacteur p300. Cette étude ajoute donc un niveau de complexité quant au rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement métastatique de l'ostéosarcome.

Title: Involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the primary and metastatic tumor development of osteosarcoma

Keywords: Osteosarcoma, Wnt/ β -catenin, ICG-001, CBP/ β -catenin, Metastatic dissemination

Abstract: Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor in children with 150 new cases per year in France. Patient survival has not been improved for the last decades, reaching 70% to 5 years for patients with localized disease, but only 25% for patients with metastatic disease (20% of cases), no effective treatment could develop for these patients with metastases at diagnosis. Therefore, it is necessary to develop new therapeutic strategies. In this context, a deregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway has been reported in many cases of osteosarcomas, but its involvement in the development of these tumors remains controversial. Thus, we evaluated the anti-tumor potential of ICG-001, a small molecule

specifically targeting the interaction between the CREB Binding Protein (CBP) and the β -catenin, inhibiting the dependent transcription of this complex, in three human osteosarcoma cell lines, KHOS, MG63 and SJSA1. ICG-001 reduces cell proliferation but, surprisingly, promotes cell migration *in vitro* and the development of pulmonary metastases in a mouse xenograft model induced by para-tibial injection of KHOS cells. This pro-migratory effect could result in part from a transcriptional switch from a complex consisting of β -catenin and CBP to a complex including β -catenin and another cofactor, p300. Thus, this study adds a level of complexity to the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the metastatic development of osteosarcoma.