



HAL
open science

ÉVALUATION PRECLINIQUE DE NOUVELLES THERAPIES CIBLANT LES OSTEOCLASTES DANS LE TRAITEMENT DES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN.

Céline Le Gall

► **To cite this version:**

Céline Le Gall. ÉVALUATION PRECLINIQUE DE NOUVELLES THERAPIES CIBLANT LES OSTEOCLASTES DANS LE TRAITEMENT DES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00262124

HAL Id: tel-00262124

<https://theses.hal.science/tel-00262124>

Submitted on 11 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 18 décembre 2007

par

Céline LE GALL

ÉVALUATION PRECLINIQUE DE NOUVELLES THERAPIES CIBLANT LES OSTEOCLASTES DANS LE TRAITEMENT DES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN

INSERM UMR 664 :

« Mécanismes et Traitements des Métastases Osseuses des Tumeurs Solides »

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive

Directeur de thèse : Dr Philippe CLEZARDIN

Membres du jury

Monsieur le Professeur Roland CHAPURLAT
Madame le Professeur Marie-Christine de VERNEJOUL
Monsieur le Professeur René RIZZOLI
Monsieur le Docteur Patrick GARNERO
Monsieur le Docteur Philippe CLEZARDIN

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de cette thèse.



Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse le Docteur Philippe Clézardin, pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son équipe et accordée tout au long de ces quatre années de recherche.

Je remercie également Marie-Christine De Vernejoul et René Rizzoli pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur, mais également Pierre Delmas et Patrick Garnero pour avoir accepté d'être examinateurs.



Je remercie tous ceux qui m'ont entourés « aux laboratoires » au cours de mes cinq années de recherche. Je tiens en effet à ne pas oublier de remercier ceux avec qui j'ai effectué mes premiers pas en DEA, au labo LBMC de l'ENS: Armelle Roisin et Arnaud Favre-Bonvin. Leurs premiers enseignements, conseils, leur soutien et leur enthousiasme ont énormément contribué à ma décision de continuer en thèse. Merci alors aux « anciens » du laboratoire U664 encore présents lorsque j'ai commencé ma thèse au sein de l'Unité, 403 à l'époque. Merci particulièrement à Pierrick Fournier, qui malgré les kilomètres me donne encore de précieux renseignements (parfois scientifiques, parfois administratifs) et reste toujours prêt à aider ainsi qu'à Julien Guglielmi, pour sa contribution dans mes premiers protocoles animaux. Je remercie par ailleurs, pour m'avoir enseigné des gestes de microchirurgie, Marc Colombel (qui m'a aussi donné l'occasion d'assister à une intervention chirurgicale), Lucien Frappart et Patrice Methevet. Merci à nos collaborateurs Johann Zimmermann pour le CKI et l'apprentissage des injections intra-tibiales et à Philippe Pujuguet pour les p.o.

Merci à Olivier P, Richard B et Edith B pour leur aide, leur soutien et leurs conseils scientifiques. Et ceci tout particulièrement pour la préparation des congrès (et oraux) ! Merci à eux de pouvoir accorder malgré leurs emplois du temps déjà bien chargés, de la disponibilité. Je n'oublierai pas non plus leur aide précieuse dans les aéroports américains ! Merci aussi à Claire-Marie pour son aide technique, notamment pour les coupes au microtom, et à Marie-Claude, pour son aide administrative. Merci à ceux, étudiants et non étudiants, qui partagent le « bureau des étudiants » (Florence, Sylvain, Delphine, Blandine, Marion et Vincent, et les dernières arrivées Anaïs et Ismahène) et qui contribuent à l'ambiance cohésive du laboratoire. J'aurais appris avec eux un art qui me servira bien au-delà de ma thèse, l'art du M. Les soirées décompressantes partagées, notamment à la fin de ma thèse, m'ont été très bénéfiques ! Merci pour votre pep's !



Un grand merci à mes amis pour tous nos instants partagés, que ce soit dans les moments difficiles comme dans les moments heureux, sportifs ou festifs ! Merci au « groupe DEA », particulièrement à Laure et Fabrice. A nos débuts dans la recherche (bien que le DEA soit déjà un peu loin) !! Merci à Céline pour son enthousiasme pour la vie et pour la recherche, ce qui permet parfois une piquûre de rappel ! Merci à Sylvain et Flo (2 fois valent mieux qu'une), collègues mais surtout amis. A sylvain, pour ses bons petits plats, nos petits resto de midi et soirées informatiques entre autres. A Flo, pour avoir répondu présente dans tous les moments importants ! Même si je pars, je saurai aussi être disponible pour la fin de thèse, si besoin est bien entendu ! Merci à Manu, pour sa soif de vivre, son enthousiasme général, sa curiosité ! A nos réflexions sur les pourquoi du comment... Vivre nos fins de thèse en même temps est tombé à point nommé et m'a particulièrement aidé à faire face aux difficultés ! Je pense aussi à ceux avec qui j'ai partagé des week-end aériens, qui m'ont permis de souffler avant ma période « no-life » ; Anne L, Anne B, Seb, Estelle et Aurélie. Je remercie sincèrement Xav' (alias la mèche, fur, fiorlett') pour son écoute, ce qu'il est et représente à mes yeux. Et enfin, un grand et tendre MERCI encore à Maël, merci de m'avoir pris par la main quand j'en avais besoin, d'avoir su me rassurer dans mes périodes de doutes. A ta patience sans bornes...



Finalement, pour leur soutien inconditionnel et permanent, je tiens à remercier de tout cœur ma petite famille. Mes parents, M'man et Yann, ma petite Titi, mon petit Gwen (qui ne sont déjà finalement plus si petits).

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
ABREVIATIONS	7
RESUME	9
PARTIE I. AVANT-PROPOS	10
PARTIE II. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. LE TISSU OSSEUX HUMAIN	14
1.1. Organisation macroscopique du tissu osseux	14
1.1.1. L'os cortical.....	15
1.1.2. L'os trabéculaire.....	15
1.2. Organisation microscopique et cellulaire du tissu osseux	17
1.2.1. La matrice extracellulaire osseuse	17
1.2.1.1. Matrice inorganique	17
1.2.1.2. Matrice organique.....	17
1.2.1.2.1. Le collagène	18
1.2.1.2.2. Les protéines non collagéniques.....	19
1.2.2. Les cellules osseuses	22
1.2.2.1. Les ostéoclastes	22
1.2.2.2. Les ostéoblastes.....	26
1.2.2.3. Les ostéocytes	28
1.2.2.4. Les cellules bordantes.....	31
1.3. Le remodelage osseux	31
1.3.1. Processus du remodelage osseux	31
1.3.2. Régulation du remodelage osseux	33
1.3.2.1. L'hormone parathyroïdienne (Parathyroid hormone, PTH).....	33
1.3.2.2. Le TGF- β et les IGFs osseux.....	33
2. PHYSIOPATHOLOGIE DES METASTASES OSSEUSES DES TUMEURS SOLIDES....	35
2.1. Mécanismes associés à l'ostéophilie des cancers	36
2.1.1. L'ostéotropisme	36
2.1.1.1. Mécanismes impliqués dans la migration des cellules métastatiques vers l'os.....	36
2.1.1.1.1. Rôle des chimiokines	36
2.1.1.1.2. Rôle de RANKL.....	37
2.1.1.2. Attachement des cellules à l'endothélium (extravasation).....	38
2.1.1.3. Invasion / Migration	39
2.1.1.3.1. Les intégrines	40
2.1.1.3.2. Les protéases	41
2.1.2. L'ostéomimétisme	42
2.2. Mécanismes de formation des métastases ostéolytiques	43
2.2.1. Stimulateurs de la résorption osseuse	43
2.2.1.1. La protéine apparentée à la parathormone (PTHrP)	43
2.2.1.2. Cytokines.....	44
2.2.1.3. Prostaglandines.....	45
2.2.2. Inhibiteurs de la formation osseuse.....	46
2.2.2.1. Dickkopf-1	46
2.2.2.2. Noggin.....	48
2.2.3. Contribution du tissu osseux dans l'ostéolyse	49
2.2.3.1. TGF- β	49
2.2.3.2. IGF-1	51
2.2.3.3. Calcium	51
2.3. Mécanismes de formation des métastases ostéocondensantes	52
2.3.1. Stimulateurs de la formation osseuse.....	53

2.3.1.1. ET-1	53
2.3.1.2. PHeP [1-23]	54
2.3.1.3. BMPs.....	54
2.3.1.4. Autres facteurs.....	55
2.3.1.4.1. VEGF	55
2.3.1.4.2. PDGF	55
2.3.1.4.3. Adrénomédulline.....	55
2.3.2. Inhibiteurs de la résorption osseuse	56
2.3.3. Contribution du tissu osseux dans l'ostéocondensation	56
2.3.3.1. IGFs, BMPs.....	56
2.3.3.2. TGF- β	57
2.3.3.3. Calcium	57
2.4. Le cercle vicieux des métastases osseuses.....	58
3. BISPHOSPHONATES ET TRAITEMENT DES METASTASES OSSEUSES	60
3.1. Introduction à la maladie métastatique et ses traitements	60
3.2. Les Bisphosphonates	61
3.2.1. Relation entre la structure et la fonction des Bisphosphonates	61
3.2.2. Mécanismes d'action intracellulaire des BPs.....	63
3.2.2.1. Les BPs non azotés.....	63
3.2.2.2. Les BPs azotés.....	65
3.2.2.2.1. Inhibition de la Farnésyle diphosphate synthase (FPP synthase)	65
3.2.2.2.2. Synthèse d'un analogue d'ATP issu de l'IPP	67
3.2.3. Effets des BPs sur les cellules de l'os.....	68
3.2.3.1. Effets sur les ostéoclastes et précurseurs ostéoclastiques	68
3.2.3.2. Effets sur les ostéoblastes.....	69
3.2.4. Effets anti-tumoraux des BPs	71
3.2.4.1. Effets anti-tumoraux <i>in vitro</i>	71
3.2.4.1.1. Effets sur l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales	71
3.2.4.1.2. Effets sur la prolifération et la survie des cellules tumorales	73
3.2.4.2. Effets anti-tumoraux <i>in vivo</i>	76
3.2.4.2.1. Effets dans les modèles animaux de métastases osseuses	76
3.2.4.2.2. Effets dans les modèles animaux de tumorigenèse et de métastases dans les tissus mous	78
3.2.4.3. Conclusion, perspectives	81
PARTIE III. TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	83
1. OBJECTIF DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	84
2. ETUDE PRECLINIQUE DE L'EFFET D'UN INHIBITEUR DE LA CATHEPSINE K SUR LES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN	86
2.1. Introduction	86
2.2. Article (<i>Le Gall et al., 2007</i>)	87
2.3. Résultats complémentaires non publiés	88
2.3.1. Matériels et méthodes	88
2.3.1.1. Drogue.....	88
2.3.1.2. Lignées et culture cellulaire.....	88
2.3.1.3. Test d'invasion des cellules tumorales BT474 <i>in vitro</i>	88
2.3.1.4. Analyse de l'activité ostéoclastique <i>in vitro</i>	88
2.3.1.5. Analyse histologique	89
2.3.2. Résultats non publiés	89
2.3.2.1. Effets d'un inhibiteur de cathepsine K sur l'invasion tumorale <i>in vitro</i>	89
2.3.2.2. Effets d'un inhibiteur de cathepsine K sur les ostéoclastes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	90
2.4. Discussion	92
3. ETUDE PRECLINIQUE DE L'EFFET D'UNE POLYTHERAPIE (INHIBITEUR DE CATHEPSINE K, ZOLEDRONATE ET GLEEVEC) SUR LES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN	96
3.1. Introduction	96
3.2. Matériels et méthodes	97
3.2.1. Culture cellulaire.	97
3.2.2. Drogues.	97
3.2.3. Test de viabilité/prolifération cellulaire.....	97
3.2.4. Test d'invasion cellulaire.....	98

3.2.5. Animaux.....	98
3.2.6. Modèle de métastases osseuses.....	98
3.2.7. Analyse osseuse.....	99
3.2.8. Modèle animal de tumorigenèse sous-cutanée.....	99
3.2.9. Analyse statistique.....	100
3.3. Résultats.....	100
3.3.1. Effet du Gleevec sur la progression des lésions ostéolytiques de cancer du sein (Protocole curatif).....	100
3.3.2. Effet du Gleevec sur la formation des lésions ostéolytiques de cancer du sein (Protocole préventif).....	103
3.3.3. Effet du Gleevec sur la prolifération des cellules B02 <i>in vivo</i>	104
3.3.4. Effet du Gleevec sur la prolifération et l'invasion des cellules B02 <i>in vitro</i>	105
3.4. Discussion.....	107
PARTIE IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	109
PARTIE V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	112
PARTIE VI. ANNEXE.....	136

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES :

Figure 1. Représentation schématique de la section longitudinale d'un os long en croissance.	15
Figure 2. Architecture osseuse au niveau d'un os long à la jonction entre l'os trabéculaire et l'os cortical.....	16
Figure 3. Maturation extracellulaire des molécules de collagène de type 1.....	19
Figure 4. Différenciation ostéoclastique.	24
Figure 5. Schéma d'un ostéoclaste résorbant.	25
Figure 6. Différenciation ostéoblastique.	28
Figure 7. Ostéocyte d'un os cortical vu en microscopie électronique à transmission.....	29
Figure 8. Modèle proposé pour le rôle des ostéocytes dans le maintien de l'architecture osseuse.....	30
Figure 9. Représentation schématique du processus de remodelage osseux.....	32
Figure 10. Attachement des cellules tumorales aux micro-domaines vasculaires SDF-1+ E-sélectine+.....	39
Figure 11. Représentation de la voie canonique de signalisation Wnt.....	47
Figure 12. Représentation de la voie de signalisation régulée par les BMPs et Smad 1/5.	48
Figure 13. Représentation de la voie de signalisation régulée par le TGF- β et les protéines Smads.	49
Figure 14. Interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans le développement d'une métastase ostéolytique.....	52
Figure 15. Interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans le développement d'une métastase ostéocondensante.....	58
Figure 16. Représentation du pyrophosphate et d'un Bisphosphonate.	62
Figure 17. Formules chimiques de l'ATP et d'analogues non hydrolysables d'ATP formés à partir de clodronate, d'étidronate ou de tiludronate.	64
Figure 18. Représentation schématique de la voie du mévalonate.	66
Figure 19. Formule chimique du métabolite ApppI issu de la condensation de l'AMP et de l'IPP.....	68
Figure 20. Les voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	74

Figure 21. Représentation des voies de signalisations impliquées dans l'effet anti-apoptotique de la protéine Ras.	75
Figure 22. Structure d'un inhibiteur de cathepsine K (AAE-581).	88
Figure 23. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K sur l'invasion des cellules tumorales BT474 <i>in vitro</i>	90
Figure 24. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K sur les ostéoclastes au site métastatique.	91
Figure 25. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K sur la résorption osseuse régulée par les ostéoclastes <i>in vitro</i>	92
Figure 26. Structure du Gleevec.	97
Figure 27. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec sur la progression des métastases osseuses chez la souris nude.	102
Figure 28. Effet du Gleevec sur la croissance sous-cutanée des xéno greffes de cellules B02.	105
Figure 29. Effet du Gleevec sur la prolifération des cellules B02 <i>in vitro</i>	106
Figure 30. Effet du Gleevec sur l'invasion des cellules tumorales B02 <i>in vitro</i>	106

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1. Fonctions des principales protéines non collagéniques de l'os.	20
Tableau 2. Effets des facteurs systémiques et locaux sur le remodelage osseux.	34
Tableau 3. Puissance relative de différentes générations de BPs à inhiber la résorption osseuse.	62
Tableau 4. Etudes de différents BPs dans des modèles murins de métastases osseuses.	78
Tableau 5. Effets des BPs dans les modèles animaux de tumorigénèse et de formation des métastases dans les tissus non minéralisés.	80
Tableau 6. Effet d'un inhibiteur de Cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec, seuls ou en association sur la progression des métastases osseuses du cancer du sein.	101
Tableau 7. Effet d'un inhibiteur de Cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec, seuls ou en association sur la formation des métastases osseuses du cancer du sein.	104

ABREVIATIONS

AM	Adrénomédulline
AMP	Adénosine Monophosphate
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
ATP	Adénosine Triphosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMU	Unité Multicellulaire de Base
BP	Bisphosphonate
BS	Bone Surface
BSP	Bone Sialoprotein
BV	Bone Volume
CAII	Anhydrase Carbonique II
CAM	Cell Adhesion Molecule
CaSR	Récepteur du Calcium
Cbfb	Core Binding Factor β
CCN2	Cystein rich connective protein 2, ou CTGF
CFU-GM	Granulocyte Macrophage Colony Forming Unit
CIC	Canaux Chlorure
CKI	Inhibiteur de Cathepsine K
CTGF	Connective tissue growth factor, ou CCN2
CXCL12	ou SDF-1 α
DKK1	Dickkopf homolog 1
Dll1	Delta-like 1
DMAPP	Diméthylallyle diphosphate
ET-1	Endothéline 1
ET _A /ET _B	Récepteurs de type A ou B des endothélines
FADD	Fas-Associated Death Domain
FAK	Focal Adhesion Kinase
Flt1	Fms like tyrosine kinase 1
FOH	Farnésol
FPP	Farnésyle diphosphate
Frz	Frizzled
Ftase	Farnésyle Transférase
GAG	Glycosaminoglycane
GGOH	Géranylgéraniol
GGPP	Géranylgéranyle diphosphate
GGTase	Géranylgéranyle Transférase
Glee	Glevec
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
H ⁺ -ATPase	Pompe à protons vacuolaire ATPase-dépendante
HB-GAM	Heparin Binding Growth Associated Molecule, ou Osf1
i.p.	Intra-péritonéale
i.v.	Intra-veineuse
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	IGF Binding Protein
Il	Interleukine

IPP	Isopentényle diphosphate
KDR	Kinase Domain containing Receptor
Krm	Kremen
LED	Lowest Effective Dose
LEF	Lymphoid Enhancer Factor, ou TCF
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRP5/6	Low density Lipoprotein Receptor related Protein 5/6
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MMP	Matrix Metalloprotease
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFκB	Nuclear Factor κB
OB	Ostéoblaste
OC	Ostéoclaste
Oc.S	Surface TRAP-positive (recouverte d'ostéoclastes)
OPG	Ostéoprotégérine
OPN	Ostéopontine
Osf-1	Osteoblast Stimulating Factor 1, ou HB-GAM
p.o.	Per os, administration orale
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandine
PPi	Pyrophosphate inorganique
PSA	Prostate Specific Antigen
PTH	Parathyroïd hormone
PTHR	Récepteur de la PTH
PTHrP	PTH related Protein
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotéine Ligand-1
RANK	Receptor Activator of NFκB
RANKL	RANK ligand
RGD	Séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique
Runx2	ou Cbfa1, Core Binding Factor α 1, ou Osf2, Osteoblast Specific Factor
s.c.	Sous-cutané
SDF-1α	Stromal-Derived Factor-1α, ou CXCL12
STV	Soft Tissue Volume
TACE	TNF-α Converting Enzyme, ou ADAM-17
TB	Tumor burden
TCF	T-Cell Factor, ou LEF
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor family
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
TV	Tissue Volume
uPA	Urokinase type Plasminogen Activator
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Zol	Zoledronate

RESUME

Les métastases osseuses sont des complications fréquentes de nombreux cancers. Elles génèrent une morbidité importante et peuvent même engager le pronostic vital des patients. Or, les traitements actuels (bisphosphonates) visant à cibler l'ostéolyse maligne (et donc à inhiber la résorption osseuse) sont uniquement donnés de façon palliative et ne permettent pas d'améliorer la survie des patients.

Nous avons testé l'efficacité de deux nouveaux agents pharmacologiques ciblant les cellules responsables de la résorption osseuse, les ostéoclastes. Nous avons ainsi démontré *in vitro* qu'un inhibiteur de cathepsine K (CKI) inhibe l'activité des ostéoclastes, et réduit de ce fait le développement des métastases osseuses *in vivo* en agissant indirectement sur les cellules tumorales. Par ailleurs, nous avons montré qu'un inhibiteur de tyrosine kinase, le Gleevec, inhibe aussi significativement la formation et la progression des métastases osseuses *in vivo*, en ayant une activité anti-ostéoclastique et anti-tumorale.

Nous avons ensuite testé l'efficacité d'une polythérapie ciblant les ostéoclastes, en utilisant le zolédronate, un BP couramment utilisé en clinique en tant que traitement palliatif des métastases osseuses associées au cancer du sein, le CKI et le Gleevec. Une telle stratégie est favorable pour limiter les risques d'échappement aux traitements et peut favoriser une synergie d'action entre les médicaments. Toutefois, nos résultats montrent que dans nos conditions d'utilisation, aucune synergie d'action entre ces trois composés n'a lieu.

Pour conclure, nos résultats précliniques montrent que le CKI et le Gleevec sont des composés pharmacologiques efficaces dans le traitement des métastases osseuses chez l'animal. Ils pourraient constituer de nouvelles approches thérapeutiques en clinique dans le traitement des métastases osseuses associées au cancer du sein.

PARTIE I.

AVANT-PROPOS

Dans les pays occidentaux, le cancer du sein est de loin le plus fréquent des cancers chez la femme ; il représente un quart d'entre eux. Ainsi, on estime qu'environ 1 femme sur 11 développera un cancer du sein au cours de sa vie. En France, environ 38 000 nouveaux cancers du sein sont diagnostiqués chaque année (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer <http://www.fnclcc.fr>). Ce cancer existe aussi chez l'homme, mais c'est un événement extrêmement rare qui représente moins de 1% des cancers du sein. Chez l'homme, le cancer le plus fréquent est le cancer de la prostate, avec 40 000 cas diagnostiqués chaque année en France (<http://www.fnclcc.fr>). Le pronostic, comme pour la plupart des cancers, dépend alors moins de l'évolution locale de la tumeur primitive que d'une dissémination à distance aboutissant au développement de métastases. On estime qu'environ 85% des hommes avec un cancer évolué de la prostate, et environ 50 % des femmes avec un cancer du sein développeront des métastases osseuses dans l'évolution de leur maladie. Or, malgré les avancées thérapeutiques et les progrès au niveau diagnostique, la mortalité et la morbidité associées à ces cancers restent élevées dès lors que des métastases osseuses apparaissent. La survie moyenne est alors de l'ordre de 28 à 30 mois et, quelque soit le pronostic, ces métastases vont être une source de complications graves chez le patient, telles que douleurs osseuses, fractures pathologiques, compressions médullaires et hypercalcémie. C'est pour ces raisons que la survenue de métastases osseuses chez les patients constitue un problème de Santé Public.

Au site osseux, que les métastases soient ostéocondensantes (excès de formation osseuse), ostéolytiques (augmentation de la résorption osseuse) ou mixtes, les cellules tumorales conduisent à une augmentation de la résorption osseuse. Elles produisent des facteurs (*i.e.*, PTHrP, RANKL) qui stimulent le recrutement et l'activité des ostéoclastes qui en retour, conduisent à la libération de différents facteurs stockés dans la matrice osseuse (*i.e.*, TGF- β , IGFs). Ces derniers stimulent la prolifération des cellules métastatiques, et il s'en suit ainsi un cercle vicieux dans lequel prolifération tumorale et résorption osseuse s'entretiennent mutuellement. Les approches thérapeutiques actuelles sont basées sur la compréhension des mécanismes qui conduisent à la formation de ces métastases et visent préférentiellement à diminuer la résorption osseuse afin de freiner la progression des lésions osseuses. Dans ce contexte, les BPs sont des agents anti-résorptifs puissants qui ont maintenant une place prépondérante en clinique dans le traitement des métastases osseuses. Toutefois, le traitement est palliatif et ne fait que ralentir la progression des lésions osseuses; il n'a pas d'effet anti-

tumoral et n'améliore pas la survie des patients. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de traitements curatifs.

Ainsi, dans le cadre de recherche de nouvelles thérapies qui pourraient être données à visée curative aux patients, l'objectif de cette thèse a été d'étudier le bénéfice d'une polythérapie ciblée sur les ostéoclastes par rapport à la monothérapie conventionnelle (BP). Pour cela, nous avons étudié les effets d'agents pharmacologiques ciblant dans les ostéoclastes la cathepsine K (une cystéine protéase) et le c-fms (le récepteur tyrosine kinase du M-CSF).

Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur le tissu osseux, les métastases osseuses des tumeurs solides et l'utilisation des BPs en cancérologie, nous présenterons les résultats obtenus au cours des travaux de thèse et les perspectives qui en découlent.

PARTIE II.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE TISSU OSSEUX HUMAIN

L'os est un tissu conjonctif dense et vivant très spécialisé qui constitue, avec le cartilage, le squelette de l'Homme. Celui-ci est composé de 350 os chez l'enfant, puis 206 chez l'adulte, suite à la soudure de certains d'entre eux au cours de la croissance.

Les os, et le squelette de façon générale, assurent plusieurs fonctions dans l'organisme: (1) ils supportent les structures corporelles, (2) facilitent la mobilité du corps en conjonction avec les muscles, (3) protègent les organes internes, (4) permettent de stocker les sels minéraux (phosphore, magnésium), (5) régulent l'homéostasie, et (6) sont impliqués dans la formation des cellules sanguines.

1.1. Organisation macroscopique du tissu osseux

Anatomiquement, on distingue trois types d'os dans le squelette : les os plats (omoplate, crâne, mandibule), les os longs (fémur, tibia, humérus) et les os courts (vertèbres, phalanges). Ces types d'os résultent de deux types de développement distincts : l'ossification des os plats est membranaire sans ébauche cartilagineuse préalable, alors que celle des os courts et longs est endochondrale, c'est-à-dire à partir d'une ébauche cartilagineuse.

L'analyse d'un os long montre deux extrémités larges (les épiphyses), un tube plus ou moins cylindrique au milieu (la diaphyse), et une zone de développement entre épiphyse et diaphyse (les métaphyses) (Figure 1). Dans un os long en croissance, épiphyse et métaphyse sont séparées par une couche de cartilage, appelée la plaque de croissance. L'endoste et le périoste sont les couches de tissu recouvrant respectivement la partie interne et la partie externe de l'os cortical. Pour tout os, on distingue deux types d'architecture : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux).

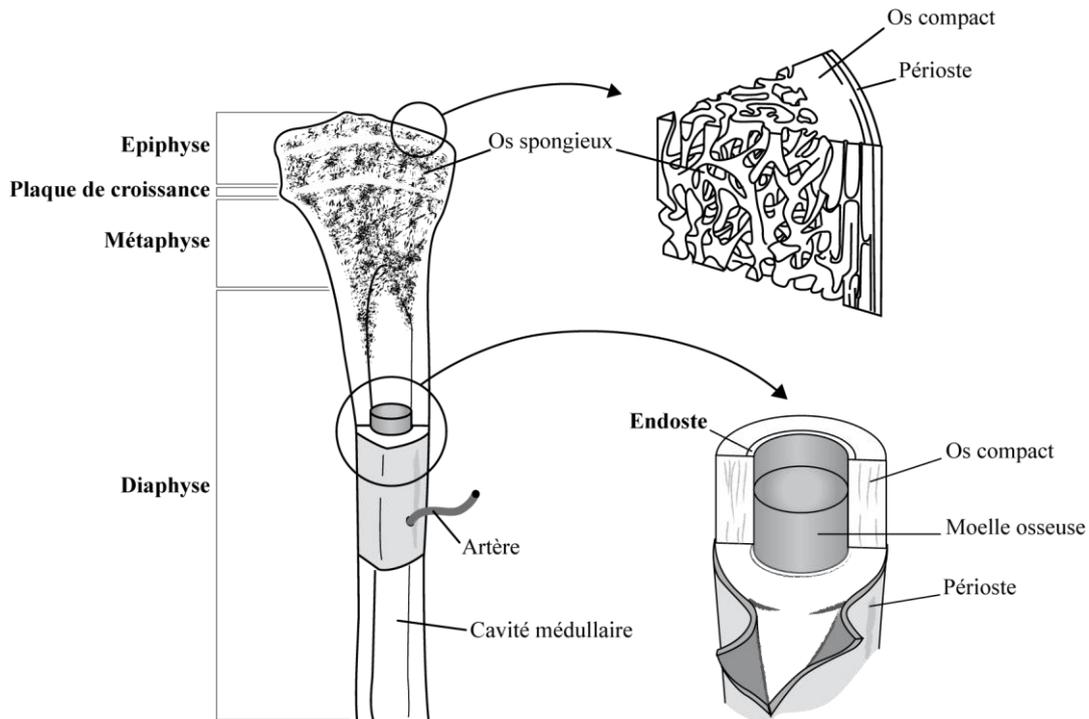


Figure 1. Représentation schématique de la section longitudinale d'un os long en croissance.

1.1.1. L'os cortical

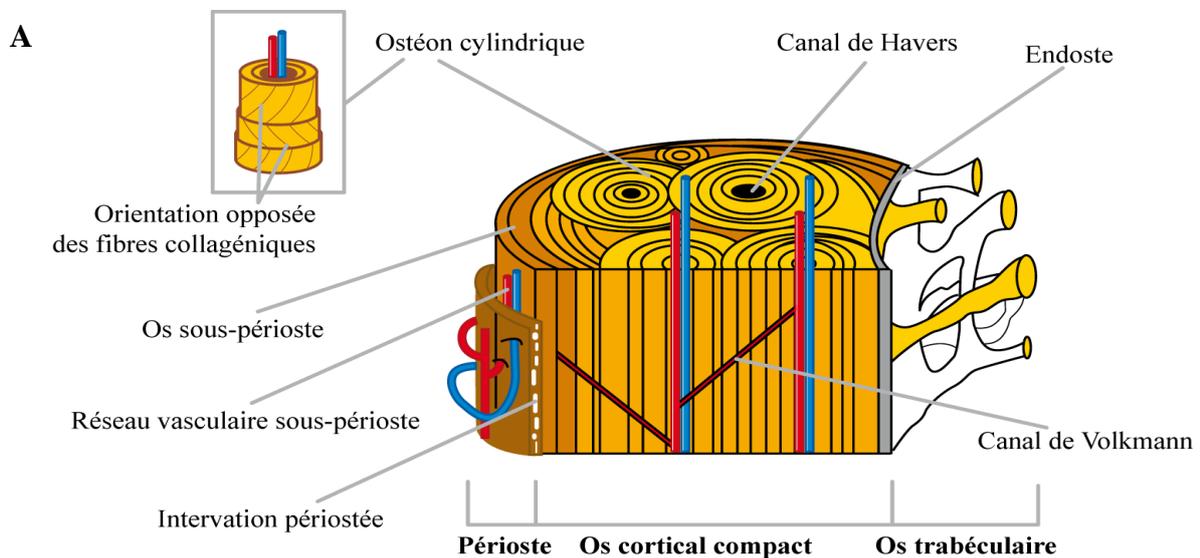
L'os cortical (Figure 2) constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts. Il représente 90% du squelette. Ce tissu calcifié fin et dense, renferme la cavité médullaire dans laquelle se situe la moelle osseuse. Il constitue une enveloppe résistante, qui se compose d'une juxtaposition d'ostéons cylindriques alignés les uns par rapport aux autres, parallèlement à l'axe de la diaphyse. Chaque ostéon est composé de lamelles concentriques centrées sur un canal dit de « Havers ». Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux, dits de Volkmann. Chaque canal est centré par un vaisseau innervé qui communique avec les vaisseaux de la moelle et la vascularisation du périoste.

1.1.2. L'os trabéculaire

L'os trabéculaire (Figure 2), situé dans les épiphyses et métaphyses des os longs et à l'intérieur des os plats ou courts, est moins dense et friable. En poids, il représente 10% du squelette. Ce tissu a une structure alvéolaire ; il est constitué de lamelles osseuses disposées

en travées (ou trabécules osseuses) entre lesquelles se trouvent limitées des cavités remplies de moelle osseuse hématogène et de vaisseaux sanguins.

Bien que l'os cortical et trabéculaire soient composés par les mêmes cellules et par la même matrice, ils ont des structures et fonctions différentes. Une des différences structurales déterminante est quantitative : 85% du volume d'os cortical est calcifié contre 20% seulement du volume d'os trabéculaire, le reste étant occupé par la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins et l'endoste. Il en résulte que l'os trabéculaire assure une fonction principalement métabolique (la surface d'échange avec la moelle osseuse étant favorisée) alors que l'os cortical assure essentiellement des fonctions mécaniques et protectrices.



B

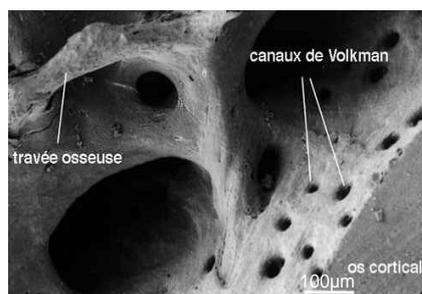


Figure 2. Architecture osseuse au niveau d'un os long à la jonction entre l'os trabéculaire et l'os cortical.

(A) représentation schématique (B) Image de microscopie électronique à balayage. L'os trabéculaire possède une structure alvéolaire caractéristique tandis que l'os cortical possède une structure compacte traversée de canaux de Volkmann. Modifié à partir de <http://dossier.univ-st-etienne.fr/lbto/www/tissu-osseux/index.html>

1.2. Organisation microscopique et cellulaire du tissu osseux

Microscopiquement, on distingue l'os tissé et l'os lamellaire. L'os tissé est fabriqué chez l'embryon puis au cours du développement, il est composé de faisceaux de collagène disposés dans tous les sens. Il est ensuite remplacé chez l'adulte par de l'os lamellaire. Les fibres de collagène sont dans ce cas disposées de façon régulière, parallèlement les unes aux autres. Toutefois, l'os tissé peut être observé exceptionnellement dans des conditions pathologiques, telles que dans le cas de la maladie de Paget ou de guérison de fracture.

1.2.1. La matrice extracellulaire osseuse

Le tissu osseux qu'il soit trabéculaire ou cortical est constitué d'une matrice osseuse minéralisée composée essentiellement de collagène de type 1.

1.2.1.1. Matrice inorganique

La matrice osseuse inorganique est un compartiment minéral composé de petits cristaux d'hydroxyapatite de calcium ayant la forme de petites aiguilles et de formule générale $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Ce minéral osseux contient de nombreuses impuretés telles que du carbonate de calcium, du magnésium, et du phosphate d'ammonium. Le phénomène d'initiation de formation des cristaux est appelée nucléation, et se situe dans le réseau de fibres de collagène (Robey and Boskey, 2003). Ce compartiment représente approximativement 50 à 70% de la masse osseuse adulte, il confère la rigidité mécanique de l'os et lui permet d'agir tel un réservoir pour les ions calcium, phosphate et magnésium.

1.2.1.2. Matrice organique

La matrice organique osseuse représente approximativement 20-40% de la masse osseuse totale de l'adulte. Plus de 90% de ce compartiment est composé de collagène de type 1, et environ 10% contient des protéines non collagéniques.

1.2.1.2.1. Le collagène

Le collagène est une glycoprotéine riche en proline et hydroxyproline. Le collagène de type 1 est d'abord synthétisé sous la forme de procollagène, une triple hélice composée de deux chaînes $\alpha 1$ codées par le gène COL1A1 et d'une chaîne $\alpha 2$, de structure identique, mais codée par le gène COL1A2 (Figure 3). Les chaînes α sont caractérisées par la présence d'une séquence de répétitions du triplet Gly-X-Y (X étant généralement une proline, et Y plus souvent une hydroxyproline) et de modifications post-traductionnelles incluant des hydroxylation et glycosylation de quelques acides aminés. Les molécules de procollagène sont stabilisées par la protéine « chaperon » spécifique du collagène Hsp47 (Tasab et al., 2000), puis sécrétées dans l'espace extracellulaire dans lequel des procollagène peptidases clivent les extrémités N et C-terminales donnant naissance aux molécules de collagènes matures. Les molécules mesurent 294 nm de long pour un diamètre de 5 nm. Ces dernières s'assemblent spontanément pour former les microfibrilles qui se regroupent entre elles pour former les fibres de collagène. La structure est stabilisée par des pontages covalents intra- ou intermoléculaires appelés *crosslinks*. Chaque fibre est constituée de cinq molécules de collagène alignées, séparées entre elles par un espace d'environ 45 nm et décalées d'environ un quart de leur longueur (67 nm) par rapport à leurs voisines latérales. L'alternance des zones de chevauchement et des zones d'intervalle le long des fibres explique la striation régulière que l'on peut observer en microscopie électronique. Les zones d'intervalle sont des sites de formation des cristaux d'hydroxyapatite (Robey and Boskey, 2003). Dans son ensemble, ce réseau hautement organisé de collagène fournit élasticité et flexibilité à l'os, et détermine son organisation structurale.

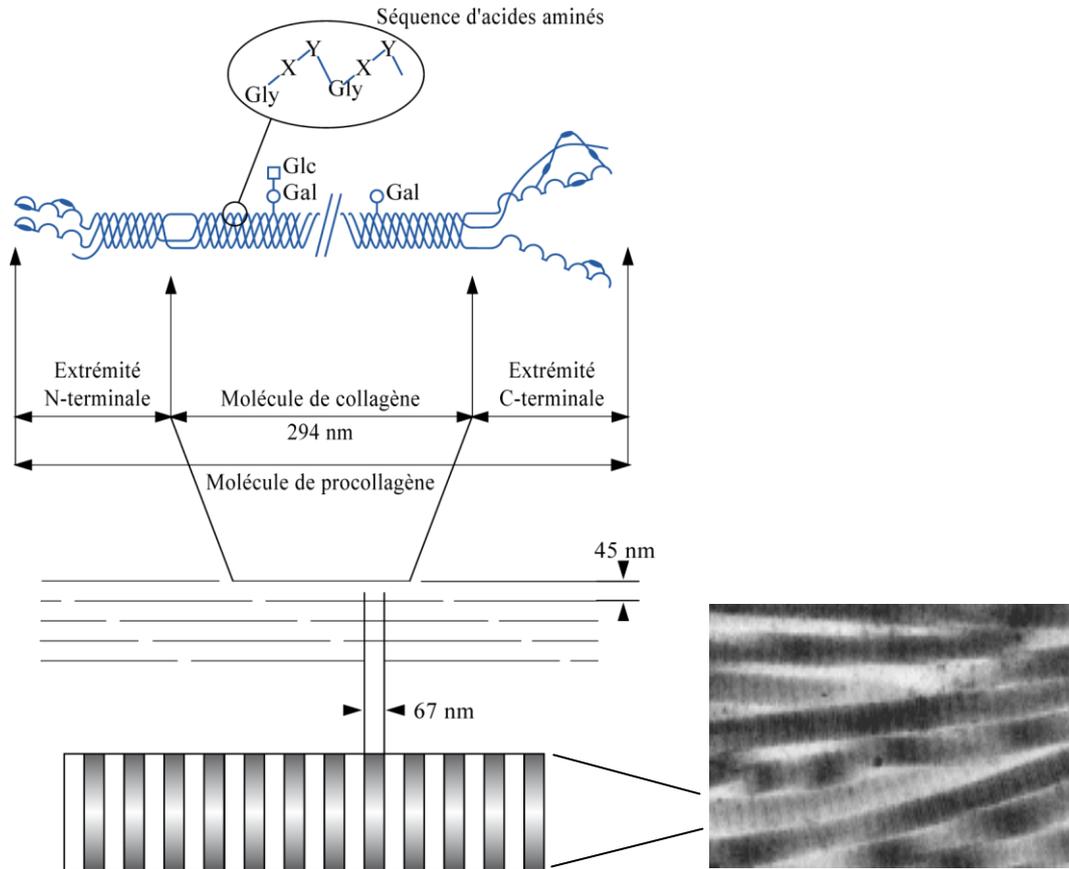


Figure 3. Maturation extracellulaire des molécules de collagène de type 1.

La molécule de procollagène de type 1 est constituée par l'association en triple hélice de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Lorsqu'elle est sécrétée dans l'espace extracellulaire, les extrémités N et C-terminales sont clivées par des enzymes spécifiques. Cinq molécules de collagène s'assemblent alors pour former les microfibrilles de collagène qui se regroupent entre elles pour former la fibre de collagène. Les alignements des intervalles et des chevauchements apparaissent respectivement comme des bandes sombres et claires sur la représentation schématique de la fibre, et en microscopie électronique de fibres de collagène en coupe longitudinale. Modifié à partir de Garnero et al. 2000.

1.2.1.2.2. Les protéines non collagéniques

Environ un quart des protéines non collagéniques sont de nature exogène, la plupart d'entre elles provenant du sérum. Celles-ci sont principalement représentées par l'albumine et la transferrine, protéines à caractère acide qui se lient à la matrice osseuse grâce à leur affinité pour l'hydroxyapatite. Elles agissent sur le taux de minéralisation de la matrice, et la transferrine peut en plus réguler la prolifération des cellules de l'os (Robey and Boskey, 2003). Le reste des protéines non collagéniques (approximativement trois quarts) sont de nature endogène. Ces protéines sont produites par les ostéoblastes et contiennent pour la plupart une ou plusieurs chaînes d'oligosaccharides. Cette fraction de protéines peut être

divisées en 3 sous-groupes : les glycoprotéines (avec ou sans séquence RGD), les protéoglycanes et les gla-protéines (Robey and Boskey, 2003)(Tableau 1).

Tableau 1. Fonctions des principales protéines non collagéniques de l'os.

	FONCTIONS	REFERENCES
GLYCOPROTEINES		
- Ostéonectine	- peut réguler le dépôt d'hydroxyapatites - se lie aux facteurs de croissance, au Ca^{2+} - peut influencer le cycle cellulaire des ostéoblastes - régulateur positif de la formation osseuse	- Gokhale et al - 2001 - Brekken et al - 2001 - Delany et al - 2000
- Phosphatase Alcaline	- transporteur de calcium potentiel - hydrolyse les inhibiteurs de dépôt de minéral tels que les pyrophosphates	- Hentorn - 1996
-Tetranectine	- se lie au plasminogène - peut réguler la minéralisation de la matrice	- Robey et Boskey - 2003
GLYCOPROTEINES A SEQUENCE RGD		
. Siblings (small - integrin - binding ligand)		
- Ostéopontine	- se lie aux cellules de l'os (OB et OC), peut réguler négativement la minéralisation, se lie au Ca^{2+} - pourrait réguler la prolifération des cellules de l'os (OB et OC) - inhibe la production d'oxyde nitrique par les macrophages	- Noda et Denhardt - 2002
- Sialoprotéine osseuse	- se lie aux cellules de l'os (OB et OC) - peut initier la minéralisation	- Hunter et Goldberg - 1993
. Autres		
- Thrombospondines	- se lie aux cellules (OC) - se lie à l'héparine, aux plaquettes, aux collagènes de type I et V, à la thrombine, la décorine, l'ostéonectine, au TGF β , fibrinogène, laminine, plasminogène et aux glycoprotéines riches en histidine	- Lawler - 2000
- Fibronectine	- se lie aux cellules - se lie aux héparine, gellatine, collagène	- Romberger - 1997
- Vitronectine	- se lie aux cellules - se lie au collagène, plasminogène, aux activateurs, inhibiteurs du plasminogène et à l'héparine	- Schwartz et al - 1999
PROTEOGLYCANES		
- Biglycan	- peut se lier au collagène, au TGF β - il est un élément de l'environnement péricellulaire - peut être impliqué dans la différenciation cellulaire	- Beresford et al - 1987 - Bianco et al - 1990
- Décorine	- se lie au collagène et peut réguler le diamètre des fibres - se lie au TGF β et peut réguler son activité - inhibe l'attachement des cellules à la fibronectine - se lie à la thrombospondine	- Vogel et al - 1984 - Schmidt et al - 1987 - Yamagushi et al - 1990 - Merle et al - 1997
GLA - PROTEINES		
- Ostéocalcine	- peut réguler l'activité des OCs et leurs précurseurs - pourrait servir de signal pour l'initiation de la résorption osseuse	- Mundy et Poser - 1983 - Ducy et al - 1996
- Gla - protéines matricielles	- régulateur négatif de la minéralisation	- Luo et al - 1997

Parmi les principales glycoprotéines du tissu osseux il y a tout d'abord l'ostéonectine. Elle est associée à la croissance et la prolifération des ostéoblastes, possède un rôle important dans le remodelage et la minéralisation de l'os, et de ce fait dans le maintien de la masse osseuse. En effet, l'absence d'ostéonectine chez la souris peut provoquer une sévère ostéopénie (Delany et al., 2000). Il existe également des glycoprotéines qui possèdent une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD), un tripeptide essentiel à la reconnaissance par les récepteurs membranaires de type intégrine (Ruoslahti, 1996) qui sont exprimés aussi bien par les ostéoclastes que par les ostéoblastes. Cette famille de protéines d'adhésion inclut l'ostéopontine (OPN), la thrombospondine, la fibronectine et la vitronectine qui sont exprimées dans divers tissus, ainsi que la sialoprotéine osseuse (BSP, Bone Sialoprotein) présente uniquement dans l'os et dont l'apparition corrèle avec l'apparition du minéral. L'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse régulent l'attachement des ostéoclastes aux molécules de la matrice osseuse et ont une très forte affinité pour le Ca^{2+} . Leur suppression diminue la minéralisation de la matrice (Robey and Boskey, 2003). L'ensemble de ces protéines d'adhésion jouerait un rôle dans la maturation des ostéoblastes (Robey and Boskey, 2003).

Ensuite, parmi les protéoglycanes on distingue le biglycan et la décorine. Ces macromolécules sont caractérisées par l'attachement d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont des polymères d'unités disaccharidiques, plus ou moins sulfatés selon les cas. Il a été décrit que ces protéoglycanes interagissent avec les facteurs de croissance TGF- β (Transforming Growth Factor- β), contrôlant ainsi leur disponibilité et leur activité. Ensuite, alors que la décorine est distribuée uniformément à travers la matrice extracellulaire osseuse, le biglycan est observé essentiellement autour des cellules. La décorine serait alors impliquée dans la formation des fibres de collagènes. Par ailleurs, la délétion du gène biglycan dans des animaux transgéniques provoquant une diminution de la densité de l'os trabéculaire, il a été suggéré que le biglycan régule positivement la formation osseuse (Robey and Boskey, 2003).

Enfin, parmi les gla-protéines identifiées, on distingue l'ostéocalcine et les gla-protéines matricielles. Le rôle physiologique de celles-ci n'est pas encore tout à fait défini ; toutefois, il semblerait qu'elles inhibent le dépôt de minéraux. En effet, l'absence de gla-protéines matricielle et d'ostéocalcine chez la souris provoque l'apparition de calcification à des sites extra-squelettiques tels que l'aorte, et une augmentation de la densité du minérale

osseux respectivement (Ducy et al., 1996; Luo et al., 1997). Par ailleurs il a été récemment observé *in vivo* que l'ostéocalcine non carboxylée est impliquée dans la métabolisation du glucose et qu'elle augmente la sécrétion et la sensibilité à l'insuline (Lee et al., 2007). Les travaux de Lee *et coll.* suggèrent ainsi que l'ostéocalcine est une hormone impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique.

Il est également possible de trouver de nombreuses autres protéines, dont des facteurs de croissance et des cytokines (IGFs, TGF- β , Il-1, Il-6) ainsi que des enzymes, leurs inhibiteurs, et autres protéases (MMPs, plasmine) (Robey and Boskey, 2003).

1.2.2. Les cellules osseuses

L'os contient des cellules d'origine hématopoïétique appelées ostéoclastes. Celles-ci sont responsables de la dégradation de l'os. On distingue également des cellules d'origine mésenchymateuse : les ostéoblastes, qui sont responsables de la formation de la matrice osseuse, les ostéocytes et les cellules bordantes.

1.2.2.1. Les ostéoclastes

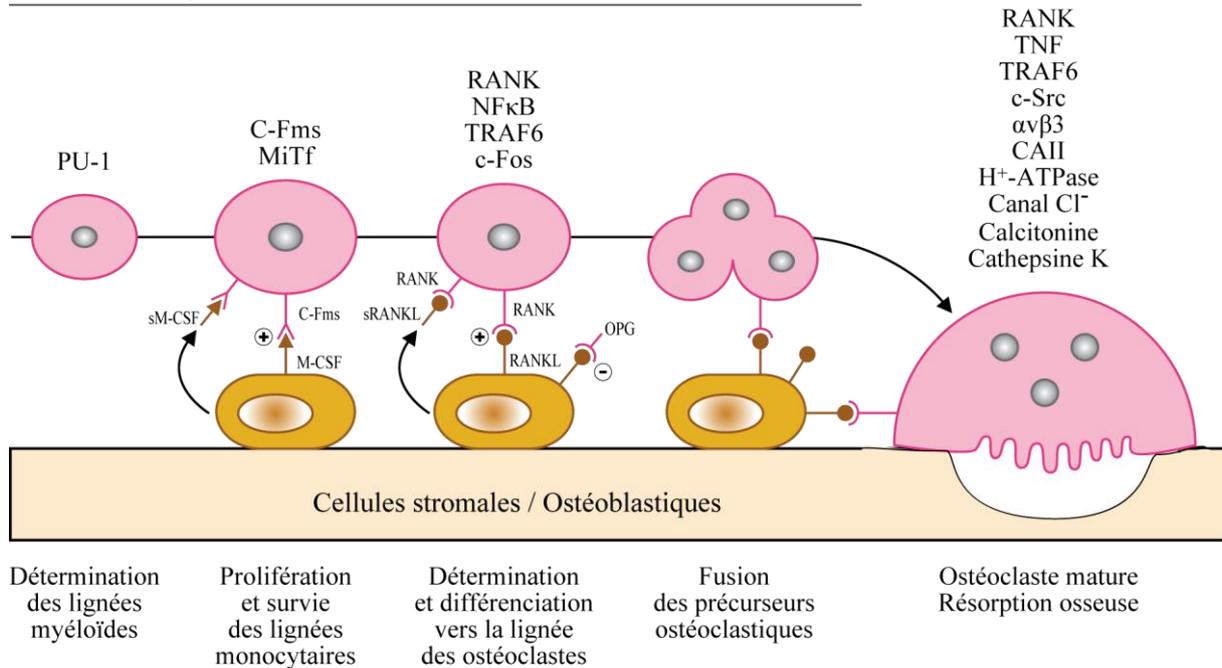
Les ostéoclastes sont les cellules qui ont pour mission de dégrader la matrice minéralisée. Ce sont des cellules multinucléées possédant de 2 à 50 noyaux et ayant une taille volumineuse de 20 à 100 μ m de diamètre. Ils ont une polarité caractéristique : les noyaux se trouvent à l'opposé de la surface osseuse. Ils possèdent un nombre exceptionnel de mitochondries, un important appareil de Golgi autour de chaque noyau et de nombreuses vacuoles chargées d'enzymes lysosomiales. Au contact de l'os les filaments d'actine du cytosquelette forment une structure dense de la forme d'une ceinture (anneau d'actine). Celle-ci sert de point d'attache entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse et délimite le compartiment où s'effectue la résorption osseuse, la lacune de Howship. La membrane de l'ostéoclaste au contact de l'os possède de nombreux replis, et est appelée pour cette raison « bordure plissée ». Les échanges métaboliques y sont nombreux (Baron, 2003).

Les précurseurs des ostéoclastes sont des cellules souches hématopoïétiques de la lignée monocyte-macrophages, avec le CFU-GM (Granulocyte Macrophage Colony Forming Unit) pour premier précurseur identifié (Roodman, 2006). La différenciation est initiée et contrôlée par des facteurs synthétisés par les ostéoblastes/cellules stromales mais aussi par des interactions directes avec ces cellules. Ils produisent trois facteurs essentiels à ce processus de différenciation: le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), le RANKL (RANK Ligand), et l'OPG (Ostéoprotégérine) (Baron, 2001) (Figure 4).

1) Le M-CSF, ligand du récepteur c-Fms, stimule la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques exprimant les facteurs de transcription PU-1 et MiTf. Il induit aussi la production du récepteur RANK (Receptor Activator of NFκB). Il a été observé que dans des conditions exceptionnelles ses fonctions peuvent être substituées par d'autres facteurs comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Niida et al., 1999).

2) RANKL est un membre de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor). En se liant à son récepteur RANK, il conduit à la fusion des précurseurs en un ostéoclaste plurinucléé puis à la synthèse des protéines essentielles à l'activation de la résorption osseuse (*i.e.*, intégrine $\alpha\beta3$, récepteur de la calcitonine, cathepsine K) qui caractérise l'ostéoclaste mature (Kong et al., 1999; Lacey et al., 1998). Cette étape nécessite la présence des effecteurs cellulaires de RANK (TRAF6, NFκB et c-Fos) dans les précurseurs. Il est intéressant de noter que M-CSF et RANKL existent sous deux formes : membranaire et soluble (Baron, 2001).

3) L'OPG, membre de la famille des récepteurs du TNF, est un récepteur leurre soluble qui permet de moduler l'ostéoclastogénèse en bloquant la fonction stimulatrice de RANKL (Bucay et al., 1998; Simonet et al., 1997).

A - Facteurs réglant la différenciation et l'activité des ostéoclastes**B - Etapes de la différenciation des ostéoclastes****Figure 4. Différenciation ostéoclastique.**

(A) Représentation schématique des facteurs réglant la différenciation et l'activité des ostéoclastes et (B) les étapes correspondantes qu'ils contrôlent dans le processus. Modifié à partir de Baron 2001.

En réponse à l'activation par le système RANK/RANKL, l'ostéoclaste va se lier à la matrice osseuse par le biais de la liaison de ses récepteurs de type intégrine ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{2}\beta\text{1}$) à des protéines osseuses (OPN et BSP). Cet ancrage induit la formation d'un anneau d'actine dans lequel sont présentes de nombreuses molécules impliquées dans la transduction du signal telles que c-src, PI3-Kinase ou FAK (Focal Adhesion Kinase). L'anneau d'actine délimite une zone scellée que l'ostéoclaste acidifie par sécrétion de protons *via* des pompes à protons ATPasiques. La diminution du pH dans la lacune entraîne la solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite et donc la déminéralisation de l'os (Baron, 2003). La matrice organique alors exposée est dégradée par des protéines lysosomiales telles que la cathepsine K et la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) dont le fonctionnement optimal est à pH acide. Des métalloprotéases actives à pH optimal neutre sont également sécrétées et participent à la dégradation totale de la matrice (Baron, 2001). Les produits de dégradation sont ensuite évacués par transcytose dans la zone basolatérale. Par exemple, il a été suggéré qu'il y a endocytose de la cathepsine K avec des produits de dégradation de la matrice, puis fusion avec une vésicule contenant la TRAP. L'activation de la TRAP par clivage en TRAP 5b dans les vésicules d'endocytose conduit à la production de dérivés oxygénés finalisant la

dégradation de la matrice (Halleen, 2006). Le récepteur à la calcitonine est un marqueur tardif de la différenciation ostéoclastique. En se fixant sur ce récepteur, la calcitonine provoque le détachement de l'ostéoclaste et donc l'arrêt de la résorption (Bruzzaniti and Baron, 2006) (Figure 5).

L'ostéoclaste fonctionne de manière cyclique, allant de phases migratoires le long de la surface osseuse à des phases de résorption active créant ainsi plusieurs lacunes de résorption. Après un nombre probablement déterminé de cycles, il entre dans une phase d'apoptose et disparaît. Il semblerait que les oestrogènes jouent un rôle essentiel dans l'induction de cette apoptose *via* l'activation du TGF- β . Ceci expliquerait l'augmentation de la résorption osseuse chez la femme ménopausée (Baron, 2001).

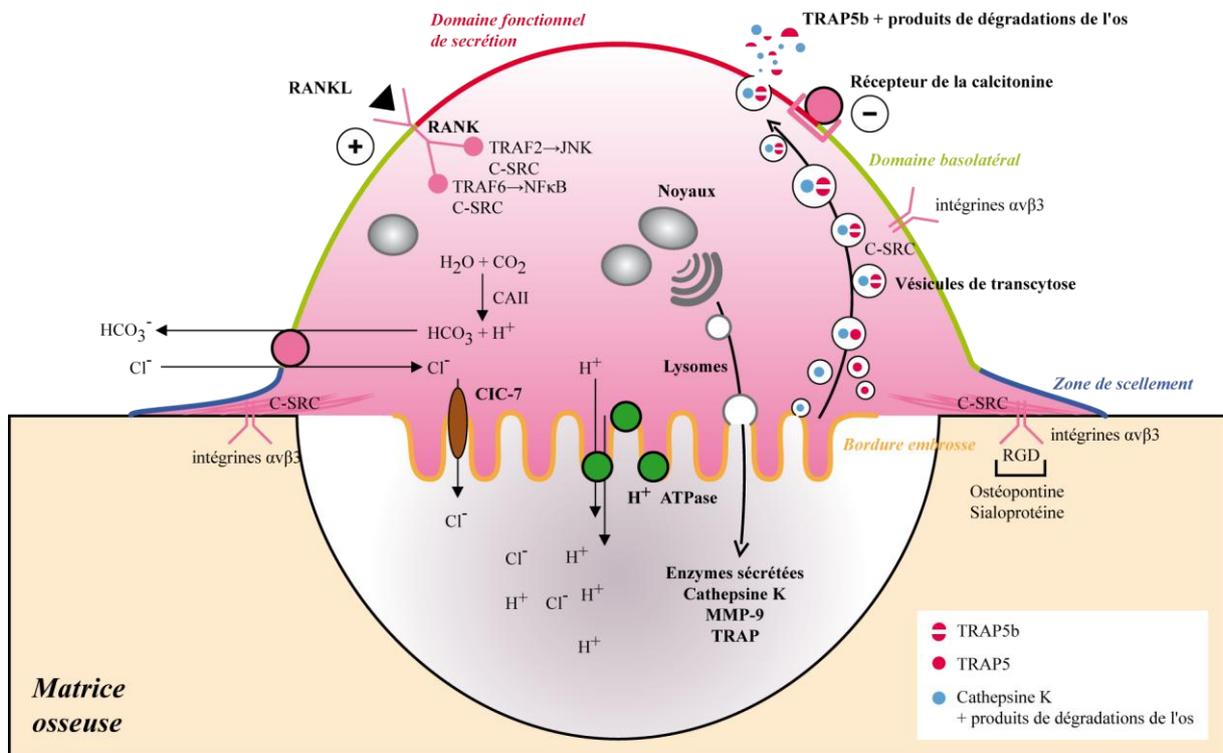


Figure 5. Schéma d'un ostéoclaste résorbant.

Le pôle apical est en regard de la matrice osseuse : il comprend la zone de scellement et délivre dans la lacune de résorption enzymes et métalloprotéases dégradant la matrice. Cette bordure en brosse est aussi le siège d'une sécrétion spécifique de protons qui acidifient le compartiment où aura lieu la résorption osseuse. Le pôle opposé, ou pôle basolatéral, est en contact avec l'environnement de la moelle osseuse et du périoste et exprime les récepteurs de facteurs de croissance et les intégrines assurant le contact avec les cellules stromales médullaires. Les produits de dégradation de la matrice sont évacués par transcytose. Modifié à partir de Baron 2001 et Halleen 2006.

1.2.2.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse de la matrice osseuse qui mesurent de 20 à 30 μm de diamètre. Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdales polarisées, avec un pôle apical et un pôle basolatéral accolés à la surface de l'os et à la moelle osseuse respectivement (Ilvesaro et al., 1999). Ces cellules sont toujours trouvées alignées à la surface d'une matrice organique non minéralisée en cours de synthèse (ostéoïde). Elles communiquent entre elles par des jonctions de type « gap ». Les ostéoblastes ont un cytoplasme basophile riche en réticulum endoplasmique et en mitochondries, un appareil de Golgi très développé, et un nombre important de vésicules de sécrétion, témoignant d'une forte activité de synthèse et sécrétion protéique.

Les précurseurs des ostéoblastes proviennent des cellules souches mésenchymateuses du stroma médullaire capables de se différencier en cellules cartilagineuses, osseuses, musculaires ou adipocytaires (Figure 6). La différenciation vers la voie ostéoblastique implique l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques. Il a été ainsi décrit que les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), membres de la superfamille du TGF- β , induisent l'expression de Runx2, aussi nommé Cbfa1 ou Osf2. Ce facteur est le plus précoce et le plus spécifique de l'ostéoblastogénèse actuellement connu. Il est nécessaire à la première étape de différenciation des cellules mésenchymateuses en préostéoblastes et inhibe leur différenciation en adipocytes et chondrocytes (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Cependant, Runx2 est nécessaire mais pas suffisant pour induire l'ostéoblastogénèse, d'autres facteurs régulateurs sont nécessaires (Komori, 2006). Il a été ainsi démontré que l'expression du facteur de transcription Osterix est essentielle à la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes et que celui-ci empêche la différenciation des préostéoblastes en chondrocytes (Nakashima et al., 2002). Le niveau d'expression de Runx2 est normal dans les préostéoblastes de souris *osterix* $-/-$, alors qu'*osterix* n'est pas exprimé dans ceux des souris *Runx2* $-/-$. Osterix est donc un gène exprimé en aval du gène Runx2 (Nakashima et al., 2002).

Récemment, l'importance de la voie canonique Wnt dans la formation de l'os a été mise en évidence. La fixation de Wnt à la surface de son récepteur Frz (Frizzled) entraîne la stabilisation de la β -caténine *via* l'inhibition de la kinase GSK-3 β (Glycogen Synthase

Kinase-3 β). La β -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme, est transloquée dans le noyau, et agit en tant que co-activateur transcriptionnel du facteur TCF (T-Cell Factor aussi connu sous le nom LEF, Lymphoid Enhancer Factor). Des études récentes montrent que l'inactivation génétique de la β -caténine dans les progéniteurs mésenchymateux de souris transgéniques bloque la différenciation ostéoblastique. La β -caténine est donc elle aussi essentielle à la différenciation ostéoblastique (Hill et al., 2005; Hu et al., 2005). Dans les cellules n'exprimant pas la β -caténine, Runx2 est exprimé alors qu'osterix ne l'est pas. La β -caténine est donc requise dans les premiers stades de différenciation ; elle s'associe à TCF1 et favorise l'expression de Runx2 (Gaur et al., 2005; Hill et al., 2005; Hu et al., 2005). Runx2 contrôle donc le passage des cellules progénitrices vers le stade préostéoblaste en inhibant leur différenciation en chondrocytes et adipocytes, et ensuite osterix et la β -caténine contrôlent le passage au stade ostéoblaste en éliminant tout potentiel de différenciation des préostéoblastes en chondrocytes (Figure 6).

Les ostéoblastes sécrètent d'abord la matrice organique ou ostéoïde. Ils contrôlent ensuite la minéralisation de cette matrice par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite en régulant les concentrations locales de calcium et phosphate. On note ainsi que les différentes étapes de la maturation ostéoblastique sont marquées par l'expression des protéines associées d'abord à la synthèse de la matrice (phosphatase alcaline, collagène de type I) puis par l'expression de marqueurs tardifs des ostéoblastes associés à la minéralisation osseuse (OC, OPN, BSP) (Lian, 2003) (figure 6). La fonction de l'ensemble de ces protéines a été décrite précédemment.

Certains ostéoblastes peuvent se laisser emprisonner dans la matrice qu'ils synthétisent, ils se différencient alors en ostéocytes. A la fin de l'élaboration de l'os, les ostéoblastes qui ne se sont pas différenciés en ostéocytes peuvent être éliminés par apoptose ou se différencier pour former une couche de cellules bordantes.

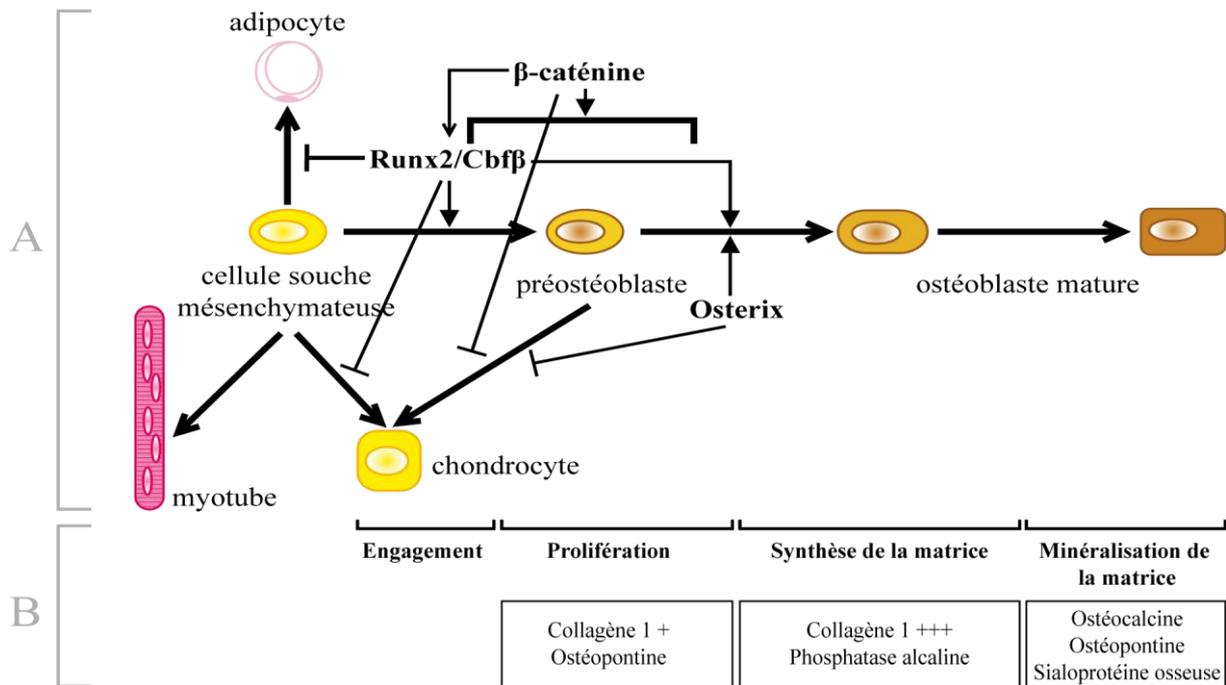


Figure 6. Différenciation ostéoblastique.

(A) Représentation schématique des facteurs de transcription régulant la différenciation et l'activité des ostéoblastes et (B) les marqueurs des différentes étapes de maturation correspondantes qu'ils contrôlent. Le facteur de transcription Runx2, en formant des hétérodimères avec le co-activateur Cbfb, dirige les cellules mésenchymateuses vers les préostéoblastes n'exprimant pas de gènes spécifiques de l'ostéoblaste excepté de faibles quantités de collagène 1 et de l'ostéopontine. Il inhibe la différenciation en adipocytes et chondrocytes. Runx2, la β -caténine et Osterix dirigent les préostéoblastes vers les ostéoblastes exprimant de grandes quantités de gènes marqueurs de l'ostéoblaste. Modifié à partir de Komori 2006 et Lian 2003.

1.2.2.3. Les ostéocytes

Certains ostéoblastes peuvent se laisser emmurer dans la matrice qu'ils synthétisent et devenir des ostéocytes (Figure 7). Ces cellules sont les plus abondantes de l'os. Leur morphologie varie en fonction de leur âge et de leur activité fonctionnelle. Les plus jeunes ostéocytes sont caractérisés par une composition similaire à celle des ostéoblastes, excepté un plus petit nombre d'organelles impliquées dans la synthèse protéique. Les ostéocytes plus anciens sont plus petits et de forme allongée, de 15 à 30 μm de long sur 10 à 15 μm de large. Ils accumulent le glycogène cytoplasmique, mais maintiennent leur capacité à produire des composants de la matrice osseuse (Baron, 2003). Les ostéocytes sont logés dans des lacunes, et sont en contact (*via* des jonctions gap) avec les ostéocytes adjacents, les ostéoblastes et les cellules bordantes par l'intermédiaire de très longs et très fins prolongements cellulaires

abrités dans des canalicules. Ces cavités forment un réseau garantissant l'alimentation et la communication des ostéocytes emmurés.

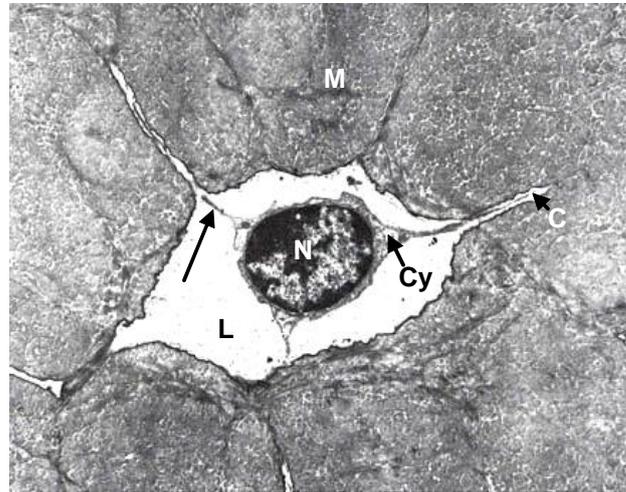


Figure 7. Ostéocyte d'un os cortical vu en microscopie électronique à transmission.

N, Noyau ; Cy, Cytoplasme ; M, Matrice osseuse minéralisée ; L, Lacune ; C, Canalicule, flèche : extension du cytoplasme de l'ostéocyte.

D'après http://visualhistology.com/Visual_Histology_Atlas/VisualHistology_Atlas_2-0-27_1.jpg

Les ostéocytes sont la dernière étape de différenciation des ostéoblastes, mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore inconnus. Les ostéocytes peuvent à la fois synthétiser et dégrader l'os autour d'eux, ce qui aurait pour but d'assurer le maintien de la qualité de l'os les entourant (Lian, 2003). Ces cellules ont la particularité d'être mécanosensibles. Elles perçoivent les contraintes mécaniques exercées sur l'os en détectant les écoulements du fluide extracellulaire présent dans le réseau de canalicules (Lian, 2003). Elles assurent ainsi la transduction des signaux de stress subi par l'os aux cellules situées en surface (les ostéoblastes et les ostéoclastes) et permettent ainsi la réparation de l'os endommagé. Il a en effet été observé que l'application de pressions sur des os de rat induit l'entrée en apoptose des ostéocytes, ce qui est suivi par l'activation du remodelage osseux à proximité (Noble et al., 2003). Il a été suggéré que les ostéocytes peuvent stimuler la différenciation ostéoblastique localement en exprimant le facteur *Osf1* et/ou HB-GAM (Osteoblast Stimulating Factor 1 et Heparin Binding Growth Associated Molecule). Ce facteur s'accumulerait à la surface de l'os et sa liaison au récepteur N-syndecan des précurseurs ostéoblastiques permettrait le recrutement d'ostéoblastes pour fabriquer une nouvelle matrice osseuse (Figure 8) (Imai et al., 1998). Des travaux plus récents ont permis de mettre en évidence que les ostéocytes nouvellement enfouis sécrètent la sclérostine une fois que la

matrice est minéralisée (Poole et al., 2005). Cette molécule se fixe aux BMPs, déprivant ainsi les ostéoblastes de facteurs de croissance. Il en résulte alors une apoptose des ostéoblastes. La sclérostine serait aussi à l'origine de l'induction et du maintien du phénotype cellule bordante à la surface de l'os (Figure 8) (Poole et al., 2005; Sutherland et al., 2004). Elles produisent également des facteurs solubles encore non identifiés capables d'inhiber les ostéoclastes (Gu et al., 2005). Le maintien de la microarchitecture osseuse à la suite d'un stress est donc assuré par l'apoptose des ostéocytes, qui permet la levée de signaux inhibiteurs sur les cellules de l'os et donc l'activation du remodelage osseux.

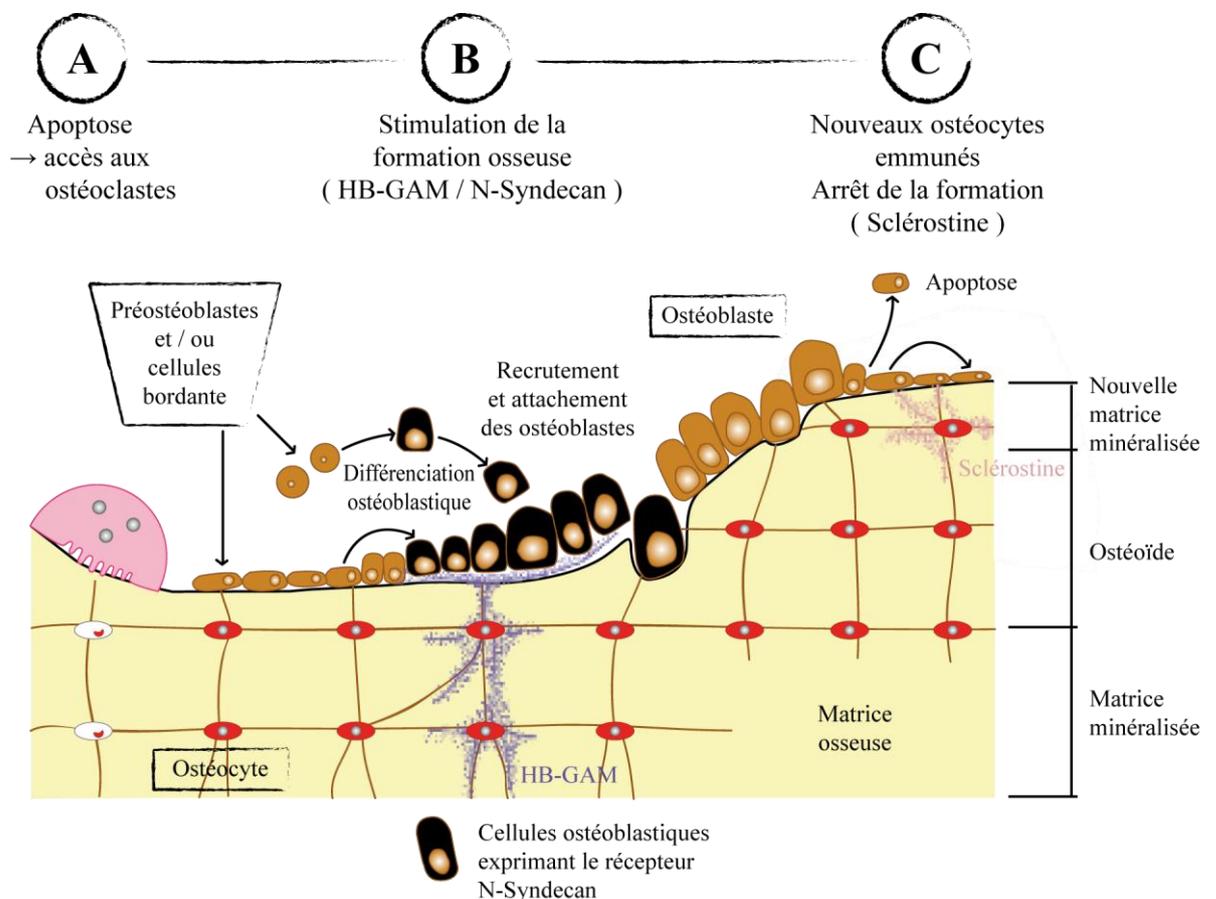


Figure 8. Modèle proposé pour le rôle des ostéocytes dans le maintien de l'architecture osseuse.

(A) Après un stress mécanique les ostéocytes entrent en apoptose, permettant l'accès de la matrice aux ostéoclastes. (B) En sécrétant HB-GAM, les ostéocytes recruteraient des ostéoblastes dans la lacune, stimulant ainsi une nouvelle formation d'os. (C) Ensuite, les nouveaux ostéocytes, une fois emmurés dans une matrice minéralisée, sécrèteraient de la sclérostine, responsable de l'arrêt du processus. Modifié à partir de Imai et al., 1998.

Les ostéocytes peuvent rester pendant de longues périodes, jusqu'à plusieurs années, dans les lacunes. Toutefois, l'observation de lacunes vides dans l'os âgé suggère que les ostéocytes peuvent aussi être éliminés par apoptose (Lian, 2003) . Dans d'autres cas, les ostéocytes peuvent être lysés au cours de la résorption osseuse par les ostéoclastes (Baron, 2003).

1.2.2.4. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes ont une forme aplatie et allongée. Elles sont à l'état quiescent, alignées à la surface de l'os nouvellement formé. Elles communiquent avec les ostéocytes et entre elles par des jonctions de type « gap ». Elles peuvent inhiber la résorption osseuse en empêchant l'accès des ostéoclastes à la surface de l'os et en réponse aux signaux envoyés par les ostéocytes, se détacher pour simultanément activer le remodelage osseux (Martin, 2000). Après la résorption de l'os, les cellules bordantes et/ou les préostéoblastes migreraient dans la lacune de Howship, nettoieraient la lacune en absorbant et résorbant les restes de collagène, puis formeraient les précurseurs d'ostéoblastes matures formant une nouvelle matrice osseuse (Everts et al., 2002; Mulari et al., 2004; Parikka et al., 2005).

1.3. Le remodelage osseux

1.3.1. Processus du remodelage osseux

Après la période de croissance, l'os ne reste pas figé. Il se renouvelle en permanence grâce au processus de remodelage osseux au cours duquel l'os ancien est détruit par les ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau par les ostéoblastes. A l'âge adulte, l'équilibre entre ces deux processus permet de conserver intactes les propriétés mécaniques de l'os et d'assurer la réparation des fractures et le maintien de l'homéostasie calcique. Dix pour cent de l'os du squelette adulte est ainsi renouvelé par an. Le remodelage s'effectue dans une structure définie appelée unité multicellulaire de base (BMU) dans laquelle les activités des ostéoclastes et des ostéoblastes sont très précisément orchestrées dans l'espace et dans le temps. Chez l'adulte, à tout moment, environ un million de BMUs sont actives. On considère

qu'un cycle de remodelage dure environ 4 mois chez l'adulte, la phase de résorption durant environ 2 semaines et celle de formation 2 à 3 mois (figure 9).

Le remodelage est tout d'abord activé par la mort cellulaire des ostéocytes suite à un stimulus mécanique. Les cellules bordantes deviennent alors rondes et permettent l'accès de la matrice osseuse aux précurseurs ostéoclastiques recrutés. Ceux-ci fusionnent entre eux, se différencient en ostéoclastes plurinucléés qui creusent des lacunes de résorption puis entrent en apoptose. Ils sont alors remplacés dans la lacune par des cellules mononucléées (cellules bordantes et/ou préostéoblastes) qui lissent le fond de la lacune et forment une ligne cimentante délimitant l'os ancien et l'os nouveau. Il s'agit de l'étape dite d'inversion. Les ostéoblastes assurent ensuite la synthèse de la nouvelle matrice collagénique non minéralisée (ostéoïde) sur laquelle le calcium et le phosphate se fixeront. Les ostéoblastes se différencient en cellules bordantes, en ostéocytes, ou meurent par apoptose (Baron, 2003).

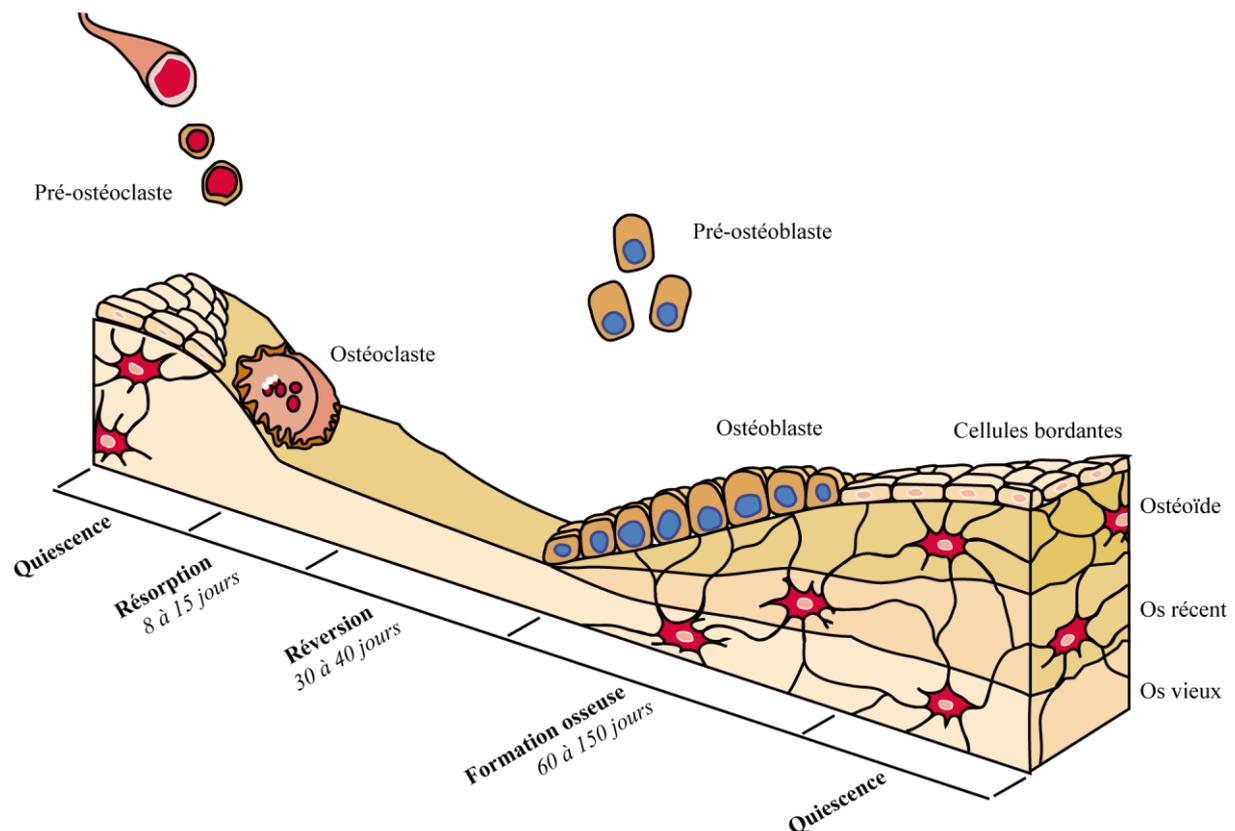


Figure 9. Représentation schématique du processus de remodelage osseux.

La dégradation du tissu osseux par les ostéoclastes est suivie par la formation d'un nouveau tissu minéralisé par les ostéoblastes.

D'après http://www.servier.fr/smart/SlideKits/Structure_de_l_os.asp

1.3.2. Régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux est sous contrôle de facteurs locaux et systémiques ; les facteurs locaux sont stockés dans la matrice osseuse et les facteurs systémiques apportés par le sang. De nombreux facteurs ont déjà été identifiés, dont certains sont présentés dans le Tableau 2. Toutefois le propos de cette thèse n'étant pas de discuter des facteurs du remodelage osseux, seuls quelques uns, liés aux métastases osseuses, seront développés ci-après.

1.3.2.1. L'hormone parathyroïdienne (Parathyroïd hormone, PTH)

La PTH est une hormone systémique produite par les glandes parathyroïdes. Elle peut stimuler la formation ou la résorption osseuse *in vitro* et *in vivo* selon la dose et la voie d'administration utilisées. Cette dualité d'action pourrait s'expliquer par le fait que la liaison de la PTH à son récepteur régule l'expression de Runx2 dans les ostéoblastes (Krishnan et al., 2003). En effet ce facteur de transcription peut non seulement stimuler l'ostéoblastogénèse comme je l'ai mentionné précédemment, mais il peut aussi induire une augmentation d'expression de RANKL et une diminution de la synthèse d'OPG par les cellules de la lignée ostéoblastique (Huang et al., 2004). En influant ainsi sur la balance RANKL/OPG, la PTH peut stimuler indirectement la formation des ostéoclastes. Il n'est pas à exclure que la PTH puisse avoir également une action directe sur les ostéoclastes puisqu'il a été montré que ces cellules expriment aussi un récepteur de la PTH, le PTHR1 (Gay et al., 2003).

1.3.2.2. Le TGF- β et les IGFs osseux

La résorption osseuse par les ostéoclastes conduit à la libération de facteurs capables d'influencer le remodelage osseux en faveur de la phase de formation. Les plus abondants sont les facteurs de croissance TGF- β et les IGFs (Insulin-like Growth Factors). Ils sont sécrétés par les cellules stromales/ostéoblastes et séquestrés dans la matrice au moment de la formation de l'os.

Le TGF- β est stocké dans la matrice sous une forme latente qui peut être activée au moment de la résorption grâce au pH acide et aux protéases produites par l'ostéoclaste (De Vernejoul et al 1996). Des études récentes ont montré que la forme active du TGF- β stimule

la formation des ostéoclastes (Kaneda et al., 2000) et que l'augmentation de la résorption osseuse qui s'en suit peut induire indirectement l'activation et la différenciation des ostéoblastes (Erlebacher et al., 1998). Or dans certains cas le TGF- β peut au contraire inhiber la prolifération et la différenciation des ostéoclastes (Chenu et al., 1988). Il a été suggéré que pendant la phase de résorption du remodelage la faible concentration de TGF- β stimulerait l'activation des ostéoclastes. Ensuite, son accumulation dans la lacune conduirait à de fortes concentrations qui serviraient à leur tour d'inhibiteur des ostéoclastes (Mundy, 2003).

Le système des facteurs de croissance IGFs comprend deux ligands IGF-I et -II, deux récepteurs et six protéines de liaison IGFbps (IGF Binding Proteins). L'activité biologique des IGF-I et -II peut être stimulée ou inhibée par la liaison avec les protéines de liaison IGFbps et, dans l'ensemble, conduire à l'augmentation de la formation osseuse (Guise and Mundy, 1998).

Tableau 2. Effets des facteurs systémiques et locaux sur le remodelage osseux.
D'après Marie P. et De Vernejoul M.-C. (1996)

	Résorption osseuse		Formation osseuse	
	Recrutement des ostéoclastes	Activité ostéoclastique	Recrutement des ostéoblastes	Activité ostéoblastique
Hormones				
PTH	↑	↑	↑	↓
Vitamine D	↑	↑	-	↓
Calcitonine	↓	↓	-	-
Glucocorticoïdes	-	-	↓	↓
Hormones thyroïdiennes	↑	↑	-	-
Insuline	-	-	↑	↑
Hormone de croissance	-	-	↑	↑
Estrogènes	-	↓	↑	↑
Facteurs de croissance				
EGF	↑	↑	↑	↓
PDGF	↑	↑	↑	↓
FGF	-	-	↑	-
TGF- β	↓	-	↑	↑
IGF-1	-	-	↑	↑
Cytokines				
Il-1	↑	↑	↑	↓
TNF α	↑	↑	↑	↓
IFN γ	↓	↓	↓	↓
Il-6	↑	-	-	-

2. PHYSIOPATHOLOGIE DES METASTASES OSSEUSES DES TUMEURS SOLIDES

La métastase (du grec *metastasis* : déplacement) correspond à un foyer tumoral secondaire qui se développe à distance de la tumeur primitive et ceci après dissémination dans l'organisme. Le développement de ces métastases représente l'aspect le plus dramatique de la maladie cancéreuse. En effet, malgré des améliorations considérables au niveau du diagnostic, des techniques chirurgicales et des traitements adjuvants locaux et systémiques, la majorité des décès consécutifs à un cancer est due aux métastases car celles-ci sont le plus souvent résistantes aux thérapies conventionnelles. Leur processus de formation est composé d'une longue série d'étapes séquentielles et inter-dépendantes que l'on nomme cascade métastatique.

Certains organes sont plus souvent la cible de métastases que d'autres. Par exemple, Walther a réalisé entre 1927 et 1941 une étude sur 3500 patients décédés d'un cancer métastatique. L'autopsie a révélé que les poumons, le foie et le squelette étaient les sites métastatiques les plus fréquents (55%, 43% et 23% des cas respectivement) (Walther, 1948). De plus, il apparaît que la nature des sites métastatiques diffère selon le type de cancer. Walther a ainsi pu observer dans la même étude que 65% des patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate avaient développé des métastases osseuses. Une autre étude autopsique réalisée par Coleman et Ruben en 1987 a montré que 83% des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique avaient des métastases osseuses (Coleman and Rubens, 1987). Les cancers développant ainsi préférentiellement des métastases osseuses sont dits ostéophiles ou ostéotropiques. C'est le cas non seulement des cancers du sein et de la prostate, mais également des cancers du rein, de la thyroïde et des bronches.

Les métastases osseuses sont très souvent ostéolytiques (augmentation de la résorption osseuse), parfois ostéocondensantes (excès de formation osseuse) ou mixtes. Elles sont associées à une morbidité considérable (fractures pathologiques, compressions médullaires, hypercalcémie et douleurs osseuses) et par conséquent elles détériorent sévèrement la qualité de vie des patients et peuvent même parfois engager leur pronostic vital. Pour toutes ces raisons les métastases osseuses sont un problème de Santé Publique.

2.1. Mécanismes associés à l'ostéophilie des cancers

La maladie cancéreuse et la dissémination des métastases font intervenir des mécanismes complexes qui diffèrent selon le type de cancer et les sites métastatiques. Les hypothèses avancées par Paget et Ewing à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle ont mis en évidence l'existence de mécanismes associés à la vascularisation des tissus et d'autres spécifiques du « *seed and soil* » (Fidler, 2003). Les métastases se forment lorsque la graine (les cellules cancéreuses) est compatible avec le sol (l'organe). Je n'aborderai ici que les mécanismes cellulaires et moléculaires associés à la formation des métastases osseuses.

2.1.1. L'ostéotropisme

2.1.1.1. Mécanismes impliqués dans la migration des cellules métastatiques vers l'os

2.1.1.1.1. Rôle des chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines qui stimulent à distance la migration des cellules vers un site donné. Ces protéines solubles possèdent en général 4 cystéines conservées et sont classées en 4 sous-groupes selon le nombre d'acides aminés séparant les deux premières cystéines en position N-terminale. Les chimiokines CXC possèdent un acide aminé entre les deux premières cystéines, les CX3C, trois acides aminés. Ensuite les chimiokines CC possèdent deux premières cystéines adjacentes, et les C sont les seules de cette famille à ne posséder que deux cystéines (Laing and Secombes, 2004). Cette famille de cytokines active la migration cellulaire en se liant à des récepteurs de surface cellulaire couplés à des protéines G dont 18 ont été identifiés jusqu'à aujourd'hui (Horuk, 2001). Les terminologies L et R permettent de désigner les ligands et récepteurs respectivement.

CXCL12 (ou SDF-1 α , Stromal-Derived Factor-1 α) est une chimiokine produite en quantité importante dans différents organes comme les poumons, le foie, et la moelle osseuse (Muller et al., 2001). Cette chimiokine stimule la migration des cellules qui expriment le récepteur de CXCL12, appelé CXCR4 (Clines and Guise, 2005). Il a ainsi été observé que la neutralisation de l'axe CXCR4/CXCL12 en ciblant CXCR4 par différents moyens tels que des anticorps (Muller et al., 2001), des siRNA et des peptides antagonistes (Liang et al., 2004;

Liang et al., 2005), permet de limiter la formation de métastases pulmonaires par les cellules de carcinome mammaire. Une autre étude a montré qu'un anticorps dirigé contre CXCR4 permet également de diminuer les métastases osseuses d'origine prostatique chez les animaux (Sun et al., 2005).

D'autres chimiokines pourraient intervenir dans le tropisme osseux des cellules tumorales. Par exemple, les cellules de la lignée de carcinome pulmonaire SBC-5 forment des métastases osseuses chez les animaux. Or la chimiokine CCL22 (qui est produite par les ostéoclastes) stimule *in vitro* la migration des cellules SBC-5 car ces cellules expriment CCR4, le récepteur de CCL-22 (Nakamura et al., 2006). La fractalkine (ou CX3CL1) est une chimiokine qui est produite par les ostéoblastes ; elle stimule la migration *in vitro* des cellules de lignées humaines de carcinome prostatique LNCaP, PC3-ML et MDA-PCa-2b car celles-ci expriment CXCR1, le récepteur de cette chimiokine (Shulby et al., 2004)

2.1.1.1.2. Rôle de RANKL

RANKL pourrait être aussi impliquée dans le tropisme osseux. RANKL est une cytokine exprimée à la surface membranaire des ostéoblastes qui, après clivage par la métalloprotéase MMP-7 sécrétée par les ostéoclastes, peut être produite sous une forme soluble (Lynch et al., 2005).

Il a été montré récemment que RANK n'est pas seulement exprimé par les ostéoclastes, mais aussi par les cellules tumorales (Dougall and Chaisson, 2006; Jones et al., 2006) . Cette protéine est active puisqu'elle induit *in vitro* l'activation des voies MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et la translocation nucléaire de NFκB après un traitement avec RANKL des cellules MB-231 et PC-3 (Tometsko et al., 2004). Or, Jones *et coll.* (2006) ont montré *in vitro* que RANKL stimule la migration de ces lignées cellulaires. De plus, l'OPG (en bloquant RANKL) inhibe la formation des métastases osseuses induites par les cellules B16F10 alors que l'OPG n'a aucun effet sur la croissance tumorale dans d'autres organes (ovaires, surrénales) (Jones et al., 2006). L'intérêt de ce modèle réside dans le fait que les cellules B16F10 forment des métastases osseuses chez les animaux, mais contrairement aux cellules de carcinome mammaire, n'induisent pas d'ostéolyse. Il permet donc bien d'analyser le rôle de RANK/RANKL dans la dissémination des cellules cancéreuses au niveau de l'os, indépendamment de leur rôle bien démontré en tant que stimulateur de la différenciation ostéoclastique (Jones et al., 2006). Toutefois, les conclusions tirées de ces

travaux doivent être pondérées. En effet, il a été montré dans une autre étude que les cellules B16F10 peuvent induire une ostéolyse chez les animaux (Bakewell et al., 2003) et, de ce fait, l'OPG pourrait fort bien inhiber la résorption osseuse et la libération à partir de la matrice osseuse de facteurs chimiotactiques autres que RANKL.

RANKL pourrait intervenir non seulement dans la circulation en tant que facteur chimioattractant, des taux circulants de RANKL ont d'ailleurs pu être détectés dans le sérum de patients atteints de cancer métastatique (Terpos et al., 2004), mais aussi localement au niveau de la tumeur primitive. En effet, les tumeurs primaires provoquent souvent des réactions inflammatoires et sont ainsi infiltrées par des lymphocytes T et des macrophages qui peuvent produire localement du RANKL. Luo *et coll.* (2007) ont montré que RANKL peut alors induire l'activation d'IKK α qui réprime la transcription du gène maspine (inhibiteur de sérines protéases de la famille des serpins) dans les adénocarcinomes de la prostate. Or, l'inhibition de l'expression de la maspine par siRNA dans des cellules de carcinome prostatique murines favorise la formation des métastases chez les animaux (Luo et al., 2007). On remarque d'ailleurs qu'aux stades métastatiques, les carcinomes prostatiques murins et humains expriment de grandes quantités d'IKK α et produisent peu ou pas de maspine. Le RANKL produit localement par les cellules inflammatoires augmenterait donc le potentiel métastatique des cellules tumorales, et il se pourrait que le RANKL circulant prenne ensuite le relais.

2.1.1.2. Attachement des cellules à l'endothélium (extravasation)

Les cellules tumorales métastatiques sortent de la circulation sanguine (extravasation) au niveau des vaisseaux de la moelle osseuse. Elles y sont freinées par des molécules de la famille des sélectines et s'y arrêtent suite au contact avec des chimiokines qui induisent l'activation des intégrines. L'interaction de ces dernières avec des molécules de la super famille des immunoglobulines (CAMs, Cell Adhesion Molecules) permet une forte adhésion des cellules tumorales à l'endothélium et leur passage jusqu'à la matrice osseuse.

Il a été récemment observé *in vivo* que les cellules tumorales s'attachent et sont extravasées à des endroits spécifiques de l'endothélium de la moelle osseuse. L'imagerie confocale dynamique sur crâne de souris a en effet montré que les cellules de différentes lignées tumorales qui expriment CXCR4 (récepteur de CXCL12) s'attachent et s'extravasent uniquement au niveau de microdomaines qui expriment à la fois la E-sélectine (Endothelial-

sélectine) et CXCL12 (Figure 10). Ainsi, en cas d'injection des cellules dans des souris KO pour la E-selectine ou en cas d'inhibition de l'axe CXCR4/CXCL12, une nette diminution de l'extravasation est observée. Ces cellules emprunteraient les mêmes accès que les cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes T pour s'extravaser (Sipkins et al., 2005). Par ailleurs, il a été observé que les cellules des métastases osseuses associées au cancer de la prostate expriment un ligand de la E-selectine, le PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotéine Ligand-1) (Dimitroff et al., 2005). *In vitro*, l'expression de ce ligand permet aux cellules de carcinome prostatique MDA-PCa-2b d'interagir avec les cellules endothéliales (Dimitroff et al., 2005; Dimitroff et al., 2004).

D'autres molécules d'adhésion [ie, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)] sont exprimées *in vivo* dans le système vasculaire de la moelle osseuse, et notamment au niveau des microdomaines décrits par Sipkins *et coll.* (2005). De plus, il a été observé dans une autre étude que les cellules endothéliales expriment la fractalkine qui peut favoriser, *in vitro*, l'adhésion des cellules tumorales exprimant CX3CR1 (Shulby et al., 2004). Ces résultats suggèrent que des mécanismes supplémentaires pourraient intervenir dans l'extravasation des cellules.

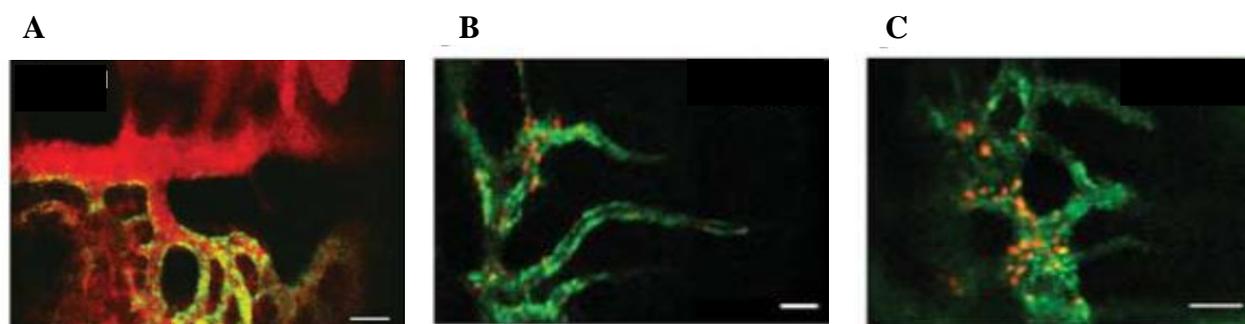


Figure 10. Attachement des cellules tumorales aux micro-domaines vasculaires SDF-1+ E-sélectine+.

La détection *in vivo* par immunofluorescence montre que (A) la E-sélectine (vert) est exprimée à des endroits spécifiques du réseau vasculaire de la moelle osseuse (rouge) et que (B et C), les cellules tumorales (rouge) s'arrêtent aux microdomaines exprimant (B) la E-sélectine (vert) et (C) SDF-1 (vert). Les échelles correspondent à 100μm.

2.1.1.3. Invasion / Migration

Une fois qu'elles sont extravasées, les cellules tumorales se nichent dans la moelle. L'ancrage sur les cellules stromales *via* les intégrines et l'activation de protéases favorisent ce processus. Les intégrines sont composées de deux sous-unités transmembranaires : les sous-unités α et β . Chez les mammifères, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β peuvent ainsi

s'associer en différentes combinaisons pour former 24 formes d'intégrines (Guo and Giancotti, 2004). Selon le type de cancer, différentes intégrines peuvent intervenir.

2.1.1.3.1. Les intégrines

Par exemple, il a été observé *in vitro* que les cellules tumorales de myélome qui expriment $\alpha 4\beta 1$ interagissent avec les cellules stromales de la moelle osseuse *via* VCAM-1. De cette interaction résulte une stimulation de l'activité ostéoclastique (Michigami et al., 2000). Ainsi, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la sous-unité $\alpha 4$ peut réduire la colonisation des cellules à l'os et l'ostéolyse associée chez les animaux (Mori et al., 2004). De plus, il a été observé que des cellules de cancer ovarien de hamster (CHO), qui forment normalement des métastases pulmonaires chez les animaux, font des métastases aussi dans le tissu osseux dès lors que les cellules CHO sont transfectées pour exprimer l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Matsuura et al., 1996). Par ailleurs, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ interviendrait dans la formation des métastases osseuses associées au cancer de la prostate. En effet, la surexpression d' $\alpha 2\beta 1$ dans un sous clone de la lignée LNCaP, en interagissant avec le collagène de type 1, peut favoriser le développement des métastases osseuses lorsqu'elles sont injectées dans le tibia des animaux (Hall et al., 2006). Il a de plus été observé *in vitro* qu'en stimulant l'expression d' $\alpha 2\beta 1$ dans les cellules LNCaP, le TGF- β favorise leur adhésion au collagène 1 (Cooper et al., 2002).

D'autre part, l'adhésion des cellules tumorales *via* les intégrines à des protéines de la matrice osseuse va leur permettre, non seulement, de s'ancrer dans la moelle osseuse, mais aussi, de stimuler leur invasion grâce à l'activation de MMPs. Une étude a en effet montré que des cellules de cancer du sein, de la prostate, de la thyroïde et du poumon se fixent à la BSP *via* l'intégrine $\alpha v\beta 3$, qui elle-même peut se lier et stimuler l'activité de la MMP-2. Ainsi, la formation d'un complexe trimoléculaire avec la MMP-2 activée favorise l'invasion tumorale (Karadag et al., 2004). De même, il a été observé que la fixation *via* $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ à l'ostéonectine (De et al., 2003) augmente l'activité de MMP-2 exprimée par les cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) et de la prostate (DU-145, PC-3) (Jacob et al., 1999). Par ailleurs, l'augmentation d'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ par CXCL-12 rend les cellules tumorales encore plus invasives (Sun et al., 2007). Nous avons aussi observé que l'expression d' $\alpha v\beta 3$ dans des cellules CHO favorise l'apparition de métastases osseuses chez les souris *nude* (Pecheur et al., 2002) et que la surexpression spontanée de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ dans les

cellules de cancer du sein B02 (sous population des cellules MDA-MB-231 isolées à partir de métastases osseuses) (Peyruchaud et al., 2001) favorise leur adhésion et l'invasion à l'os (Pecheur et al., 2002). Plus récemment, nous avons observé qu'un inhibiteur non peptidique de l'intégrine $\alpha\beta3$ bloque l'invasion tumorale *in vitro* et la formation des métastases osseuses *in vivo* (Zhao et al., 2007). Nous avons en effet montré que cet inhibiteur de l'intégrine $\alpha\beta3$ bloquait le « homing » des cellules tumorales dans la moelle osseuse (Zhao et al., 2007)

2.1.1.3.2. Les protéases

Lorsqu'elles arrivent au site osseux, les cellules tumorales peuvent sécréter différentes MMPs (dont MMP-2) et des sérine protéases [hepsine, urokinase uPA (Urokinase type Plasminogen Activator)] qui permettent de dégrader localement la matrice extracellulaire et d'envahir la moelle osseuse (Clines and Guise, 2005). Par exemple, une étude transcriptomique a permis de mettre en évidence que les sous-clones à caractère ostéophile de la lignée MDA-MB-231 surexpriment la MMP-1 (Kang et al., 2003). Par ailleurs, la surexpression de MMP-1 dans ces cellules MDA-MB-231 augmente la formation des métastases osseuses *in vivo* (Kang et al., 2003). Une autre étude a montré que si un inhibiteur endogène des sérines protéases, la maspase, est inhibé, les cellules tumorales deviennent plus invasives *in vivo* (Luo et al., 2007). De même, la surexpression de sérines protéases favorise l'invasion tumorale. C'est le cas par exemple si l'hepsine ou l'urokinase uPA sont surexprimées dans des modèles animaux de cancer de la prostate (Guise and Mundy, 1998; Klezovitch et al., 2004). L'uPA, fixée sur son récepteur (uPAR) catalyse la transformation du plasminogène en plasmine qui participe à la dégradation de certaines protéines matricielles (laminine, fibronectine, collagène), mais aussi à l'activation de la majorité des pro-MMPs. Le récepteur uPAR favorise l'invasion tumorale en interagissant aussi avec les intégrines (Guo and Giancotti, 2004). Par exemple, l'inhibition de l'interaction des intégrines $\beta1$ avec uPAR dans les cellules MDA-MB-231 diminue la progression tumorale osseuse (van der Pluijm et al., 2001).

Les cellules tumorales peuvent produire d'autres protéines comme par exemple des cystéines protéases mais dont on ne connaît pas encore le rôle. Par exemple, la cathepsine K est une cystéine protéase que l'on croyait spécifique des ostéoclastes. Cette protéase impliquée dans la dégradation de l'os est en fait également exprimée dans les tumeurs

primitives du sein et de la prostate (Le Gall C et al. 2007, (Brubaker et al., 2003). Son rôle dans les cellules tumorales est inconnu.

2.1.2. L'ostéomimétisme

Au contact de l'environnement osseux les cellules tumorales peuvent acquérir un phénotype ostéoblastique en exprimant des gènes normalement exprimés par les ostéoblastes. Ce phénomène est appelé « ostéomimétisme ». Il a en effet été observé que certaines lignées cellulaires d'origine prostatique (PC-3, DU-145, C4-2B) expriment le facteur de transcription Runx2 qui permet la synthèse et la sécrétion de protéines osseuses par les cellules tumorales (OPN, OC et BSP) (Lin et al., 2001; Yeung et al., 2002; Zayzafoon et al., 2004). De plus, les analyses immunohistochimiques de métastases osseuses du cancer de la prostate faites par Zayzafoon *et coll.* (2004) ont permis de mettre en évidence l'expression du récepteur membranaire Notch-1 par les cellules métastatiques. Or, l'interaction de Notch-1 avec son ligand Dll1 (Delta-like 1) exprimé à la surface des cellules stromales et des ostéoblastes conduit à l'expression des gènes sous contrôle du facteur Runx2. Ils ont ainsi montré que l'expression de Notch-1 dans les cellules de carcinome prostatique C4-2B provoque leur différenciation en cellules ostéoblastiques et la formation de nodules de minéralisation en présence du ligand Dll1 (Zayzafoon et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus dernièrement dans le cadre d'une étude transcriptomique et immunohistochimique faite sur des métastases osseuses d'origine mammaire. Cette étude nous a permis d'identifier une vingtaine de gènes connus pour réguler l'ostéogenèse (cadhérine-11, connexine 43, ostéonectine, S100A4, Runx2,...) (Bellahcène et al., 2007). L'importance de l'ostéomimétisme dans le développement des métastases n'est pas encore bien définie. Néanmoins, son rôle semble important car il a été observé que le blocage de l'activité de Runx2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 empêche celles-ci de développer des métastases ostéolytiques (Javed et al., 2005). Il est probable que l'acquisition d'un phénotype ostéoblastique par les cellules tumorales favorise leur survie/prolifération dans l'environnement osseux.

2.2. Mécanismes de formation des métastases ostéolytiques

La matrice osseuse est le siège d'un perpétuel renouvellement au cours duquel il y a un équilibre entre la résorption osseuse assurée par les ostéoclastes et la formation osseuse assurée par les ostéoblastes. L'arrivée des cellules tumorales va provoquer un déséquilibre de ce couplage entre résorption et formation de l'os. Au site osseux les cellules métastatiques peuvent sécréter différents facteurs qui stimulent l'activité des ostéoclastes et inhibent celle des ostéoblastes. Dans ce cas, elles provoquent la mise en place d'une ostéolyse.

2.2.1. Stimulateurs de la résorption osseuse

2.2.1.1. La protéine apparentée à la parathormone (PTHrP)

La PTHrP (PTH related Protein) est une molécule possédant une grande homologie dans sa partie N-terminale avec l'hormone parathyroïdienne (PTH). Cette homologie structurale lui permet de se fixer au même récepteur, un membre de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine G, et de partager les mêmes activités biologiques que la PTH (Guise and Mundy, 1998). L'hypercalcémie a été la première conséquence identifiée de la sécrétion de PTHrP par des tumeurs malignes et de son action sur le récepteur commun à la PTH dans l'os et le rein. Les propriétés *PTH-like* de la PTHrP, et spécialement sa capacité à augmenter la résorption osseuse ostéoclastique et la réabsorption tubulaire rénale du calcium, sont responsables de l'hypercalcémie. D'ailleurs, l'induction de tumeurs mammaires dans des souris transgéniques surexprimant spécifiquement la PTHrP au niveau de la glande mammaire montre que ces souris développent une hypercalcémie (Wysolmerski et al., 2002). Par contre, la PTHrP n'intervient pas dans la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. Par exemple, une étude clinique prospective réalisée sur 526 patientes (suivi médian de 10 ans) a montré que l'expression de PTHrP dans les adénocarcinomes mammaires était un facteur de bon pronostic (la survie globale des patientes ayant une tumeur PTHrP⁺ est de 78% à 10 ans alors qu'elle est de 51% pour les patientes ayant une tumeur PTHrP⁻) (Henderson et al., 2001; Henderson et al., 2006). Toutefois, différentes études rétrospectives cliniques montrent que la PTHrP peut être produite par les cellules métastatiques au site osseux (Bouizar et al., 1999; Bundred et al., 1992; Kohno et al.,

1994; Yoshida et al., 2000) suggérant que la PTHrP intervient dans la progression des lésions osseuses dès lors que les cellules ont métastasé au tissu osseux. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'administration d'anticorps anti-PTHrP en traitement préventif ou curatif diminue significativement la progression des métastases ostéolytiques provoquées par les cellules MDA-MB-231 (Guisse et al., 1996). Au contraire, lorsque les cellules MCF-7 ont été transfectées pour surexprimer la PTHrP, l'étendue des plages d'ostéolyse est doublée par rapport aux animaux ayant reçu les cellules parentales (Thomas et al., 1999).

Ces observations s'expliquent par le fait que l'activation du récepteur de la PTH à la surface des ostéoblastes par la PTHrP induit, d'une part, l'expression de RANKL et inhibe, d'autre part, l'expression d'OPG favorisant ainsi l'activation des ostéoclastes (Thomas et al., 1999). De plus, la PTHrP peut aussi stimuler *in vivo* la production par les ostéoblastes des cytokines Il-6 et LIF (Interleukine-6, Leukemia Inhibitory Factor) (Pollock et al., 1996) qui vont secondairement stimuler le recrutement de précurseurs ostéoclastiques (Manolagas and Jilka, 1995). Par ailleurs, la PTHrP peut avoir aussi une action autocrine qui conduit à la production de CTGF (connective tissue growth factor) par les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (Shimo et al., 2006). Le CTGF (ou CCN2) est un facteur appartenant à la famille des protéines riches en cystéine (CCN) capable de stimuler *in vitro* l'ostéoclastogénèse (Shimo et al., 2006) et la migration des cellules MDA-MB-231 (Chen et al., 2007). Le traitement des animaux ayant reçu une injection intracardiaque de cellules MDA-MB-231 avec un anticorps dirigé contre CTGF bloque la formation des métastases ostéolytiques (Shimo et al., 2006).

2.2.1.2. Cytokines

Nous avons vu précédemment que la PTHrP stimule la production par les ostéoblastes de RANKL et d'Il-6. Or, RANKL peut induire l'expression par les cellules tumorales d'autres interleukines (Tometsko et al., 2004) dont certaines (Il-8, Il-11) peuvent directement agir sur les ostéoclastes.

Bendre *et coll.* (2002) ont d'abord observé par analyse transcriptomique que l'Il-8 est surexprimée dans la sous-population de cellules de cancer du sein MDA-MET (dérivées des MDA-MB-231) qu'ils ont isolée pour son caractère ostéophile (Bendre et al., 2002). Ils ont ensuite montré *in vitro* que l'Il-8 active de façon indirecte les ostéoclastes en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes (Bendre et al., 2003b), et de façon directe, en

stimulant la différenciation des préostéoclastes en ostéoclastes matures. Les ostéoclastes et leurs précurseurs expriment effectivement le récepteur de l'Il-8 (CXCR1) (Bendre et al., 2003a).

L'Il-11 est une cytokine produite par les cellules stromales/ostéoblastes de la moelle osseuse connue pour son rôle dans la stimulation de l'ostéoclastogénèse (Girasole et al., 1994). Une étude a permis de mettre en évidence que l'Il-11 est aussi exprimée dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein et que le niveau d'expression dans les tumeurs primitives corrèle avec la survenue ultérieure de métastases osseuses (Sotiriou et al., 2001). Les travaux de Singh *et coll.* (2006) ont de plus montré que la surexpression d'Il-11 par des cellules de carcinome mammaire (MCF-7 et MDA-MB-231) est associée à une augmentation d'incidence des métastases osseuses chez les animaux (Singh et al., 2006b).

Par ailleurs, il a été observé que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) est aussi impliqué dans la mise en place de l'ostéolyse maligne (Park et al., 2007). Le GM-CSF est un facteur pro-inflammatoire qui a été identifié en tant que stimulateur de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en macrophages, granulocytes et également en ostéoclastes. Park KB *et coll.* (2007) ont mis récemment en évidence que les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 peuvent induire une ostéoclastogénèse *in vitro* via l'expression de GM-CSF. Ainsi, l'inactivation génétique de cette cytokine dans ces cellules induit une diminution de la formation des métastases ostéolytiques chez les animaux (Park et al., 2007). La détection de GM-CSF dans les métastases osseuses de patientes atteintes du cancer du sein supporte cette hypothèse (Park et al., 2007).

2.2.1.3. Prostaglandines

Les cellules de carcinome mammaire produisent également une autre classe de molécules pro-ostéoclastiques appelées prostaglandines. L'expression de ces molécules est contrôlée par les enzymes cyclooxygénases (COX).

Par exemple, un des métabolites de COX-2, la prostaglandine E2 (PGE₂), est connu pour stimuler la résorption osseuse en induisant une augmentation d'expression de RANKL par les cellules ostéoblastiques. Le mécanisme d'induction des métastases osseuses régulé par COX-2 stimule aussi l'expression dans les cellules tumorales de l'Il-8 et Il-11 (Singh et al.,

2006a; Singh et al., 2006b). Il a été également observé *in vitro* que COX-2 stimule l'ostéoclastogénèse en inhibant la production d'OPG par les ostéoblastes et en augmentant l'expression de RANK à la surface des ostéoclastes (Liu et al., 2006). Or, les métastases osseuses provenant de patients atteints de différents cancers (par exemple, sein, poumon, rein) expriment COX-2 (Hiraga et al., 2006). Des études récentes ont permis d'analyser le rôle de COX-2 et de la PGE2 *in vivo* dans le développement de ces métastases. Tout d'abord, Hiraga *et coll.* (2006) ont observé que COX-2 est exprimée par les cellules MDA-MB-231 qui métastasent à l'os après injection intracardiaque, alors qu'elle ne l'est pas dans ces mêmes cellules injectées en orthotopique. Par ailleurs, la surexpression de COX-2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-435S favorise la formation de métastases osseuses chez les animaux (Singh et al., 2007). De plus, le traitement d'animaux avec des inhibiteurs de COX-2 (NS-398, MF-tricyclic) bloque la formation des métastases osseuses induites par les cellules MDA-MB-231 ou MDA-MB-435S (Hiraga et al., 2006; Singh et al., 2007).

2.2.2. Inhibiteurs de la formation osseuse

2.2.2.1. Dickkopf-1

Dickkopf-1 (DKK1) est une protéine soluble antagoniste de la voie de signalisation Wnt qui inhibe la différenciation ostéoblastique. Cette voie peut être initiée par la liaison spécifique de la protéine Wnt-1 au récepteur frizzled (Fzd) et son corécepteur LRP5/6 (Low density Lipoprotein Receptor related Protein 5/6) qui induit secondairement la stabilisation de la β -caténine et sa translocation nucléaire. Dans le noyau, la β -caténine s'associe aux facteurs de la famille TCF/LEF et permet la transcription de gènes cibles, activant ainsi l'expression de gènes spécifiques (Mao et al., 2001). DKK-1 empêche l'activation de cette voie en induisant la formation d'un complexe ternaire avec LRP5/6 et la protéine transmembranaire Kremen (Krm) (Figure 11) (Westendorf et al., 2004).

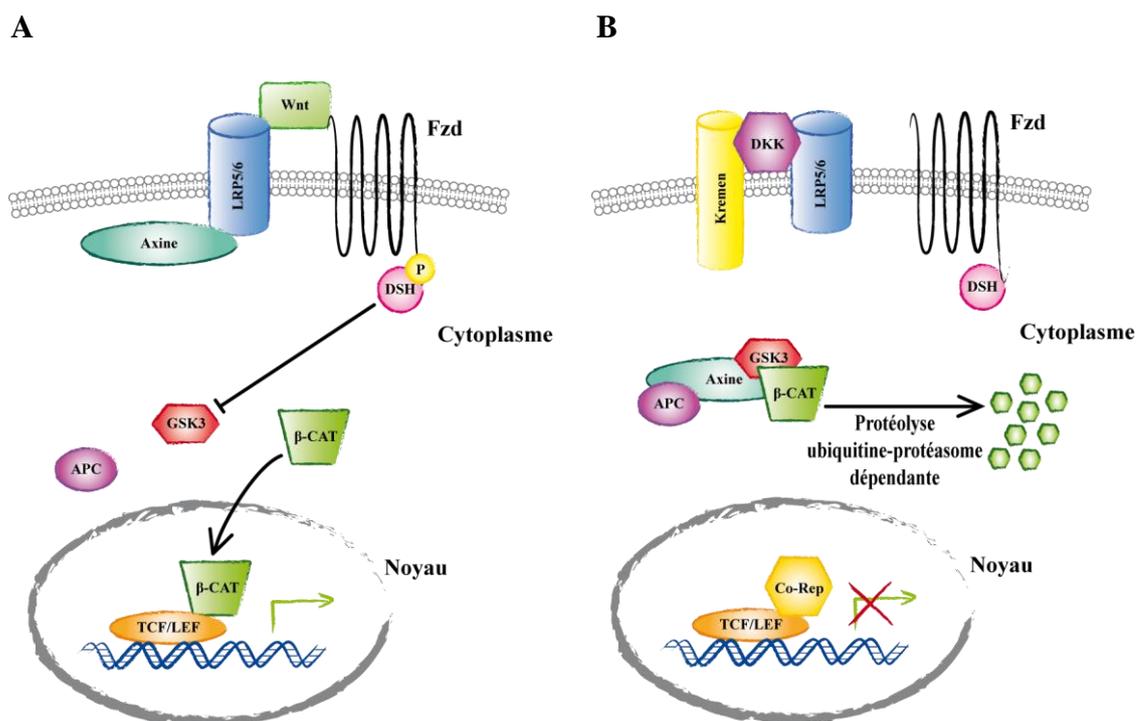


Figure 11. Représentation de la voie canonique de signalisation Wnt.

(A) Wnt se lie au récepteur Fzd et au co-récepteur LRP5/6 ce qui induit l'hyperphosphorylation de Dsh (Dishevelled), bloquant dans ces conditions l'activité de GS3K. Ceci permet alors la stabilisation et translocation de la β-caténine qui active l'expression de gènes spécifiques en association avec les facteurs TCF/LEF. (B) DKK-1 inhibe la voie de signalisation Wnt en formant un complexe avec Kremen et LRP5/6. La β-caténine est alors séquestrée par le complexe Axine, APC (Adenomatous Polyposis Coli) et GSK-3 ce qui induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome.

DDK-1 est un facteur exprimé dans les cellules tumorales. Il a été initialement découvert comme étant produit par les plasmocytes tumoraux dans le myélome multiple qui a la particularité de former des lésions purement ostéolytiques (Tian et al., 2003). Il a été ensuite identifié dans les lignées cellulaires d'adénocarcinomes mammaires et prostatiques (MDA-MB-231, B02, T47B, MCF-7, PC-3) qui forment chez les animaux des lésions ostéolytiques ou mixtes (Schwaninger et al., 2007; Voorzanger-Rousselot et al., 2007). Par ailleurs, après la transfection des cellules de carcinome prostatique C4-2b avec DKK-1, les cellules ne produisent non plus des lésions mixtes à tendance ostéoblastique, mais au contraire elles induisent des lésions ostéolytiques chez l'animal (Hall et al., 2005). Finalement, des taux élevés de DKK-1 sont détectés dans la circulation sanguine de patients ayant un myélome multiple ou un cancer du sein métastatique avec atteinte osseuse (Tian et al., 2003; Voorzanger-Rousselot et al., 2007). L'expression de DKK-1 est donc clairement associée avec l'établissement de lésions ostéolytiques.

2.2.2.2. Noggin

Noggin est une protéine antagoniste des BMPs qui exerce ses effets biologiques en interagissant soit avec les BMPs (Zimmerman et al., 1996) soit avec les récepteurs des BMPs de type I et II (Groppe et al., 2002) (Figure 12). La fixation des BMPs sur le récepteur de type II induit la phosphorylation de ce récepteur qui lui-même phosphoryle le récepteur de type I avec lequel ils forment un complexe qui provoque alors la phosphorylation des protéines Smad1 et Smad5 (Logothetis and Lin, 2005). Il en résulte ensuite une stimulation de l'expression des facteurs de transcription Runx2 et Osterix qui permettent la différenciation ostéoblastique (Logothetis and Lin, 2005).

Noggin, tout comme DKK-1, est exprimé dans les lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate qui forment des métastases ostéolytiques (Schwaninger et al., 2007). De plus, l'expression par transfection de Noggin dans des cellules de cancer de la prostate (C4-2B, LAPC-4) qui forment habituellement des lésions ostéocondensantes permet de bloquer le développement de ce type de lésions (Feeley et al., 2006; Schwaninger et al., 2007).

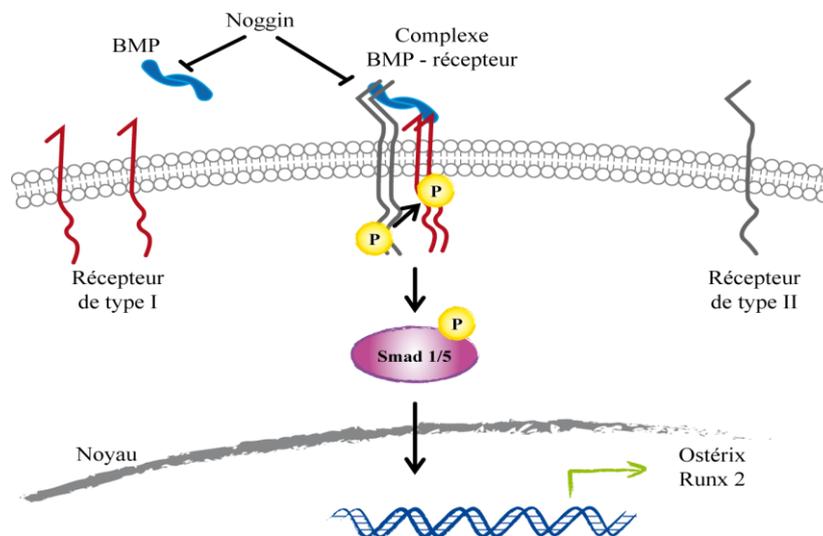


Figure 12. Représentation de la voie de signalisation régulée par les BMPs et Smad 1/5.

2.2.3. Contribution du tissu osseux dans l'ostéolyse

2.2.3.1. TGF- β

La matrice osseuse est un réservoir important de facteurs de croissances dont le TGF- β . Il est libéré et activé par les MMPs et la plasmine au cours de la résorption osseuse (Dallas et al., 2002). Le TGF- β agit sur les cellules tumorales par le biais d'un récepteur de haute affinité dit de type II (T β RII) qui est présent à la surface des cellules sous forme d'un homodimère (Bierie and Moses, 2006). Il en résulte une transactivation (phosphorylation) du récepteur TGF- β de type I (T β RI) qui est lui-même sous forme d'un homodimère, et la formation d'un hétérocomplexe entre le TGF- β et les récepteurs T β RI et T β RII (Bierie and Moses, 2006). Cette complexation entraîne l'activation d'une voie de signalisation dépendante des protéines Smads. En général, il se forme un hétérocomplexe entre les protéines Smad2, Smad3 et Smad4 qui, après translocation dans le noyau, active la transcription de différents gènes (Bierie and Moses, 2006) (Figure 13). D'autres voies de signalisation indépendantes des Smads (MAPK, COX-2, RhoA, ect) peuvent être activées.

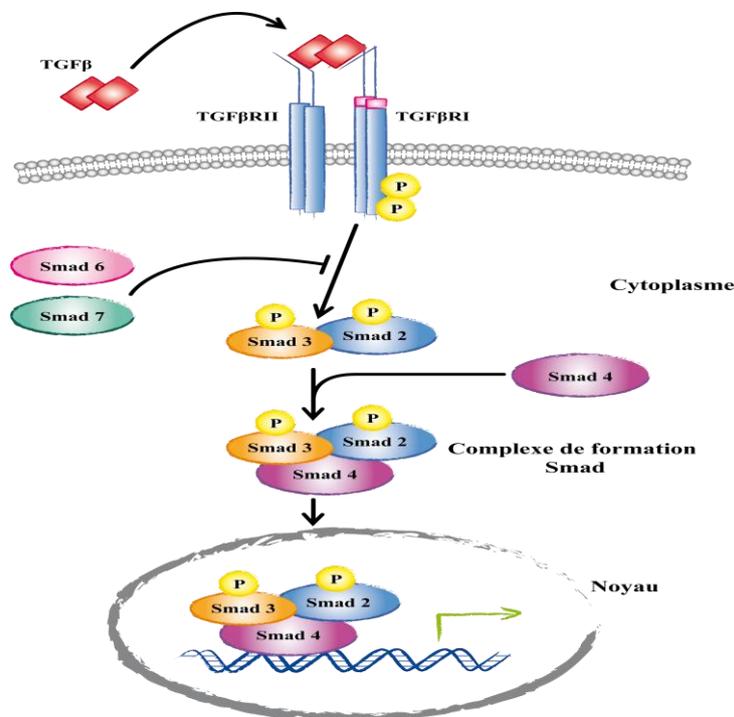


Figure 13. Représentation de la voie de signalisation régulée par le TGF- β et les protéines Smads.

L'équipe de T. Guise a démontré que la transfection d'un récepteur au TGF- β de type II dominant négatif inhibe l'induction d'expression de PTHrP par le TGF- β *in vitro* et le développement de métastases osseuses dans un modèle expérimental de métastases osseuses utilisant les cellules MDA-MB-231 (Yin et al., 1999). Au contraire, la transfection d'un récepteur constitutivement actif de type I rétablit la formation des métastases osseuses dans le modèle animal (Yin et al., 1999). De plus, des inhibiteurs tyrosine kinase ciblant T β RI inhibent la formation des métastases osseuses induites par les cellules de cancer du sein MDA-MB-435 et MDA-MB-231 chez les animaux (Bandyopadhyay et al., 2006; Guise et al., 2006). Des expériences similaires furent également réalisées avec des cellules de cancer du sein (RBM) transfectées pour exprimer un dominant négatif de T β RII. La croissance de ces cellules est inhibée au site osseux alors qu'elle n'est pas affectée lorsque les cellules sont implantées sous la peau des animaux (Kominsky et al., 2007). L'ensemble de ces résultats indique donc que, lors de l'ostéolyse, le TGF- β libéré de la matrice osseuse agit directement sur les cellules tumorales par le biais des récepteurs T β RI/T β RII pour stimuler la prolifération tumorale ou/et la sécrétion de facteurs pro-ostéoclastiques tels que la PTHrP. La stimulation de la PTHrP par le TGF- β se fait par le biais de la voie Smad et des MAPK (Kakonen et al., 2002). Le TGF- β stimule également la sécrétion d'Il-11 par les cellules MDA-MB-231 selon un processus dépendant de la voie de signalisation Smad (Kang et al., 2003). D'ailleurs, l'inactivation de Smad4 ou la surexpression de Smad7 (un inhibiteur de la voie de signalisation Smad 2/3) dans les cellules MDA-MB-231 bloque l'expression de PTHrP et d'Il-11 ainsi que la formation des métastases osseuses chez les animaux (Deckers et al., 2006; Javelaud et al., 2007; Kang et al., 2005). Le TGF- β stimule aussi la production de PGE2 par les cellules MDA-MB-231 par le biais d'une voie dépendante de COX-2. Dans ce contexte, le traitement des animaux avec des inhibiteurs de COX-2 (NS-398, nimesulide), comme nous l'avons vu précédemment, bloque la formation des métastases osseuses induites par les cellules MDA-MB-231 (Hiraga et al., 2006). Ensuite, le TGF- β peut aussi induire *via* Smad3 une augmentation de la transcription de gènes régulés par Runx-2 (collagénase-3 ou MMP-13) (Selvamurugan et al., 2004). Or, Runx-2 a été caractérisé comme étant important dans le développement des métastases ostéolytiques. En effet, le blocage de son activité dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 empêche celles-ci de développer des métastases ostéolytiques (Javed et al., 2005).

2.2.3.2. IGF-1

Les IGFs (IGF-I et IGF-II) sont des facteurs de croissance stockés, les plus nombreux de la matrice osseuse. Ils peuvent se lier aux récepteurs IGF-I et IGF-II et leur activité biologique peut être stimulée ou inhibée par 6 protéines de liaison IGF-BPs (Guisse and Mundy, 1998). Ils agissent essentiellement en se fixant au récepteur IGF-I de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, un tétramère composé de deux sous-unités α extracellulaires et deux sous-unités β transmembranaires (LeRoith et al., 1995). L'utilisation de surnageants de calvaria de souris ayant une activité de résorption osseuse et d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'IGF-I a permis de montrer que l'IGF-I libéré au cours de la résorption stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Yoneda, 1995). Des tests de migration *in vitro* avec de l'IGF-I ont montré que ce facteur agit aussi sur le chimiotactisme des cellules cancéreuses mammaires (Doerr and Jones, 1996; Yoneda, 1995). D'autre part l'expression d'un récepteur à l'IGF-I dominant négatif dans des cellules MDA-MB-231 réduit la masse tumorale aux sites métastatiques osseux, indiquant que leur habilité à répondre à l'IGF-I favorise la formation des métastases osseuses (Toru and Akira, 2001).

2.2.3.3. Calcium

La résorption osseuse permet la libération de grandes quantités de calcium ionisé Ca^{2+} . Le récepteur du calcium CaR est un récepteur couplé à la protéine G à 7 domaines transmembranaires qui répond à de faibles variations de concentration de calcium extracellulaire. Il est exprimé par les cellules de carcinome mammaire (MCF-7, MDA-MB-231) et prostatique (PC3) et régule la sécrétion de PTHrP par ces cellules. En effet, l'augmentation de concentrations en Ca^{2+} et les agonistes de CaR, néomycine et spermine, stimulent la sécrétion de PTHrP de façon dose-dépendante (Sanders et al., 2001; Sanders et al., 2000). De plus, le Ca^{2+} stimule la prolifération de certaines lignées cellulaires (PC-3, C4-2B) du cancer de la prostate (Liao et al., 2006).

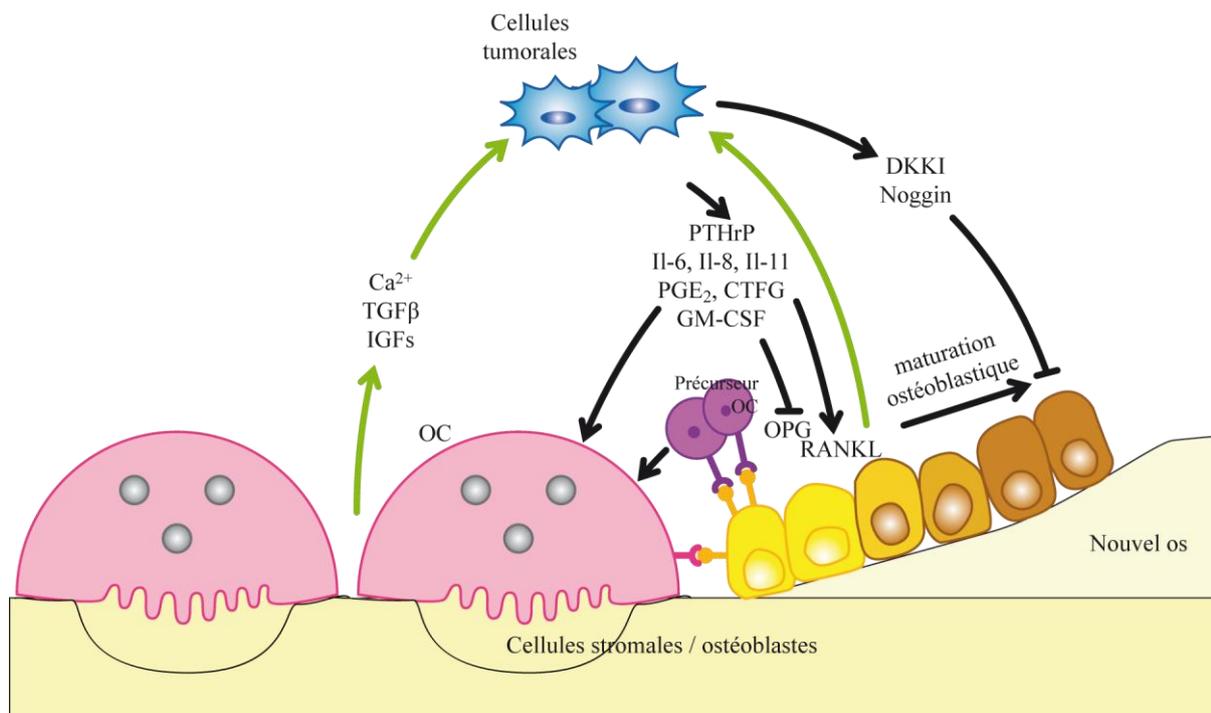


Figure 14. Interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans le développement d'une métastase ostéolytique.

Les cellules tumorales présentes dans la moelle osseuse sécrètent des facteurs solubles stimulant l'activité des ostéoclastes (PTHrP, Il-6, Il-8, Il-11, prostaglandine E2 (PGE2), CTGF, MG-CSF) et inhibent la différenciation des ostéoblastes (DKK-1, Noggin). L'activation des ostéoclastes par la PTHrP se fait indirectement, en stimulant l'expression de RANKL par les ostéoblastes. L'interaction de RANKL avec RANK permet alors la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures. Par ailleurs, différents facteurs de croissance (IGFs, TGF- β) ainsi que du calcium (Ca^{2+}) sont libérés de la matrice osseuse lors de l'ostéolyse. Les IGFs exercent une action mitogène sur les cellules tumorales. Le TGF- β agit sur les cellules tumorales en stimulant, par le biais des voies de signalisation Smad et Cox-2, la production de PTHrP, d'interleukines (Il-8, Il-11) et de PGE2. Le calcium stimule également la sécrétion de PTHrP par les cellules métastatiques. Il en résulte la formation d'un cercle vicieux où les phénomènes de destruction osseuse et de prolifération tumorale s'entretiennent mutuellement.

2.3. Mécanismes de formation des métastases ostéocondensantes

L'arrivée des cellules tumorales dans la matrice osseuse provoque un déséquilibre du couplage entre résorption et formation de l'os comme nous l'avons vu précédemment. Toutefois, au contraire de ce qui a été observé dans le cas de métastases ostéolytiques, les cellules tumorales, le plus souvent d'origine prostatique, peuvent sécréter différents facteurs qui inhibent l'activité des ostéoclastes et activent celle des ostéoblastes. Dans ce cas, elles provoquent la mise en place d'une ostéocondensation.

2.3.1. Stimulateurs de la formation osseuse

2.3.1.1. ET-1

Les endothélines représentent une famille de trois peptides de 21 acides aminés : ET-1, -2 et -3. Elles exercent leur effet en se liant aux récepteurs de surface cellulaire couplés à la protéine G, ET_A et ET_B. Ces peptides sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques des tissus normaux (*i.e.*, vasoconstriction, différenciation, réparation et croissance tissulaire, inhibition de l'apoptose) mais aussi dans la progression de nombreuses tumeurs (Nelson et al., 2003). Par exemple, l'endothéline-1 (ET-1) semble jouer un rôle important dans le développement des métastases ostéocondensantes.

L'ET-1 est un puissant facteur mitogène pour les ostéoblastes (Logothetis and Lin, 2005). Des taux élevés d'ET-1 ont été détectés dans le plasma de patients ayant un cancer de la prostate avec métastases osseuses et il a été observé *in vitro* que les cellules de cancer du sein et de la prostate induisant des métastases ostéocondensantes chez les patients produisent de l'ET-1 (Nelson et al., 2003; Nelson et al., 1995). Dans des modèles animaux de métastases ostéocondensantes, l'expression d'ET-1 par les cellules tumorales favorise une production d'os nouveau (Guisse et al., 2003; Yin et al., 2003) qui peut être inhibée par un inhibiteur spécifique du récepteur ET_A (ABT627/atrasentan), mais non du récepteur ET_B (Yin et al., 2003). L'ET-1 produite par les cellules tumorales a donc une action mitogène sur les ostéoblastes, *via* le récepteur de type ET_A. Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'ET-1 peut avoir un effet sur les ostéoclastes. En effet, l'ET-1 produite par les cellules de carcinomes prostatiques (*i.e.*, DU-145, PC-3) bloque la résorption osseuse d'ostéoclastes cultivés sur lamelles d'os (Chiao et al., 2000). Toutefois, le récepteur ET_A n'étant pas exprimé par les ostéoclastes, le mode d'action de l'ET-1 sur ce type de cellules doit être différent. Enfin, il a été observé que les cellules tumorales (*i.e.*, ovarien, colon) peuvent aussi exprimer le récepteur ET_A (Guisse et al., 2003) et que l'ET-1 peut avoir une action mitogène sur les cellules de carcinome prostatique PC-3 (Chiao et al., 2000).

L'ET-1 peut agir sur les ostéoblastes *via* le récepteur ET_A en activant les voies MAPK ou Akt (Nelson et al., 2003) mais aussi en diminuant la production de DKK1, qui comme nous l'avons vu est impliqué dans l'ostéoblastogenèse (Clines et al., 2007).

2.3.1.2. PTHrP [1-23]

Il a été observé que de nombreuses cellules tumorales d'origine prostatique expriment la PTHrP alors que ces cellules induisent des métastases ostéocondensantes (Clines and Guise, 2005). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que ces cellules expriment aussi le PSA (Prostate Specific Antigen). Le PSA est une sérine protéase dont l'expression a été initialement observée dans les tissus épithéliaux prostatiques. Il a été suggéré que cette protéine cliverait la PTHrP et générerait ainsi la production d'un fragment PTHrP [1-23] (Cramer et al., 1996; Iwamura et al., 1996). Non seulement ce clivage inhiberait la capacité de la PTHrP à activer les ostéoclastes, mais en plus le fragment généré activerait les ostéoblastes (Clines and Guise, 2005). En effet, une étude montre que le fragment PTHrP [1-23] peut se fixer au récepteur ET_A des ostéoblastes et stimuler ainsi la formation nouvelle d'os dans des calvaria en culture (Guise et al., 2006). Par ailleurs, l'atrasentan, un inhibiteur spécifique de l'ETA, bloque cette stimulation (Guise et al., 2006).

2.3.1.3. BMPs

Il a été observé que les cellules humaines de carcinome prostatique LAPC-9 et LAPC-4 expriment les BMP-2, -4 et -7 et leurs récepteurs, et que les LuCaP 23.1 produisent la BMP-6 (Dai et al., 2005; Feeley et al., 2005). Ainsi, l'inhibition de la voie des BMPs (Noggin, anticorps anti-BMP-6) dans les modèles métastatiques animaux LAPC-9 et LuCaP 23.1 inhibe leur capacité à former des lésions ostéocondensantes (Dai et al., 2005; Feeley et al., 2005). Par ailleurs, les BMP-2 et -7 stimulent *in vitro* la migration et l'invasion des cellules LAPC4 (Feeley et al., 2005) et les BMP-2 et -6 l'invasion des cellules LuCaP 23.1 (Dai et al., 2005). De plus, la BMP-2 stimule la prolifération des cellules prostatiques PC-3 (Feeley et al., 2006). Les BMPs produites par les cellules tumorales et celles libérées de la matrice au cours de la résorption favorisent donc la progression tumorale au site métastatique. Malgré le fait que les BMPs agissent toutes sur la même voie de transduction du signal, les différents effets observés pourraient s'expliquer par le fait qu'elle activent de multiples voies de signalisation (Feeley et al., 2005).

2.3.1.4. Autres facteurs

D'autres facteurs produits par les cellules tumorales, comme par exemple le VEGF, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'adrénomédulline (AM), pourraient participer à la réaction ostéoblastique.

2.3.1.4.1. VEGF

Il a été observé que les cellules tumorales produisent du VEGF, facteur connu pour son rôle dans l'angiogenèse. En plus d'activer l'angiogenèse, le VEGF peut aussi activer les ostéoblastes *in vitro* (Logothetis and Lin, 2005). En effet, les ostéoblastes qui expriment les récepteurs membranaires du VEGF, Flt1 (Fms like tyrosine kinase) et KDR (Kinase Domain containing Receptor), peuvent être stimulés *in vitro* par le VEGF produit par les cellules de carcinome prostatique C4-2B. De plus, le traitement d'animaux avec un inhibiteur tyrosine kinase de Flt1 (PTK787) bloque la formation des lésions ostéocondensantes induites par les cellules C4-2B (Kitagawa et al., 2005).

2.3.1.4.2. PDGF

Le PDGF est un dimère résultant de l'association des sous-unités A et/ou B (formes AA, AB, et BB). Une étude montre que la surexpression de l'oncogène Neu (ou HER2 ou ErbB-2) dans des cellules humaines de cancer du sein MCF-7 augmente leur capacité à former des métastases ostéocondensantes chez les animaux (Yi et al., 2002). Les auteurs ont observé que la surexpression de Neu corrèle avec une augmentation de la production de PDGF-BB. Ainsi, lorsqu'ils ont diminué la production de PDGF-BB par ARN anti-sens dans les cellules MCF/Neu, ils ont observé une diminution de la quantité de métastases et de l'ostéocondensation. A l'inverse, lorsqu'ils ont transfecté les cellules MDA-MB-231, connues pour former des métastases ostéolytiques, avec le PDGF-BB, ils ont observé une induction de la formation de métastases mixtes (Yi et al., 2002).

2.3.1.4.3. Adrénomédulline

L'AM est un peptide multifonctionnel qui agit en se fixant au récepteur CRLR couplé à la protéine G (Calcitonin Receptor Like Receptor) dont la spécificité pour l'AM est conférée par les protéines transmembranaires associées RAMP-2 et -3 (receptor activity modifying

protein) (McLatchie et al., 1998). Or, Rocchi *et coll.* (2001) ont montré qu'il existe une corrélation entre l'expression de ce peptide et le degré de gravité du cancer de la prostate. De plus, on sait que l'AM exerce une action anabolique *in vitro* sur les ostéoblastes (Cornish et al., 2004). De ce fait, dès lors que les cellules métastasent à l'os, il est concevable que l'AM intervienne dans la mise en place de l'ostéocondensation.

2.3.2. Inhibiteurs de la résorption osseuse

Le clivage de la PTHrP par le PSA génère un fragment qui peut activer les ostéoblastes, mais il inhibe également la capacité de la PTHrP à activer les ostéoclastes (Clines and Guise, 2005). L'ET-1, au-delà de son action mitogène sur les ostéoblastes, peut également inhiber l'activité des ostéoclastes (Chiao et al., 2000). Par ailleurs, il a été observé que les patients atteints de cancer de la prostate métastatique ont des taux circulants d'OPG élevés. L'OPG, en tant que récepteur leurre soluble de RANKL, inhibe l'ostéoclastogénèse. Ces trois facteurs ont donc un rôle important dans la formation des métastases ostéocondensantes.

2.3.3. Contribution du tissu osseux dans l'ostéocondensation

La résorption osseuse contribue à la physiopathologie des métastases ostéoblastiques. Un taux élevé de marqueurs de résorption (CTX) est en effet observé chez les patients atteints de métastases osseuses associées à un cancer de la prostate (Garnero et al., 2000). Certains facteurs libérés de la matrice osseuse en cours de résorption peuvent donc intervenir dans le développement des métastases ostéocondensantes.

2.3.3.1. IGFs, BMPs

Comme nous l'avons vu, les IGFs et les BMPs libérés de la matrice osseuse peuvent exercer une action mitogène sur les cellules tumorales et stimuler leur migration et invasion (Feeley et al., 2005; Feeley et al., 2006; Logothetis and Lin, 2005).

2.3.3.2.TGF- β

Le TGF- β stimule l'ostéoblastogenèse en régulant l'expression de Runx2 (Logothetis and Lin, 2005). Par ailleurs, des co-cultures de cellules de carcinome prostatique avec des lamelles d'os en cours de résorption ont montré que les cellules sécrètent une quantité plus importante d'ET-1 au contact de l'os (Chiao et al., 2000). Cet effet pourrait être la conséquence de l'action du TGF- β qui peut induire une augmentation de la production de l'ET-1 par les cellules tumorales (Le Brun et al., 1999).

2.3.3.3.Calcium

Une étude récente a mis en évidence l'expression d'un récepteur membranaire pour le calcium (CaSR) dans les cellules de carcinome prostatique humaines PC-3 et C4-2B. Le calcium extracellulaire exerce ainsi une action mitogène sur ces cellules (Liao et al., 2006). Par ailleurs, lorsque l'expression de CaSR est inhibée par siRNA dans ces cellules, il y a diminution de leur progression métastatique *in vivo* (Liao et al., 2006).

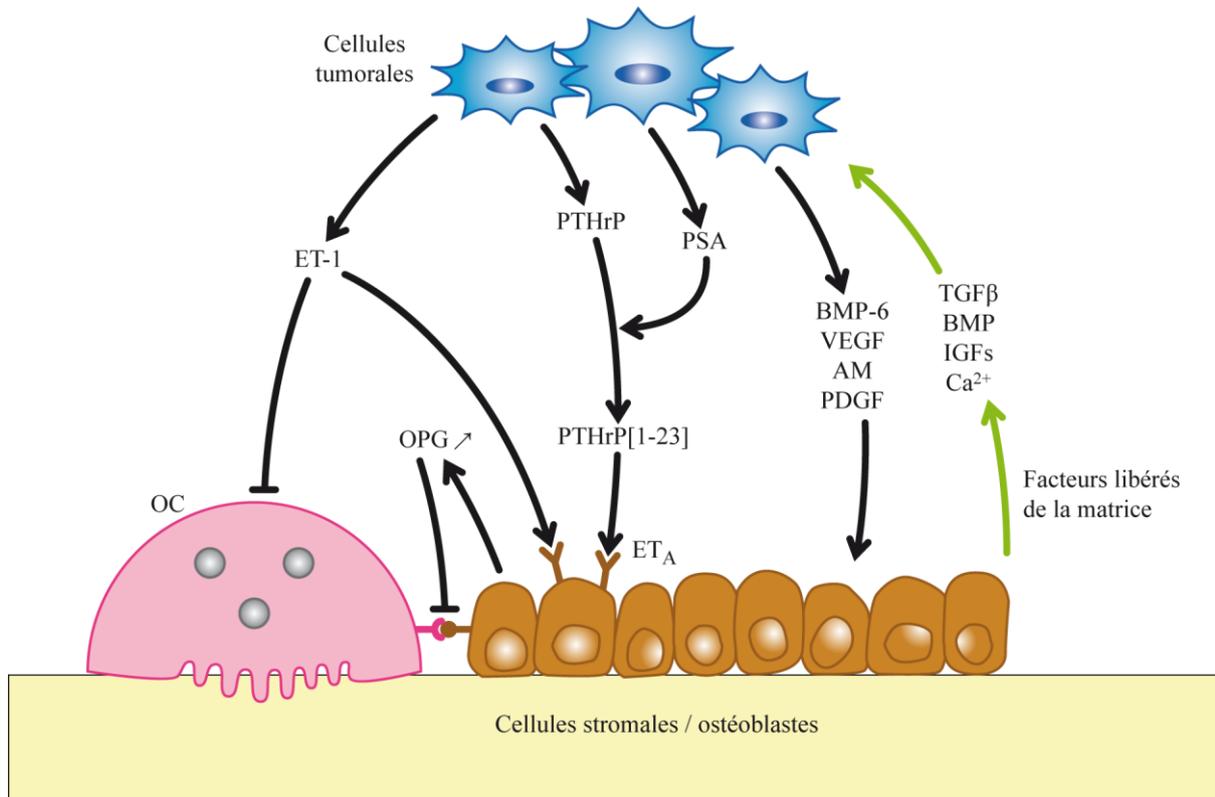


Figure 15. Interactions moléculaires entre les cellules tumorales et l'environnement osseux impliquées dans le développement d'une métastase ostéocondensante.

Les cellules tumorales présentes dans la moelle osseuse sécrètent des facteurs solubles stimulant l'activité des ostéoblastes (ET-1, BMP-6, VEGF, AM, PDGF...) et inhibant la différenciation et l'activité des ostéoclastes (ET-1). D'autre part, le PSA libéré par les cellules tumorales clive la PTHrP, générant un fragment protéolytique [PTHrP (1-23)] qui est mitogène pour les ostéoblastes. Les taux d'OPG sont également élevés dans les ostéoblastes; l'OPG en se fixant à RANKL bloque l'interaction RANK/RANKL et donc l'ostéoclastogénèse. Par ailleurs, différents facteurs de croissance (TGF- β , BMPs, IGFs) ainsi que du calcium (Ca^{2+}) sont libérés de la matrice osseuse. Les IGFs et les BMPs exercent une action mitogène sur les cellules tumorales. Le calcium stimule également la prolifération des cellules métastatiques.

2.4. Le cercle vicieux des métastases osseuses

Au niveau de la métastase osseuse, les échanges entre les cellules du tissu osseux et les cellules métastatiques aboutissent à l'activation de chacun de ces types cellulaires.

Dans le cas de métastases ostéolytiques, les cellules métastatiques produisent des facteurs qui stimulent l'ostéoclastogénèse (PTHrP) avec la participation des ostéoblastes et des cellules stromales (RANKL). En retour, les protéines libérées de la matrice osseuse (TGF- β , IGF I) stimulent la prolifération des cellules métastatiques, et donc de la PTHrP. Il s'en suit ainsi un cercle vicieux dans lequel prolifération tumorale et résorption osseuse s'entretiennent mutuellement.

Dans le cas de métastases ostéocondensantes, le processus est moins bien documenté. Toutefois, il semble que les cellules tumorales inhibent les ostéoclastes et produisent des facteurs capables d'activer les ostéoblastes (ET-1, PTHrP [1-23]). En retour, les ostéoblastes produisent des facteurs qui stimulent la prolifération tumorale (IGFs, BMPs) et donc la production d'ET-1 à nouveau par ces cellules.

3. BISPHOSPHONATES ET TRAITEMENT DES METASTASES OSSEUSES

3.1. Introduction à la maladie métastatique et ses traitements

Le risque de développer des métastases osseuses est plus fréquent dans le cas des cancers du sein, de la prostate, de la thyroïde, du poumon et du rein. Parmi ceux-ci les cancers du sein et de la prostate sont les plus ostéotropiques (ou ostéophiles) ; à eux seuls ils sont responsables de la majorité des métastases osseuses (70%). La localisation de celles-ci peut alors être le plus souvent multiple et diffuse principalement au niveau des vertèbres dorso-lombaires (70%), du pelvis et des fémurs. Malgré les avancées thérapeutiques on remarque que le pronostic d'un malade métastatique reste sombre, de l'ordre de 28 à 30 mois en cas de métastases uniquement osseuses. De plus, quelque soit le pronostic, ces métastases vont être une source de morbidité importante pour le patient : douleurs osseuses, fractures pathologiques, compressions médullaires et hypercalcémie.

Plusieurs techniques sont employées pour diagnostiquer les métastases osseuses. Par exemple, les radiographies permettent de mettre en évidence non seulement les surfaces de lyse des métastases ostéolytiques (habituellement présentes dans le cas des cancers du sein, du poumon et du rein), mais également la densification osseuse provoquée par les métastases ostéocondensantes (plus souvent rencontrées en cas de cancer de la prostate, mais parfois aussi du sein). Ensuite, d'autres explorations sont nécessaires à la confirmation du diagnostic de métastases : la scintigraphie osseuse, l'IRM et la recherche de marqueurs biologiques dans le sang (Ca^{2+} , PSA, Phosphatase Alcaline, NTX, CTX).

Différentes options de traitement sont alors disponibles, le choix se faisant entre autres selon l'extension de la maladie et l'âge du patient. Tout d'abord, il existe des traitements à visée locorégionale : (1) la chirurgie qui implique généralement l'extraction de la tumeur (chirurgie à visée décompressive dans le cas de compressions médullaires) et la stabilisation de l'os par ajout de matériau (ie, tiges, plaques, ciment) pour empêcher toute fracture, et, (2) la radiothérapie [externe ou interne, ou agents radiopharmaceutiques (par exemple, Strontium-89)] qui est utilisée pour alléger les douleurs et diminuer la prolifération des cellules tumorales métastatiques. Ensuite, il existe des traitements médicaux systémiques : (1) la chimiothérapie et l'hormonothérapie qui sont destinées à détruire les cellules cancéreuses dans le corps, et empêcher le rôle des hormones dans l'activation de la croissance tumorale

respectivement, et, (2) l'immunothérapie qui représente une nouvelle approche de traitement mais qui reste à quelques exceptions près du domaine de la recherche.

Malgré toutes les thérapeutiques, les traitements restent uniquement palliatifs pour permettre une réduction des douleurs et une reprise de l'activité. Or, 85% des hommes avec un cancer évolué de la prostate, 65 % des patients avec un cancer du poumon et environ 50 % des femmes avec un cancer du sein développeront des métastases osseuses dans l'évolution de leur maladie. Cela représente donc un problème de Santé Publique majeur qui nécessite continuellement de nouvelles approches thérapeutiques. Les approches actuelles sont basées sur la compréhension des mécanismes métastatique et visent préférentiellement à diminuer la résorption osseuse afin de freiner la progression des lésions osseuses.

Dans ce contexte, les bisphosphonates sont des agents anti-résorptifs puissants qui ont maintenant une place prépondérante en clinique dans le traitement des métastases osseuses. Ils limitent l'hypercalcémie, la progression des lyses osseuses et exercent un effet antalgique en association avec les autres traitements. Je présente ci-dessous l'état des connaissances sur cette classe de médicaments.

3.2. Les Bisphosphonates

3.2.1. Relation entre la structure et la fonction des Bisphosphonates

Les bisphosphonates (BPs) sont des agents pharmacologiques synthétiques utilisés en médecine depuis la fin des années 60, qui possèdent de puissantes propriétés anti-résorptives (Rogers et al., 2000). Ce sont des analogues du pyrophosphate inorganique (PPi), un régulateur endogène de la minéralisation osseuse, dont la structure de base est constituée de phosphate-oxygène-phosphate (P-O-P). Dans la structure des BPs, l'atome d'oxygène du pont phosphodiester a été remplacé par un atome de carbone dit central (ou géminale) sur lequel se substitue deux chaînes latérales R_1 et R_2 (Figure 16). La structure de base P-C-P des BPs, contrairement à la structure P-O-P des PPi, est très résistante aux hydrolyses enzymatiques et apporte aux BPs une forte stabilité sur le plan chimique (Rogers et al., 2000). Comme le PPi, la structure de base des BPs porte de nombreux atomes d'oxygène qui après ionisation sont capables de chélater des cations divalents tels que le calcium. Cette propriété confère aux BPs une très forte affinité pour l'hydroxyapatite du tissu osseux et permet ainsi leur accumulation dans l'os (Rogers et al., 2000).

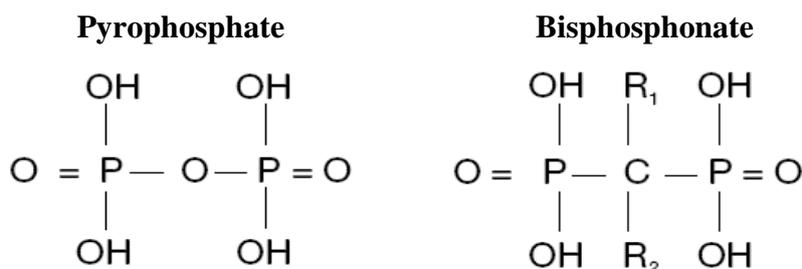


Figure 16. Représentation du pyrophosphate et d'un Bisphosphonate.

La chaîne latérale R_1 des premières générations de BPs est soit un atome d'hydrogène (H), comme pour le tiludronate, ou un atome de chlore (Cl) comme pour le clodronate. On parle dans ce cas de BPs « bidentates ». Dans les BPs plus récents, R_1 est un groupement hydroxyle (-OH) qui en chélatant le calcium permet d'augmenter l'affinité pour le minéral osseux. Il s'agit dans ce cas de BPs « tridentates ». La chaîne latérale R_2 est celle qui est responsable des propriétés pharmacologiques ; elle détermine le pouvoir anti-résorptif des BPs au site osseux. Des modifications de cette chaîne ont ainsi permis d'augmenter l'activité anti-ostéoclastique des BPs et ont conduit à l'élaboration de trois générations de BPs (Tableau 3).

Tableau 3. Puissance relative de différentes générations de BPs à inhiber la résorption osseuse.

	Agent	Chaîne R_1	Chaîne R_2	Puissance
1 ^{er} génération	Etidronate	-OH	-CH ₃	1
	Clodronate	-Cl	-Cl	10
	Tiludronate	-H	-S--Cl	10
2 ^{ème} génération	Pamidronate	-OH	-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	100
	Olpadronate	-OH	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	1000
	Alendronate	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	1000
	Ibandronate	-OH	-CH ₂ -CH ₂ N $\begin{cases} \text{CH}_3 \\ (\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3 \end{cases}$	5000
3 ^{ème} génération	Risedronate	-OH		5000
	Zoledronate	-OH		10000
	Minodronate	-OH		10000

Les BPs de première génération (par exemple, clodronate, étidronate) ont une structure proche du PPI (Pyrophosphate inorganique) avec des chaînes R_1 et R_2 simples (Tableau 3). Ils sont capables d'inhiber la résorption osseuse *in vivo* mais leur puissance reste assez faible. La puissance des BPs à inhiber la résorption osseuse a été estimée dans le modèle de Schenk: le traitement de jeunes rats avec des BPs induit, pendant la croissance, une ostéopétrose identique à la forme congénitale. La dose minimale efficace (LED, Lowest Effective Dose) de

chaque BP a été comparée à celle de l'étidronate qui est utilisé ici en tant que référence et pour lequel la LED a été fixée à 1 (Rogers et al., 1995). En utilisant ce type de stratégie pour comparer les BPs entre eux, on peut constater par exemple que le clodronate est 10 fois plus puissant que l'étidronate pour inhiber la résorption osseuse (Tableau 3).

L'ajout d'une fonction amine (-NH₂) à l'extrémité de la chaîne R₂ des BPs de deuxième génération (*i.e.*, pamidronate, alendronate) augmente la puissance relative de ces composés, allant de 100 à 2000 fois plus par rapport à l'étidronate.

Les BPs les plus récents, de troisième génération, possèdent en R₂ un ou 2 atomes d'azote n'appartenant non plus à une amine mais à un hétérocycle (risédronate, zolédronate). Ces BPs ont une puissance relative considérablement augmentée allant de 5000 à 10000 fois plus que l'étidronate.

3.2.2. Mécanismes d'action intracellulaire des BPs

En fonction de la présence ou non d'un atome d'azote en R₂ les BPs sont divisés en 2 catégories : les BPs non azotés (de première génération) et les BPs azotés ou amino-BPs (de deuxième et troisième génération). Ces deux catégories de molécules agissent selon des modes d'action cellulaire différents. Les BPs non azotés sont connus pour former des analogues non hydrolysables de l'ATP (Adénosine Triphosphate) cytotoxiques tandis que les BPs azotés agissent par l'intermédiaire de la voie du mévalonate.

3.2.2.1. Les BPs non azotés

Les BPs non azotés (étidronate, clodronate, tiludronate) sont des composés pouvant être métabolisés par les cellules. Il a été observé qu'ils sont convertis en analogues d'ATP non hydrolysables *in vitro* dans des cellules humaines et des macrophages murins J774 (Frith et al., 1997; Rogers et al., 1996) et *in vivo* dans des ostéoclastes de lapin (Frith et al., 1997).

Leur métabolisation est réalisée par les aminoacyl-tRNA synthases de classe II qui sont responsables de la traduction des protéines dans la cellule. Au cours de la traduction, les acides aminés sont tout d'abord condensés avec une molécule d'ATP (Appp) en un acide aminé adenylé (Aaaa) au cours d'une réaction réversible qui libère un PPi. Cette molécule est ensuite condensée avec un ARNt, ce qui libère une molécule d'AMP (Adénosine monophosphate). La première réaction étant réversible et les BPs étant structuralement

proches des PPI, les BP peuvent se condenser avec l'AMP au cours de la réaction inverse. La molécule nouvellement formée composée d'AMP et d'un BP représente un analogue d'ATP (AppCp) où la structure PCP du BP va empêcher tout clivage (Figure 17).

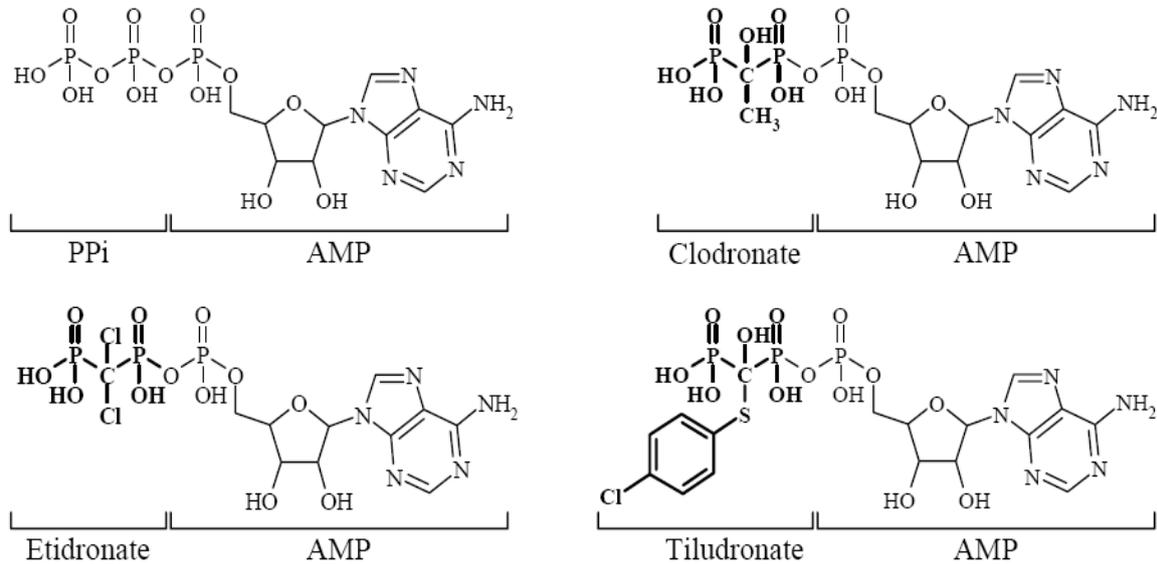


Figure 17. Formules chimiques de l'ATP et d'analogues non hydrolysables d'ATP formés à partir de clodronate, d'étidronate ou de tiludronate.

L'accumulation de ces analogues d'ATP non hydrolysables dans la cellule interfère avec le métabolisme de l'ATP normal et entraîne l'apoptose cellulaire. Ils inhibent l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) à la membrane interne des mitochondries, empêchant ainsi la synthèse d'ATP et provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire mitochondriale. L'hyperpolarisation qui s'en suit induit la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, et finalement l'initiation de la cascade apoptotique (Lehenkari et al., 2002). Une étude a montré que l'inhibition de l'activité résorptive des ostéoclastes par traitement avec l'étidronate et le clodronate peut être annulée avec des inhibiteurs de caspases (Halasy-Nagy et al., 2001). Cette observation a donc permis de confirmer que l'induction de l'apoptose est le mécanisme qui permet à ces BP d'inhiber l'activité ostéoclastique.

3.2.2.2. Les BPs azotés

3.2.2.2.1. Inhibition de la Farnésyle diphosphate synthase (FPP synthase)

Le mécanisme d'action des BPs azotés a d'abord été décrit grâce aux travaux d'Amin *et coll.* (1992). Ils ont montré que le pamidronate, l'alendronate et l'incadronate (YM175) inhibent *in vitro*, dans des cellules J774, et *in vivo*, dans le foie des rats, la synthèse du cholestérol qui est l'un des produits de la voie métabolique du mévalonate (Figure 18) (Amin et al., 1992). Ils ont expliqué ce phénomène par le fait que l'incadronate inhibe la squalène synthase, une enzyme permettant la transformation du farnésyle diphosphate (FPP) en squalène, un précurseur du cholestérol. Toutefois, le pamidronate et l'alendronate, bien qu'ils inhibent aussi la synthèse de cholestérol, sont de faibles inhibiteurs de cette enzyme. Ceci suggère que d'autres enzymes peuvent être inhibées (Amin et al., 1992).

La voie du mévalonate est également responsable de la prénylation des petites protéines G (Rho, Ras, Rac, Rab), une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de groupements FPP (Farnésyl diphosphate) ou GGPP (Géranylgéranyl diphosphate) (Figure 18). Des études supplémentaires ont permis de démontrer que l'inhibition de la voie du mévalonate par les BPs azotés se situe au niveau de cette prénylation. En effet, ces composés inhibent l'incorporation du mévalonate marqué au C¹⁴ dans les petites protéines G, un effet qui, de plus, corrèle avec l'induction de l'apoptose dans des macrophages J774 (Luckman et al., 1998). Cette apoptose peut être inhibée par l'ajout de farnésol (FOH) ou de géranylgéranol (GGOH) qui sont transformés dans la cellule en FPP et GGPP respectivement (Benford et al., 1999). Cette observation permettait de dire que l'enzyme ciblée par les BPs azotés se situait donc en amont du FPP.

Une autre étude a montré *in vitro* qu'un traitement avec un BP azoté induit une accumulation d'IPP (Isopentényle diphosphate) et de son isomère DMAPP (Diméthylallyle diphosphate) sans que les concentrations relatives de ces deux composés changent. Ces travaux suggéraient donc que l'IPP isomérase est toujours active et que la FPP synthase (Farnésyle PyroPhosphate synthase) est inhibée (Keller and Fliesler, 1999). C'est en séparant ces deux enzymes par chromatographie échangeuse d'ions et en utilisant une FPP synthase humaine recombinante que Bergstrom *et coll.* (2000) prouvèrent définitivement que les BPs azotés inhibent directement la FPP synthase, et non la IPP isomérase.

Par la suite, il a été mis en évidence qu'il existe une forte corrélation entre la capacité des BPs à inhiber la FPP synthase et leur pouvoir anti-résorptif (Dunford et al., 2001). De

plus, avec des doses de BPs qui inhibent la résorption et induisent l'apoptose, un inhibiteur de caspases (anti-apoptotique) maintient le nombre d'ostéoclastes sans empêcher l'inhibition de la résorption (Halasy-Nagy et al., 2001). Ces résultats montrent que l'inhibition de la résorption osseuse par les BPs azotés est donc due à une inhibition de la FPP synthase, indépendamment de leurs effets pro-apoptotiques observés à de fortes doses.

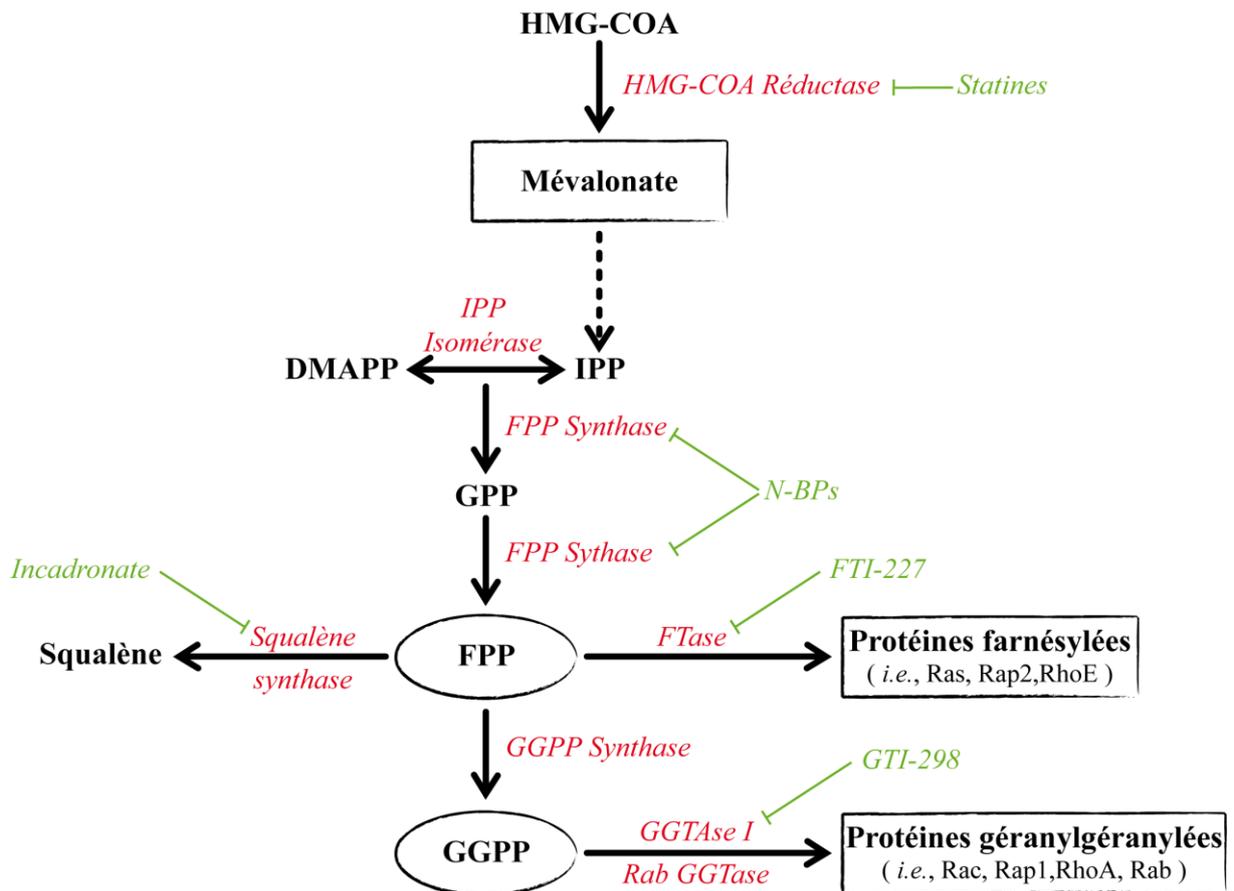


Figure 18. Représentation schématique de la voie du mévalonate.

La FPP synthase est responsable de deux réactions catalytiques dans la voie du mévalonate. Elle permet d'une part la condensation du DMAPP et de l'IPP en GPP (géranyle disphosphate) et d'autre part, la condensation du GPP et de l'IPP en FPP. Elle possède ainsi dans son site actif, deux sites de fixation pour les lipides isoprénoïdes : un site pour les GPP/DMAPP et un site pour l'IPP.

Les mécanismes exactes permettant aux BPs d'inhiber la FPP synthase commencent à devenir plus claires. La génération de structures cristallisées de l'enzyme associée avec des N-

BPs a montré que les BPs pourraient se lier au site actif au niveau du site de fixation de la GPP/DMAPP. La chaîne R_2 se positionnerait dans la poche hydrophobe et le groupe phosphonate P-C-P se lierait à des résidus lysines et un groupe de 3 ions Mg^{2+} . La liaison du BP serait alors suivie d'un changement de conformation de l'enzyme favorisant la liaison du second substrat, IPP, qui lui-même stabiliserait le complexe final ternaire. Des études récentes de modélisation de la FPP synthase ont suggéré qu'une seconde molécule de BP pourrait se lier dans la poche IPP, ce qui est supporté par l'analyse cinétique de l'enzyme montrant un mode d'inhibition en deux phases. Toutefois ces observations n'ont pas été confirmées dans les structures cristallisées (Coxon et al., 2006) .

Les petites GTPases sont des molécules de signalisation indispensables à la régulation de nombreux processus cellulaires comme l'organisation du cytosquelette d'actine, le trafic des vésicules intracellulaires et la survie (Coxon and Rogers, 2003; McTaggart, 2006). Les BPs, en empêchant la prénylation, bloquent l'ancrage de ces petites GTPases à la membrane cellulaire (Kloog and Cox, 2004). Par exemple, la perte de prénylation de Rho ou Rac peut bloquer la formation de la ceinture d'actine, une structure spécifique de l'ostéoclaste, alors que l'inhibition de prénylation de Rab bloque la formation de la bordure plissée (Coxon et al., 2001). Les ostéoclastes deviennent ainsi inactifs. Des études récentes ont montré que les BPs affecteraient l'activité des ostéoclastes en provoquant non pas une inhibition, mais plutôt une stimulation inappropriée des voies de signalisation régulées par les protéines GTPases (Coxon et al., 2006). Par ailleurs, étant apparu que les petites GTPases prénylées ont aussi un rôle central dans la progression de certains cancers (McTaggart, 2006), les inhibiteurs de prénylation (dont les BPs) sont envisagés en tant qu'outils thérapeutiques potentiels anti-cancéreux.

3.2.2.2. Synthèse d'un analogue d'ATP issu de l'IPP

Bien que les BPs azotés ne soient pas métabolisés comme les BPs non azotés en métabolites de type AppCp, il a été observé qu'ils peuvent induire la synthèse d'ApppI (un nouvel analogue d'ATP) (Figure 19), en conséquence de l'inhibition de la voie du mévalonate (Mönkkönen et al., 2006a). Comme les analogues d'ATP des BPs non azotés (Lehenkari et al., 2002), ApppI est capable d'induire l'apoptose en bloquant l'ANT dans les mitochondries (Mönkkönen et al., 2006a). Les auteurs suggèrent ainsi que certains BPs très efficaces (*i.e.*, zolédronate, risedronate) sont capables d'induire l'apoptose à la fois indirectement en inhibant

la prénylation des protéines, et directement *via* l'inhibition de l'ANT par ApppI. De plus, Mönkkönen *et coll.* (2006) ont montré que la quantité d'ApppI produite suite au traitement avec du zolédronate varie considérablement entre les lignées cellulaires cancéreuses. Ils suggèrent donc que l'efficacité d'un BP azoté contre les cellules tumorales peut varier en fonction de l'accumulation des composés pro-apoptotiques ApppI dans la cellule (Mönkkönen *et al.*, 2006b).

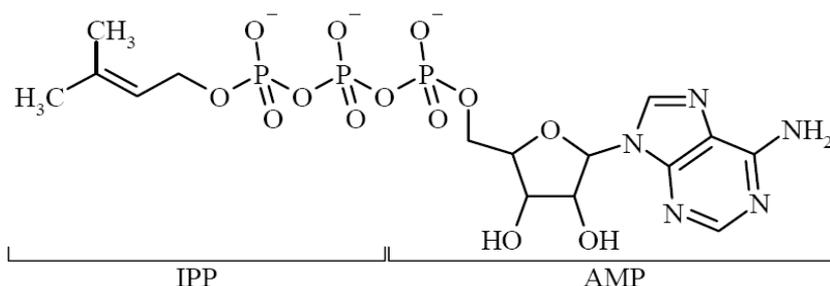


Figure 19. Formule chimique du métabolite ApppI issu de la condensation de l'AMP et de l'IPP.

3.2.3. Effets des BPs sur les cellules de l'os

3.2.3.1. Effets sur les ostéoclastes et précurseurs ostéoclastiques

Les BPs ne sont pas incorporés uniformément à la surface du minéral osseux. L'injection d'alendronate marqué radioactivement chez des rats montre qu'ils sont présents sur 70% des surfaces osseuses en cours de résorption contre seulement 2% des surfaces en cours de formation (Sato *et al.*, 1991). Les BPs se fixent donc préférentiellement sur des zones où se trouvent des ostéoclastes actifs. Il semble que l'acidification des lacunes de résorption permette alors la protonation des BPs et leur libération de la matrice (Coxon *et al.*, 2006). Il a été observé *in vitro* qu'ils peuvent ensuite être incorporés par les ostéoclastes par endocytose de phase fluide (c'est-à-dire non relayée par des récepteurs) (Thompson *et al.*, 2006). Ils seraient probablement absorbés sous forme de microprécipités avec le Ca^{2+} , puisque la chélation d'un BP avec l'EGTA empêche son incorporation et ses effets intracellulaires (Thompson *et al.*, 2006). En plus de permettre la libération des BPs de la matrice osseuse, l'activité de la pompe à protons vacuolaire ATPase-dépendante est essentielle à la libération des BPs dans le cytoplasme des ostéoclastes (Takami *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2006).

L'acidification dans les vésicules d'endocytose réduirait la charge négative des groupes phosphonates des BPs, ce qui favoriserait la dissociation du Ca^{2+} , et la diffusion ou le transport des BPs à travers la membrane vésiculaire (Thompson et al., 2006).

Une fois internalisés par les ostéoclastes, les BPs vont avoir différentes cibles intracellulaires conduisant à la réduction de leur activité : (1) ils empêchent la réorganisation du réseau d'actine nécessaire à l'attachement à la matrice osseuse (*via* $\alpha\text{v}\beta\text{3}$), la formation de la ceinture d'actine et de la bordure en brosse (Colucci et al., 1998; Coxon et al., 2001); (2) ils inhibent les processus requis pour la résorption comme l'acidification de la lacune ou la sécrétion de cathepsine K (David et al., 1996; Sato et al., 2000); (3) ils induisent un mécanisme pro-apoptotique qui serait dépendant de la caspase-3 dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* (Halasy-Nagy et al., 2001; Rogers et al., 2000).

Les effets des BPs sur le recrutement et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques sont plus controversés. Alors que certains travaux *in vitro* ont montré que les BPs n'ont pas d'effets sur le recrutement des ostéoclastes (Breuil et al., 1998), d'autres travaux *ex vivo* ou *in vitro* ont observé une inhibition de l'ostéoclastogénèse (Nishikawa et al., 1998; Van Beek et al., 2002). L'effet inhibiteur peut alors être direct (Van Beek et al., 2002) ou au contraire indirect, nécessitant la présence d'ostéoblastes ou de cellules stromales (Nishikawa et al., 1998). Toutefois, les travaux de Van Beek *et coll.* (1997) montrent que des cellules de moelle osseuse flushées à partir d'animaux traités avec des BPs sont toujours capables de former des ostéoclastes actifs *in vitro*. Les BPs n'auraient donc pas d'effets sur l'ostéoclastogénèse *in vivo* à des doses efficaces contre la résorption osseuse.

3.2.3.2. Effets sur les ostéoblastes

Des études ont montré que la co-culture d'ostéoclastes et d'ostéoblastes prétraités avec des BPs (clodronate et ibandronate) ou avec le milieu conditionné de ces derniers provoque une inhibition de l'activité de résorption sur lamelles d'os (Sahni et al., 1993). Ces résultats suggéraient que les BPs stimulent la sécrétion par les ostéoblastes d'un facteur soluble inhibiteur de la résorption osseuse ou, au contraire, inhibent la sécrétion d'un facteur stimulateur de celle-ci. D'autres études ont ensuite prouvé que ces deux hypothèses étaient vraies.

Il a été démontré d'une part que certains BPs (étidronate et alendronate) inhibent la sécrétion d'Il-6 et de prostaglandines par les cellules ostéoblastiques (Giuliani et al., 1998).

Or, en induisant une augmentation du rapport RANKL/OPG, ces deux facteurs peuvent stimuler l'ostéoclastogenèse. D'autre part, il a été observé que le zolédronate peut induire à une concentration de 5 μM la production d'OPG par des ostéoblastes issus d'explants humains (Pan et al., 2004a). De plus ce BP induit dans ces conditions une augmentation de sécrétion de la TACE (TNF- α Converting Enzyme ou ADAM17), une protéase qui peut dégrader RANKL exprimée à la surface des ostéoblastes (Pan et al., 2004a). Ainsi, en augmentant la synthèse d'OPG et en diminuant RANKL, le zolédronate peut induire une diminution du rapport RANKL/OPG, et donc de l'ostéoclastogenèse induite par les ostéoblastes.

De nombreux travaux *in vitro* et *ex vivo* ont ensuite suggéré que les BPs pourraient avoir un effet stimulateur de la différenciation ostéoblastique. En effet, il a été démontré que les BPs inhibent la prolifération d'ostéoblastes humains (Reinholz et al., 2000) et favorisent leur différenciation associée à une augmentation d'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique tels que le collagène de type 1 (Im et al., 2004; Reinholz et al., 2000; Viereck et al., 2002), l'ostéocalcine et la BMP-2 (Im et al., 2004; Pan et al., 2004b). Par ailleurs, les BPs peuvent induire une augmentation de la minéralisation par les ostéoblastes *in vitro* (Frediani et al., 2004; Pan et al., 2004b).

In vivo, les effets des BPs sur les ostéoblastes sont moins clairement établis. Une étude sur fémur de souris percé par un foret et traité avec du minodronate (YM529) pour stimuler la réparation a bien permis d'observer une augmentation locale de l'expression de BMP-2, d'ostéocalcine et de collagène de type 1 témoins d'une stimulation de la différenciation des ostéoblastes. Toutefois, le BP induit ensuite une inhibition des phases tardives de différenciation, se traduisant par un retard de la reconstruction de l'os cortical (Nagashima et al., 2005). Un tel effet pourrait être préjudiciable à la réparation de fractures chez les patientes traitées aux BPs. Une étude récente a par ailleurs montré qu'un traitement à l'alendronate de patientes ostéoporotiques réduit significativement le remodelage osseux en diminuant non seulement la résorption osseuse, mais aussi la formation osseuse (Odvina et al., 2005). Cet effet a pour conséquence de diminuer à terme la qualité de l'os et de provoquer la survenue de fractures spontanées dont la réparation est lente, voir absente (Odvina et al., 2005).

3.2.4. Effets anti-tumoraux des BPs

3.2.4.1. Effets anti-tumoraux *in vitro*

Les cellules métastatiques présentes au niveau de l'os étant également exposées aux BPs, plusieurs études ont été menées pour connaître les effets potentiels anti-tumoraux au cours des différentes étapes du développement des métastases : adhésion à la matrice osseuse, invasion et prolifération.

3.2.4.1.1. Effets sur l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales

Comme nous l'avons vu précédemment, une fois que les cellules tumorales sont extravasées, elles envahissent la matrice osseuse. Pour cela, elles adhèrent aux protéines de la matrice et procèdent à une dégradation péri-cellulaire de celle-ci par activation de protéases telles que les métalloprotéases.

Il a été observé que le pré-traitement de cellules tumorales d'origine mammaire (MDA-MB-231) et prostatique (PC-3) ou de lamelles d'os cortical avec des BPs azotés (ibandronate, alendronate et zolédronate) peut inhiber l'adhésion des cellules à l'os, et ceci de façon dose-dépendante (Boissier et al., 1997; van der Pluijm et al., 1996). La capacité relative de chacun de ces BPs à inhiber l'adhésion corrèle alors parfaitement avec leur puissance relative à inhiber la résorption osseuse *in vivo*. Les effets inhibiteurs des BPs sont obtenus à des concentrations beaucoup plus faibles (et compatibles avec les concentrations circulantes que l'on peut retrouver en clinique) lorsque les cellules tumorales sont pré-traitées (10^{-8} à 10^{-6} M) plutôt que lorsque ce sont les lamelles d'os (10^{-5} à 10^{-4} M). Ceci s'explique vraisemblablement par le fait que les BPs préadsorbés par le minéral osseux présentent une plus faible biodisponibilité que les BPs solubles.

Les BPs non azotés (*i.e.*, clodronate, étidronate) et les BPs azotés à faible activité sur la FPP synthase (*i.e.*, NE-58051) étant moins efficaces, il semble que l'inhibition de la voie du mévalonate soit à l'origine de l'inhibition de l'adhésion (Boissier et al., 1997). Une étude a montré que le zolédronate réduit l'adhésion de cellules tumorales de carcinome prostatique à la matrice osseuse minéralisée *via* une inhibition de la prénylation des protéines G, essentiellement au niveau de la géranylgeranylation (Coxon et al., 2004). Les petites protéines

G étant impliquées dans de nombreux processus cellulaires, il se peut qu'en inhibant leur prénylation, les BPs affectent l'expression de récepteurs de surface et de molécules impliqués dans l'adhésion des cellules à l'os. On sait par exemple que la petite protéine G Rap1 peut être à l'origine de l'activation des intégrines $\alpha L\beta 2$ et $\alpha 4\beta 1$ dans les cellules T (de Bruyn et al., 2002). Par ailleurs, un effet direct du zolédronate sur l'expression de molécules d'adhésion a pu être récemment observé dans des cellules stromales de la moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple (Corso et al., 2005). Le traitement de ces cellules avec du zolédronate provoque une diminution significative de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), CD49d (VLA-4 ou $\alpha 4\beta 1$) et CD40 (ou gp50). Or, du fait du rôle démontré des cellules stromales en tant que support de la prolifération et de la survie tumorale des cellules de myélome multiple, cet effet pourrait affecter la progression tumorale. De plus, les diminutions d'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 représentent un intérêt particulier car elles affectent la production locale d'Il-6 (Corso et al., 2005). Les BPs agiraient donc vraisemblablement par inhibition de la voie du mévalonate, conduisant à une inhibition de l'expression de molécules d'adhésion et/ou de l'activation des intégrines.

Plusieurs autres études ont permis de mettre en évidence que les BPs azotés (*i.e.*, ibandronate, alendronate, zolédronate) inhibent aussi l'invasion tumorale (Boissier et al., 2000; Virtanen et al., 2002), *via* une inhibition de la voie du mévalonate. En effet, l'addition de GGOH et de FOH peut annuler l'effet inhibiteur des BPs (Virtanen et al., 2002). Il a été observé dans des cellules de carcinome mammaire que le zolédronate empêche la translocation à la membrane de RhoA *via* une inhibition de la géranylgeranylation (Denoyelle et al., 2003). L'inactivation de RhoA induit alors une désorganisation du cytosquelette d'actine, et par conséquent une perturbation des processus de migration et d'invasion cellulaire (Denoyelle et al., 2003). D'autre part, le zolédronate peut inhiber la migration des cellules tumorales en diminuant l'expression de CXCR4, le récepteur de la chimiokine CXCL12 (Denoyelle et al., 2003). CXCL12 ayant un rôle important dans l'établissement des métastases osseuses, il se peut que cet effet du zolédronate puisse diminuer l'ostéotropisme tumorale. De plus, à de plus fortes concentrations (de l'ordre de 10^{-4} M), les BPs sont capables d'inhiber l'activité protéolytique de différentes MMPs par chélation de l'atome de zinc du site actif (Boissier et al., 2000). Montague *et coll.* (2004) ont montré que le zolédronate provoque une diminution de l'expression de MMP-7 dans des cellules de carcinome prostatique, alors que TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2) est augmentée. De même, Hashimoto *et coll.* (2005) ont observé *in vivo* que l'alendronate inhibe l'invasion de cellules

de cancer ovarien *via* l'inhibition de l'activité de MMP-2 (Hashimoto et al., 2005). Les BPs azotés inhiberaient donc aussi éventuellement l'activité des MMPs si de fortes concentrations locales de BPs sont biodisponibles dans le micro-environnement tumorale.

3.2.4.1.2. Effets sur la prolifération et la survie des cellules tumorales

Plusieurs études *in vitro* montrent que les BPs agissent sur la prolifération et la survie de diverses lignées cellulaires provenant de différents cancers, dont le myélome multiple (Shipman et al., 1998), le sein (Denoyelle et al., 2003), la prostate (Lee et al., 2001), le pancréas (Tassone et al., 2003) et l'ostéosarcome (Evdokiou et al., 2003). Les concentrations utilisées pour obtenir ces effets sont toutefois plus élevées (de l'ordre de 0.1 à 10 mM) que celles nécessaires pour obtenir des effets sur l'invasion ou l'adhésion. De façon générale, les BPs azotés sont aussi plus efficaces que les BPs non azotés.

Les mécanismes d'action pro-apoptotiques et/ou anti-prolifératifs peuvent être différents selon les BPs utilisés. Toutefois, le principal mécanisme semble se faire *via* l'inhibition de la voie du mévalonate puisque une fois encore le FOH (Fromigue et al., 2003; Senaratne et al., 2002; Tassone et al., 2003) et le GGOH (Coxon et al., 2004; Jagdev et al., 2001; Neville-Webbe et al., 2005) sont capables d'inhiber les effets des BPs.

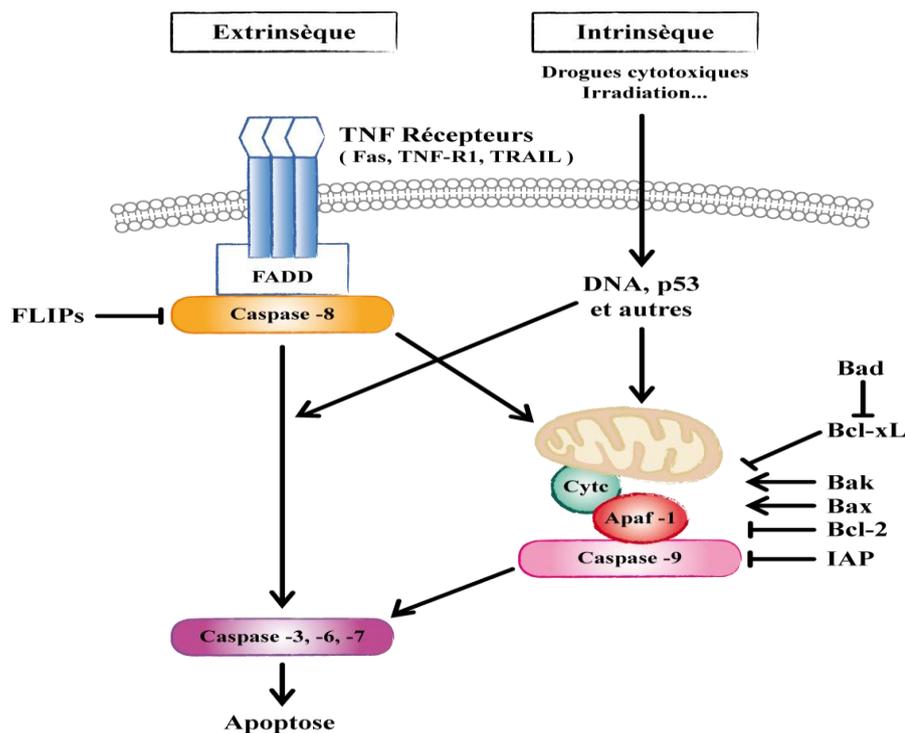


Figure 20. Les voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

La voie de signalisation intrinsèque implique une réception du signal faisant intervenir les membres de la famille de protéines régulatrices pro-apoptotiques telles que Bax, Bak et Bad ou anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X_L. La voie extrinsèque implique une réception du signal au niveau de la membrane plasmique par la famille des récepteurs TNF (*Tumor Necrosis Factor*) tels que Fas, TNF-R1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) ou TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). FADD (*Fas-Associated Death Domain*) assure ensuite la transmission du message par clivage de la caspase-8, conduisant à l'activation des caspases-3, 6 et 7. Les protéines anti-caspases IAP (inhibitors of apoptosis) et les inhibiteurs de FADD, FLIP (FADD-like ICE inhibitory protein) régulent négativement l'apoptose.

Les BP azotés tels que le zolédronate et le pamidronate inhibent la farnésylation de Ras, empêchant ainsi sa localisation membranaire dans des cellules de cancer du sein (Senaratne et al., 2002), de la prostate (Oades et al., 2003) ou du pancréas (Tassone et al., 2003). Ras étant inactivée, les acteurs situés en aval, Raf-1, ERK1 et -2, et Akt sont neutralisés (Tassone et al., 2003), ce qui conduit finalement à une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (Oades et al., 2003; Senaratne et al., 2002; Tassone et al., 2003), à la libération du cytochrome c mitochondrial (Senaratne et al., 2002) et l'induction de l'apoptose (Figure 20). Cette apoptose serait initiée par la cystéine protéase caspase-9, spécifique de la voie apoptotique mitochondriale (Tassone et al., 2003), et non par la caspase-8 de la voie des récepteurs à domaine de mort (Fromigue et al., 2003) (Figure 21). Les caspases-6 (Fromigue et al., 2003; Tassone et al., 2003) et -7 (Tassone et al., 2003) sont également bien activées au cours de cette apoptose. Toutefois, de façon surprenante la caspase-3 n'est pas impliquée au

cours de ce processus. En effet, un inhibiteur spécifique de la caspase-3 n'inhibe pas l'apoptose dans les cellules de carcinome pancréatique (Tassone et al., 2003). De plus, l'apoptose des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 se produit en l'absence d'une activation de la pro-caspase-3 (Senaratne et al., 2002).

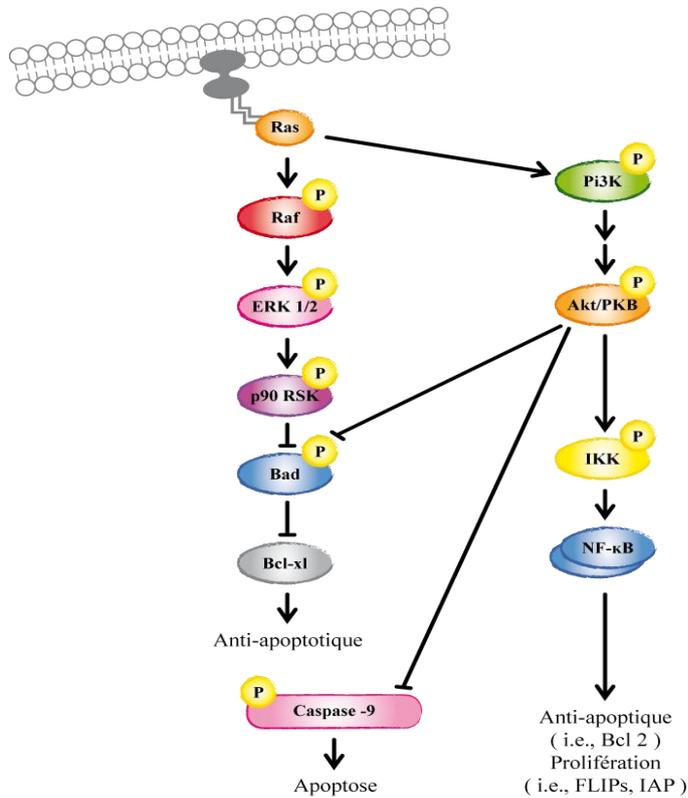


Figure 21. Représentation des voies de signalisations impliquées dans l'effet anti-apoptotique de la protéine Ras.

La protéine Ras activée située à la membrane plasmique induit la phosphorylation de PI3K ce qui conduit à l'activation des protéines Akt/PKB. La voie Akt prévient alors l'apoptose en phosphorylant les protéines pro-apoptotiques Bad et Caspase-9, et active indirectement NFκB (Nuclear Factor κB) qui après translocation au noyau active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (*i.e.*, FLIPs, IAP, Bcl-2). Ras peut aussi empêcher l'activation de Bad *via* la voie Ras/ERK et la protéine p90RSK.

Des petites protéines G autres que Ras seraient affectées par le traitement aux BPs. Il a été montré récemment que le minodronate peut agir sur la voie du mévalonate *via* une inhibition de prénylation de Ras, mais aussi en inhibant la géranylgeranylation de Rap1A, réduisant ainsi la prolifération de différentes lignées cellulaires de cancer de la vessie et induisant leur apoptose *in vitro* (Sato et al., 2006). Par ailleurs, il a été observé que la protéine Rab25 est surexprimée dans les cancers du sein, de la prostate et des ovaires (Cheng et al., 2004). La surexpression de Rab25 dans des cellules de cancer du sein augmente leur prolifération et leur survie en activant la voie Akt et en diminuant les niveaux de Bax et Bak, deux protéines pro-apoptotiques qui interviennent avec Bcl-2 (Cheng et al., 2004). Il est donc possible qu'en inhibant la prénylation de Rab25, les BPs provoquent des réactions cellulaires identiques à celles observées avec Ras. De plus, les protéines RhoA et Rac-1 interviennent dans l'organisation du cytosquelette dont l'intégrité est essentielle pour protéger les cellules de l'anoïkis, une apoptose cellulaire particulière induite par la perte d'interaction des

intégrines avec leur ligand. Or, il a été observé que le traitement de cellules d'ostéosarcome avec du zolédronate provoque une telle apoptose, suggérant une altération des voies de signalisation induites par RhoA et Rac-1 (Evdokiou et al., 2003).

Il semblerait que les effets anti-prolifératifs des BPs ne soient pas uniquement dus à une induction de l'apoptose, mais aussi à des perturbations du cycle cellulaire. Ainsi, l'analyse du cycle cellulaire de cellules de carcinome prostatique (Lee et al., 2003) ou d'ostéosarcome montre que le zolédronate induit un blocage des cellules en phase S et le pamidronate un blocage en phase G₀/G₁. D'autres BPs tels que l'incadronate, le minodronate, l'alendronate et le risédronate peuvent aussi induire un arrêt du cycle cellulaire en phase S, suivi d'une apoptose *via* l'inhibition de la voie du mévalonate.

Il a été récemment observé que l'apomine, un nouvel analogue des BPs, pourrait aussi avoir des effets pro-apoptotiques indépendamment d'un effet sur la voie du mévalonate. Le traitement de cellules de cancer du sein avec l'apomine provoque une inhibition de leur prolifération par activation de la MAP Kinase p38 et des caspase-3 ou -7, sans affecter la localisation de Ras à la membrane (Lowe et al., 2005). En accord avec ces résultats, il a été montré que l'apomine peut induire la mort de cellules humaines de mélanome sans altérer la farnésylation de Ras (Pourpak et al., 2007). Les auteurs de ce travail proposent un nouveau mécanisme indépendant de l'apoptose, et donc des caspases, dans lequel la mort cellulaire serait induite par une action cytolytique régulée à la membrane plasmique.

3.2.4.2. Effets anti-tumoraux *in vivo*

Du fait de l'efficacité anti-tumorale des BPs *in vitro*, de nombreuses études ont été réalisées chez les animaux pour évaluer leur activité anti-métastatique et anti-tumorale *in vivo* (Clézardin et al., 2005; Stresing et al., 2007).

3.2.4.2.1. Effets dans les modèles animaux de métastases osseuses

De nombreuses études montrent que les bisphosphonates sont efficaces dans le traitement des métastases osseuses induites par différentes lignées humaines de myélome multiple, de cancers du sein, de la prostate, ou des poumons, et par les neuroblastomes (Tableau 4).

L'analyse histomorphométrique des métastases osseuses après traitement des animaux aux bisphosphonates montre une importante diminution du nombre d'ostéoclastes au voisinage des métastases osseuses et la présence d'ostéoclastes apoptotiques, indiquant donc que cette inhibition de la formation des métastases osseuses est la conséquence d'une inhibition de la résorption osseuse par les bisphosphonates. Toutefois, on peut observer que cette inhibition de la résorption osseuse s'accompagne d'une réduction significative de la masse tumorale présente au site métastatique (Hiraga et al., 2001; Peyruchaud et al., 2001; Sasaki et al., 1995). Cette activité anti-tumorale a alors été attribuée à la capacité des BPs à inhiber les ostéoclastes, et donc à réduire la libération de facteurs de croissance (à activité mitogène et/ou chimiotactique) de la matrice osseuse résorbée qui sont nécessaires au développement tumoral (Brown et al., 2004; Mundy et al., 2001). Les patients atteints de métastases ostéocondensantes présentant une élévation de marqueurs de la destruction osseuse (CTX urinaires et CTX sérique) en plus d'une élévation des marqueurs de la formation (phosphatase alcaline, propeptide C-terminal du collagène 1) (Garnero et al., 2000), il a été supposé que ce type de métastases est précédé d'une phase ostéolytique. Ainsi, en induisant une diminution du nombre d'ostéoclastes, le zolédronate et le minodronate sont aussi capables d'affecter le développement des métastases ostéocondensantes (Corey et al., 2003; Miwa et al., 2005). Par ailleurs, une étude sur 5 patients ayant un cancer de la prostate avec des métastases osseuses montre qu'une perfusion de 4 mg de zolédronate diminue de 22 à 53% les taux circulants de PSA ; cette diminution du développement tumoral est probablement la conséquence d'une inhibition de la résorption osseuse (Santini et al., 2003a; Santini et al., 2003b).

Toutefois, ces observations n'excluent pas la possibilité que les BPs agissent aussi directement sur les cellules tumorales au site osseux une fois qu'ils sont libérés de la matrice osseuse, puisque comme nous l'avons vu, ils ont la capacité d'inhiber la prolifération, l'invasion et la survie des cellules tumorales *in vitro*.

Tableau 4. Etudes de différents BPs dans des modèles murins de métastases osseuses.

Type de cancer	Références	BP testé	Traitement	Dose
Sein	Hall <i>et al.</i> , 1994 Sasaki <i>et al.</i> , 1995 Yoneda <i>et al.</i> , 1997 Sasaki <i>et al.</i> , 1998 Hiraga <i>et al.</i> , 2001 Peyruchaud <i>et al.</i> , 2001 Michigami <i>et al.</i> , 2002 Neudert <i>et al.</i> , 2003 Amhlaoihb <i>et al.</i> , 2004 Hiraga <i>et al.</i> , 2004 Daubiné <i>et al.</i> , 2007 Daubiné <i>et al.</i> , 2007	Risédrionate Risédronate Ibandronate YH529 Ibandronate Zolédronate Ibandronate Ibandronate Ibandronate Zolédronate Zolédronate Clodronate	Prév. Prév. - Pall. Prév. - Pall. Prév. - Pall. Pall. Pall. Prév. - Pall. Prév. - Pall. Prév. Pall. Prév. - Pall. Prév. - Pall.	150 µg/kg, s.c. 20 à 2000 µg/kg/j, s.c. 200 µg/kg/j, s.c. 10 à 1000 µg/kg/j, s.c. 200 µg/kg/j, s.c. 150 µg/kg, s.c. 200 µg/kg/j, s.c. 50 µg/kg/j, s.c. 200 µg/kg/j, s.c. 100 à 1000 µg/kg/22j, i.v. 100 µg/kg total /j ou /sem ou /mois, s.c. 530 µg/kg/j, s.c.
Prostate	Stearns <i>et al.</i> , 1996 Corey <i>et al.</i> , 2003 Miwa <i>et al.</i> , 2005	Alendronate Zolédronate Minodronate	Prév. Prév. - Pall. Pall.	80 à 200 µg/kg/sem, s.c. 500 µg/kg/sem, s.c. 0,1 ou 0,3 mg/kg/sem, i.p.
Poumon	Yano <i>et al.</i> , 2003 Zhang <i>et al.</i> , 2003	Minodronate Minodronate	Pall. Prév.	10 µg/kg/5 sem, i.v. 0,1 µg/kg une fois, i.v.
Neuroblastome	Sohara <i>et al.</i> , 2003	Ibandronate	Prév. - Pall.	200 µg/kg/j, s.c.
Myélome Multiple	Cruz <i>et al.</i> , 2001 Croucher <i>et al.</i> , 2003	Ibandronate Zolédronate	Prév. - Pall. Prév. - Pall.	160 µg/kg/j, s.c. 120 µg/kg/2x par sem, s.c.

^a Prév.: traitement préventif, Pall.: traitement palliatif.

^b Les doses utilisées sont exprimées en µg ou mg/kg, en estimant le poids moyen des souris à 20g.

3.2.4.2.2. Effets dans les modèles animaux de tumorigenèse et de métastases dans les tissus mous

De nombreuses autres études expérimentales *in vivo* ont été réalisées afin de juger de l'activité anti-tumorale des BPs dans les tissus non minéralisés (Tableau 5) (Stresing et al., 2007).

Le risédronate, l'alendronate, l'ibandronate, et le zolédronate n'inhibent pas la croissance tumorale lorsque les cellules humaines de carcinome mammaire ou prostatique sont injectées en sous-cutané ou en orthotopique chez des animaux immunodéficients (Clézardin et al., 2003; Corey et al., 2003; Green, 2003). Le zolédronate ou l'ibandronate n'inhibent pas non plus la croissance des tumeurs mammaires dans le modèle orthotopique syngénique 4T1/luc (Hiraga et al., 2004; Michigami et al., 2002). Par ailleurs, le traitement

avec des BPs ne semble pas non plus diminuer le développement des métastases viscérales. Par exemple, l'ibandronate n'inhibe pas la formation des métastases pulmonaires induites par les cellules de carcinome mammaire 4T1 alors que dans les mêmes conditions expérimentales, la formation des métastases osseuses est inhibée (Hiraga et al., 2001). De plus, dans un modèle de métastases multiples, après injection i.v. de cellules de cancer de la prostate PC-3 ML, un prétraitement à l'alendronate avant l'injection des cellules induit une diminution de la formation des métastases osseuses alors qu'il y a une augmentation des métastases dans le péritoine et autres tissus mous (Stearns and Wang, 1996). L'absence d'efficacité anti-tumorale aux sites non osseux pourrait s'expliquer par la faible biodisponibilité de ces agents pharmacologiques au niveau des tissus non minéralisés, suite à leur accumulation rapide dans l'os. On observe ainsi chez les patients qu'après une administration de 4 mg de zolédronate (perfusion de 15 min), la concentration maximale plasmatique atteinte à la fin de la perfusion s'élève à environ 1 μM , puis diminue très rapidement. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, *in vitro* cette concentration est compatible avec un effet sur l'adhésion ou l'invasion cependant, elle ne l'est pas avec un effet sur la prolifération ou la survie.

Toutefois, certaines études montrent au contraire que les BPs peuvent être efficaces dans le traitement des tumeurs ou des métastases dans des organes non calcifiés. Par exemple, Giraudo *et coll.* (2004) ont observé dans un modèle de souris transgénique de cancer du col de l'utérus que le zolédronate (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$, s.c., pendant 6 semaines) réduit la progression des tumeurs, du fait d'une inhibition de l'angiogenèse tumorale. Cet effet serait dû à une diminution de la sécrétion et de l'activation de MMP-9 par le zolédronate au niveau des infiltrations macrophagiques (Giraudo et al., 2004). La MMP-9 libère le VEGF de la matrice extracellulaire et le zolédronate bloque donc la mobilisation de ce facteur pro-angiogénique. Il s'ensuit une augmentation de l'apoptose dans les cellules endothéliales au niveau des lésions tumorales, et dans les cellules tumorales (Giraudo et al., 2004). De même, le minodronate (5 $\mu\text{g}/\text{souris}/\text{jour}/\text{i.p.}$, pendant 40 jours) inhibe la tumorigenèse sous-cutanée de cellules de mélanome G361 chez la souris, en inhibant l'angiogenèse tumorale et l'infiltration des macrophages (Yamagishi et al., 2004). Par ailleurs, dans le modèle syngénique 4T1, l'injection répétée de fortes doses de zolédronate (25 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 ou 5 fois, en i.v.) réduit la formation des métastases spontanées dans les organes viscéraux (poumons et foie) et prolongent la survie des animaux (Hiraga et al., 2004). Au contraire, ces métastases aux poumons et au foie ne sont pas affectées quand une seule injection de zolédronate est utilisée. Ces observations suggèrent qu'un traitement plus fréquent est probablement nécessaire pour obtenir un effet anti-tumoral avec les BPs.

Tableau 5. Effets des BPs dans les modèles animaux de tumorigénèse et de formation des métastases dans les tissus non minéralisés.

N-BPs et tumeurs				
Tumeur	N-BP (doses) ^a	Effets	Références	
Cancer du sein (cellules MDA-MB-231)	Ris (0.4, 4, +40 µg/j., s.c.) (Prév. - Pall)	Inhibition des métastases osseuses et de la masse tumorale dans l'os, pas d'effet sur la tumeur mammaire	Sasaki <i>et al.</i> , 1995	
Cancer du sein (cellules MDA-MB-231)	Iba (4 µg/j., s.c.)	Inhibition des métastases osseuses et de la masse tumorale dans l'os, pas d'effet sur la tumeur mammaire	Hiraga <i>et al.</i> , 2001	
Cancer du col de l'utérus (souris transgéniques K14-HPV16)	Zol (2 µg/j., s.c.)	Inhibition de la croissance tumorale et de la progression tumorale	Giraud <i>et al.</i> , 2004	
Cancer du poumon à "petites cellules" (cellules SBC-3)	Zol (1.6 µg i.v., 3x/sem.)	Inhibition de la croissance tumorale	Matsumoto <i>et al.</i> , 2005	
Mélanome (cellules G361)	Min (5 µg/j., i.p.)	Inhibition de la croissance tumorale	Yamagishi <i>et al.</i> , 2004	
Cancer de la vessie (cellules UM-UC-3)	Min (ca. 1 ou 3.4 µg, transurétrale)	Inhibition de la croissance tumorale	Sato <i>et al.</i> , 2006	
Carcinome hépatocellulaire (cellules PLC/PRF/5)	Pam (20 µg/j., i.p.)	Inhibition de la croissance tumorale	Wada <i>et al.</i> , 2006	
Mésothélium (AB12 et AC29)	Zol (10 µg i.p., 3x/sem.) ou Ris (300 µg i.p. tous les 6 jours)	Inhibition de la croissance tumorale; augmentation de la survie	Wakchoure <i>et al.</i> , 2006	
Cancer du sein modèle orthotopique (cellules 4T1)	Zol (0.5 ou 5 µg, 1 ou 5x, i.v.)	Inhibition des métastases osseuses, pas d'effet sur la tumeur mammaire	Hiraga <i>et al.</i> , 2004	
Cancer du sein modèle orthotopique (cellules 4T1)	Iba (4 µg/j., s.c.)	Inhibition des métastases osseuses, pas d'effet sur la tumeur mammaire	Michigami <i>et al.</i> , 2002	
N-BPs et métastases				
Tumeur primaire	Métastase	N-BP (doses) ^a	Effets	Références
Cancer du poumon à "petites cellules", modèle systémique (cellules SBC-5, i.v.)	Ganglion lymphatique, poumon, foie, rein, os	Min (2µg 1 fois, i.v.)	Réduction des métastases osseuses seulement, pas d'effet sur les métastases viscérales	Zhang <i>et al.</i> , 2003
Cancer de la vessie, modèle systémique ou orthotopique (cellules UM-UC-3, i.c./injection dans la vessie)	Os, viscères	Min (1.6 µg/sem., s.c.) Min (ca. 1 ou 3.4 µg, 5x transurétrale)	Réduction de la croissance tumorale dans la vessie et les métastases osseuses, réduction des métastases viscérales (pas significatif)	Sato <i>et al.</i> , 2006
Cancer du sein (cellules 4T1) modèle orthotopique	Os, poumon	Iba (4 µg/j., s.c.)	Réduction des métastases osseuses seulement, pas d'effet sur les métastases viscérales	Michigami <i>et al.</i> , 2002
Cancer du sein, modèle systémique (cellules MDA-231AD, i.c.)	Os, glandes surrénales	Iba (4 µg/j., s.c.)	Réduction des métastases osseuses, augmentation des métastases dans les glandes surrénales ^b	Michigami <i>et al.</i> , 2002
Ostéosarcome, modèle systémique (cellules POS1, i.v.)	Poumon	Zol (2 µg 5x/sem., 2 µg ou 20 µg 2x/sem.)	Réduction des métastases pulmonaires, augmentation de la survie	Gouin <i>et al.</i> , 2006
Cancer du sein, modèle orthotopique (cellules 4T1)	Os, poumon, foie	Zol (0.5 ou 5 µg, 1 ou 5x, i.v.)	Réduction des métastases osseuses, réduction des métastases pulmonaires ^c	Hiraga <i>et al.</i> , 2004
Cancer de la prostate (cellules PC-3 ML, i.v.)	Os, péritoine, autres tissus mous	Alen (0.8-2 µg s.c., 2x/sem.) ou (2 µg s.c., 1x/sem.)	Inhibition des métastases osseuses, augmentation des métastases dans le péritoine et autres tissus mous	Stearns <i>et al.</i> , 1996

Abréviations:

Iba, ibandronate ; Alen, Alendronate ; Min, minodronate ; Pam, pamidronate ; Ris, risédronate ; Zol, zolédronate.

^a toutes les doses sont calculées par souris, en estimant le poids moyen des souris à 20g.

^b uniquement en protocole préventif

^c uniquement en dosage fréquent

Tous ces résultats montrent que l'activité anti-tumorale varie énormément en fonction du type de tumeur, du BP utilisé et des régimes d'administration utilisés. De plus, il semblerait qu'une administration plus fréquente des BPs permette une exposition plus longue des tissus mous à ces drogues, palliant ainsi aux faibles concentrations circulantes, et permettant un effet direct sur les cellules tumorales.

3.2.4.3. Conclusion, perspectives

Les études précliniques montrent clairement que les BPs ont la capacité d'inhiber la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Clézardin et al., 2005). Cependant, se pose toujours la question de savoir si les effets observés *in vivo* sont dus à une action directe des BPs sur les cellules tumorales, ou plutôt à des effets indirects *via* l'inhibition de la résorption osseuse, voire *via* des effets anti-angiogéniques ou immuno-modulateurs (Coxon et al., 2006; Stresing et al., 2007). Il est toutefois important de noter qu'une limitation majeure des modèles animaux utilisés réside dans le fait que les doses de BPs administrées sont bien plus élevées que les dosages utilisés en clinique pour le traitement des métastases osseuses chez les patients. Par exemple, Giraud et coll. (2004) ont traité leurs animaux avec des doses quotidiennes de zolédronate équivalentes à 6 mg/jour alors qu'en clinique la dose de zolédronate utilisée est de 4 mg/mois, excédant ainsi largement la dose cumulative recommandée en clinique. La pertinence clinique de ces études est donc discutable. Le fait que le renouvellement osseux se fasse cinq fois plus vite chez la souris justifie en effet un dosage plus fort de BPs pour mimer les situations cliniques. Cependant, la plupart des modèles animaux utilisent des doses encore plus fortes allant jusqu'à atteindre des concentrations 40 fois plus élevées que celles couramment utilisées en clinique. De plus, l'utilisation des BPs dans les études cliniques n'a montré jusqu'à présent aucun effet anti-tumoral convaincant (Brown et al., 2004; Hillner et al., 2000). D'ailleurs nous avons montré qu'un traitement des animaux ayant des métastases osseuses de cancer du sein avec une seule dose de zolédronate (100µg/kg; dose calculée pour être équivalente à la dose de 4mg donnée aux patients) inhibe la destruction de l'os, mais n'inhibe pas la masse tumorale (Daubiné et al., 2007). Par contre, si le zolédronate est administré aux animaux plus fréquemment (quotidien ou hebdomadaire) avec des doses plus faibles (7µg/kg/jour ou 50µg/kg/semaine), sachant que la dose totale cumulée reste la même (c'est-à-dire 100µg/kg), ce BP inhibe alors non seulement l'ostéolyse mais également la masse tumorale (Daubiné et al., 2007). Des

résultats similaires furent obtenus par Gao *et coll.* (2005). Ces auteurs ont montré qu'une faible dose de zolédronate administrée chaque semaine (30µg/kg) inhibe non seulement la formation des lésions ostéolytiques dans des souris transgéniques qui développent des leucémies/lymphomes, mais aussi la formation de tumeurs dans les tissus mous. Ces résultats permettent donc de penser que l'administration fréquente de faibles doses de BPs serait une thérapie efficace pour minimiser le développement des métastases osseuses chez les patients.

PARTIE III.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. OBJECTIF DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Comme nous l'avons vu, les BPs sont des agents pharmacologiques ayant une forte affinité pour le minéral osseux qui inhibent l'activité de résorption des ostéoclastes. C'est pourquoi ils représentent actuellement un outil thérapeutique de choix dans le traitement des complications liées à l'ostéolyse maligne (Clézardin et al., 2005). Toutefois, ce traitement ne fait que ralentir la progression des lésions osseuses; il n'a pas d'effet anti-tumoral et n'améliore pas la survie des patients. Nos études précliniques montrent également que dans des conditions équivalentes à celles utilisées en clinique (doses et fréquence d'administration), ces agents n'ont pas d'effets anti-tumoraux alors qu'ils inhibent l'ostéolyse. Par contre, nous avons montré très récemment qu'il serait possible d'améliorer le traitement simplement en utilisant des doses plus faibles avec une plus grande fréquence d'administration, les doses cumulatives totales restant équivalentes (Daubiné et al., 2007). Nous obtenons en effet dans ce cas une inhibition non seulement de l'ostéolyse mais également de la masse tumorale chez l'animal (Daubiné et al., 2007). Ayant participé à cette étude, j'ai joint la publication dans la partie annexe de cette thèse. Toutefois, celle-ci ne faisant pas directement l'objet de ma thèse, elle ne sera pas plus détaillée.

Il a été observé durant ces dernières années que le traitement à long terme des patients métastatiques avec un BP est associé à un risque de complications particulières (ostéonécrose de la mâchoire) qui nécessitent d'interrompre ce traitement (Bamias et al., 2005; Migliorati, 2003; Ruggiero et al., 2004; Sanna et al., 2006; Sanna et al., 2005). Or, alors que de tels effets secondaires sont inquiétants, un autre souci vient du fait que la demi-vie d'un BP dans l'os est de plus de 10 ans (Khan et al., 1997). Ainsi, si certains effets secondaires apparaissent, l'interruption du traitement ne suffit pas à modifier l'évolution immédiate des lésions. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques qui, seules ou en association avec des BPs, pourraient permettre d'obtenir un effet anti-tumoral, d'améliorer la survie des patients et/ou d'éviter la survenue de complications liées aux traitements conventionnels.

De plus, il est connu que l'utilisation d'une monothérapie en oncologie est généralement décevante car après une réponse initiale, la tumeur résiduelle devient le plus souvent résistante au traitement, exposant ainsi le patient à un risque élevé de rechute. En revanche, l'association d'agents pharmacologiques ciblant différentes voies de signalisation dans la cellule tumorale et/ou différents compartiments cellulaires dans une métastase (par exemple, tumeur, stroma et vaisseaux sanguins) pourrait limiter ces problèmes d'échappement

au traitement (Dancey and Chen, 2006). Par ailleurs, des synergies d'action peuvent en plus avoir lieu entre médicaments, permettant alors de diminuer les doses et, donc, les effets indésirables potentiels (Dancey and Chen, 2006).

L'objectif de cette thèse a ainsi été d'étudier le bénéfice d'une polythérapie ciblée sur les ostéoclastes dans le traitement des métastases osseuses par rapport à la monothérapie conventionnelle (BP). L'efficacité d'un BP, le zolédronate, seul ou en association avec un inhibiteur de la cathepsine K (CKI) et/ou un inhibiteur de tyrosine kinases (imatinib mesylate) a été étudiée sur la formation et la progression des métastases osseuses du cancer du sein chez des animaux.

2. ETUDE PRECLINIQUE DE L'EFFET D'UN INHIBITEUR DE LA CATHEPSINE K SUR LES METASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN

2.1. Introduction

Au site des métastases ostéolytiques associées à un cancer du sein, les cellules tumorales sécrètent des molécules telles que la PTHrP, des interleukines (IL-6, IL-8 et IL-11), et des prostaglandines qui stimulent l'activité des ostéoclastes et induisent ainsi une ostéolyse (Bendre et al., 2002; Boucharaba et al., 2004; Hiraga et al., 2006; Kang et al., 2003; Mundy, 2002). En retour, la résorption osseuse conduit à la libération de facteurs de la matrice osseuse (TGF- β , IGF I) qui stimulent la prolifération des cellules métastatiques, et donc de la PTHrP, des interleukines et prostaglandines. Il s'en suit ainsi la mise en place d'un cercle vicieux dans lequel prolifération tumorale et résorption osseuse s'entretiennent mutuellement.

Les approches thérapeutiques actuelles visent préférentiellement à diminuer la résorption osseuse. Celle-ci est assurée par les ostéoclastes qui, lorsqu'ils sont actifs, sécrètent des protons et la cystéine protéase cathepsine K. Les protons dissolvent alors le minéral osseux et fournissent un microenvironnement acide permettant la dégradation du collagène par la cathepsine K (Baron, 2001; Teitelbaum, 2000). Dans le cadre de la recherche de nouvelles thérapeutiques pour pallier aux limitations associées aux traitements avec les BPs, les inhibiteurs de cathepsine K pourraient être une alternative. De tels inhibiteurs sont déjà utilisés en clinique pour limiter l'ostéolyse associée à l'ostéoporose (Grabowskal et al., 2005) et l'une des études cliniques a montré qu'ils présentent un avantage par rapport aux BPs. En effet, il a été observé chez des patientes ostéoporotiques qu'ils inhibent la perte osseuse, mais sans empêcher la formation d'os nouveau. Cet effet permettrait d'augmenter la quantité d'os plutôt que de la stabiliser, et en permettant à la formation osseuse de continuer, améliorerait la qualité de l'os (Grabowskal et al., 2005). De plus, il a été observé que la cathepsine K est exprimée par les cellules tumorales de cancer du sein aux sites de métastases osseuses (Littlewood-Evans et al., 1997), suggérant que les inhibiteurs de cathepsine K pourraient non seulement cibler les ostéoclastes mais également les cellules tumorales.

Compte tenu de ces observations, nous avons examiné si la cathepsine K est exprimée par les cellules tumorales de patientes atteintes de cancer du sein et par les lignées de cellules de cancer du sein utilisées dans nos modèles animaux. Nous avons ensuite testé *in vivo* les effets d'un inhibiteur de cathepsine K (CKI) sur la formation et le développement des

métastases osseuses, ainsi que sur le développement tumoral en contexte non osseux. Pour cela, nous avons utilisé trois modèles animaux :

- un modèle de métastases osseuses de cancer du sein (cellules B02)
- un modèle de tumorigenèse intra-osseux (cellules BT474)
- un modèle de tumorigenèse sous-cutanée (cellules B02)

2.2. Article (Le Gall et al., 2007)

2.3. Résultats complémentaires non publiés

2.3.1. Matériels et méthodes

2.3.1.1. Drogue

Le CKI a été préparé comme décrit précédemment dans l'article (Le Gall et al., 2007). La structure du composé CKI le plus documenté de chez Novartis est représentée figure 22 (Grabowski et al., 2005). Ce composé fait parti des inhibiteurs de cathepsine K à groupement nitrile (-CN). En revanche, la structure de l'inhibiteur utilisé dans cette étude, l'AFG-495, n'a pas encore été communiquée publiquement.

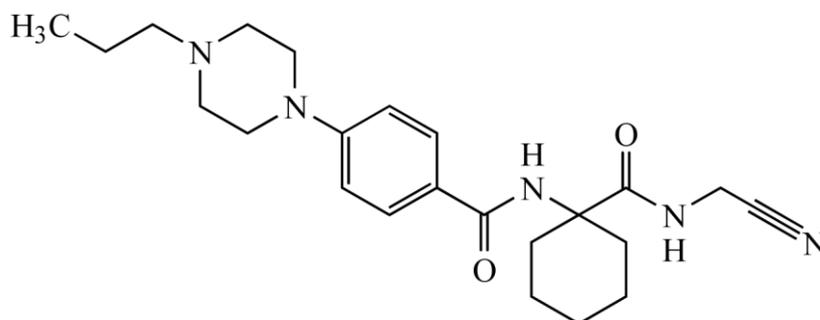


Figure 22. Structure d'un inhibiteur de cathepsine K (AAE-581).

2.3.1.2. Lignées et culture cellulaire

Les lignées humaines de carcinome mammaire B02 et BT474 ont été cultivées comme décrit précédemment. Les cellules macrophagiques murines RAW-246.7 ont été cultivées dans un milieu de différenciation α -MEM contenant 10% SVF, 20 ng/ml de M-CSF, et 20 ng/ml de RANKL soluble recombinant (Saltel et al., 2004). Toutes les cellules ont été maintenues en culture dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

2.3.1.3. Test d'invasion des cellules tumorales BT474 *in vitro*

La procédure expérimentale utilisée pour ce test est la même que celle décrite précédemment pour le test d'invasion des cellules B02, avec une concentration initiale d'ensemencement cellulaire de 5×10^4 cellules/500 μ l.

2.3.1.4. Analyse de l'activité ostéoclastique *in vitro*

A la fin du processus de différenciation des cellules RAW-246.7, les ostéoclastes multinucléés matures ont été lavés 4 fois avec du PBS et détachés en utilisant du PBS-EDTA

0.25 mM pendant 5 min. Ils ont ensuite étéensemencés sur des lamelles résorbables ACC (Apatite Collagen Complex) (Shibutani et al, 2000) pendant 48h à 37°C, avec ou sans traitement avec le CKI à 10^{-5} M et à 10^{-8} M. Après 48h, les cellules ont été fixées avec du PFA 3.7% pH 7.2 dans du PBS pendant 10 minutes à 4°C, perméabilisées avec 0.2% (v/v) de Triton X-100 pendant 7 min, et marquées avec la phalloïdine couplée AlexaFluor-546. La distribution de la F-actine (jugée par le marquage phalloïdine) dans les ostéoclastes est alors visualisée au microscope confocal (Saltel et al., 2004).

2.3.1.5. Analyse histologique

Les os des pattes arrières (tibia et fémur) des souris ont été prélevés à la fin des protocoles animaux (curatifs), fixés dans une solution de paraformaldéhyde (4% p/v) et inclus dans une résine plastique de méthylmétacrylate. Des coupes de 7 μ m d'épaisseur des os non déminéralisés ont ensuite été effectuées avec un microtome lourd (Polycut E, Reicher-Jung). La détection des ostéoclastes a été réalisée sur coupes longitudinales de tibias colorées pour l'activité TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) selon le protocole fourni par le fabricant du kit de coloration Leucognost (Merck). La surface de résorption (OC. S/BS) a alors été calculée comme le ratio de surface d'os recouverte par les ostéoclastes TRAP-positifs (Oc.S) par rapport à la surface osseuse totale (bone surface ou BS) en utilisant le logiciel Visiolab 2000 (Biocom).

2.3.2. Résultats non publiés

2.3.2.1. Effets d'un inhibiteur de cathepsine K sur l'invasion tumorale *in vitro*.

La fonction de la cathepsine K exprimée par les cellules tumorales n'est pas connue. Alors que cette enzyme possède une activité protéolytique très forte à pH acide dans les lacunes de résorption ostéoclastiques (Baron, 2001; Teitelbaum, 2000), elle est aussi capable de dégrader les composants de la matrice extracellulaire à pH neutre, suggérant un rôle général dans la dégradation et le remodelage des tissus (Buhling et al., 1999). Il a ainsi été suggéré que la cathepsine K exprimée par les cellules de cancer du sein (Littlewood-Evans et al., 1997) et de la prostate (Brubaker et al., 2003) contribuerait à l'invasion tumorale, un évènement précoce de la dissémination métastatique. Nous avons donc testé *in vitro* si l'inhibition de la cathepsine K interfère avec l'invasion de nos cellules de cancer du sein B02 et BT474 qui expriment cette protéase. Comme le montrent la figure 4B dans la publication et

la figure 23 ci-après, le CKI inhibe l’invasion tumorale au travers de la membrane basale (Matrigel) de façon dose-dépendante. A 10^{-5} M, concentration estimée dans la moelle osseuse après traitement des animaux, l’inhibition est d’environ 50%. Toutefois, cette expérience n’a été réalisée qu’une seule fois et, à 10^{-4} M, le CKI n’inhibe pas l’invasion tumorale. Cette expérience devra être répétée pour juger du rôle de la cathepsine K dans l’invasion tumorale.

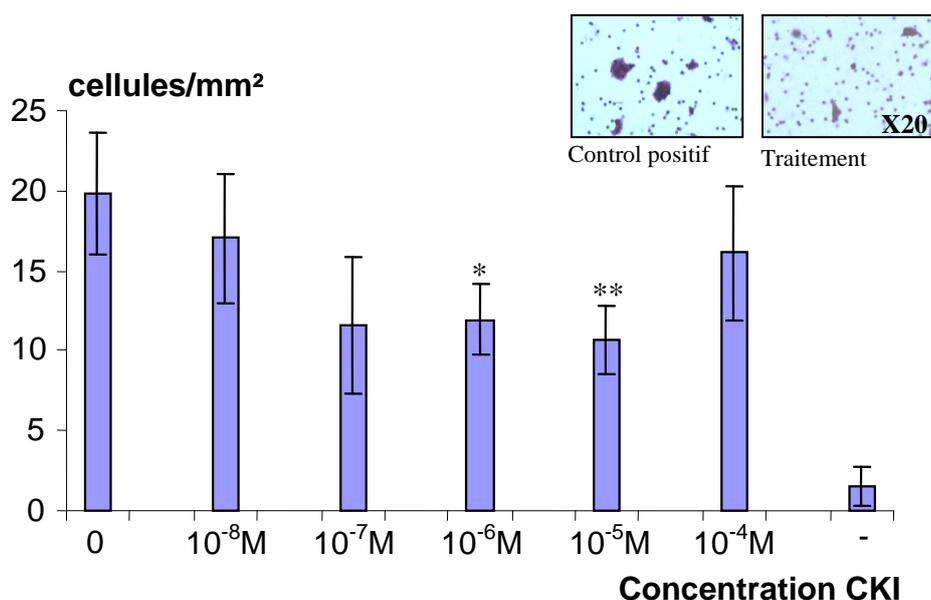


Figure 23. Effet d’un inhibiteur de cathepsine K sur l’invasion des cellules tumorales BT474 *in vitro*.

Les cellules BT474, traitées ou non avec des concentrations croissantes de CKI (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M), ont étéensemencées à une concentration de 50 000 cellules/500 μ l dans des inserts contenant une membrane poreuse recouverte de Matrigel. Chaque concentration a été réalisée en duplicate. Le témoin négatif (-) ne contient pas de chimioattractant (SVF) dans la chambre inférieure. Après 48h, les cellules invasives ont été fixées, colorées et comptées. L’invasion tumorale est exprimée par la moyenne \pm SD, en cellules/mm². *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ comparé au contrôle en utilisant ANOVA suivi d’un test PLSD de Fischer. *En insert*, photo d’analyse au microscope avec ou sans traitement (Grossissement x 20).

2.3.2.2. Effets d’un inhibiteur de cathepsine K sur les ostéoclastes *in vivo* et *in vitro*

La cathepsine K est la principale enzyme responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire au cours de la résorption ostéoclastique. Afin de comprendre comment l’inhibiteur de la cathepsine K ralentit le développement des métastases osseuses, nous avons regardé l’effet de cet inhibiteur sur les ostéoclastes. Pour cela, nous avons quantifié par

histochimie (coloration TRAP) la surface d'os recouverte par les ostéoclastes par rapport à la surface osseuse totale (ratio Oc.S/BS) sur des coupes de pattes. Nous avons ainsi observé que le nombre d'ostéoclastes à la surface de l'os n'est pas affecté dans les os métastatiques des souris ayant reçu un traitement avec le CKI (50mg/kg/j) par rapport aux os des souris traitées avec un placebo (Figure 24). Au contraire, dans le cas de traitements combinés, le nombre d'ostéoclastes est diminué par le traitement au zolédronate (100µg/kg, 1 x) (Figure 24) dont l'effet en traitement seul a été démontré dans d'autres protocoles animaux utilisant les mêmes conditions (résultats non montrés). Le zolédronate diminue le nombre d'ostéoclastes par le biais d'une inhibition de la voie du mévalonate, conduisant à la disparition de la ceinture d'actine et donc à l'apoptose des ostéoclastes (Coxon et al., 2006).

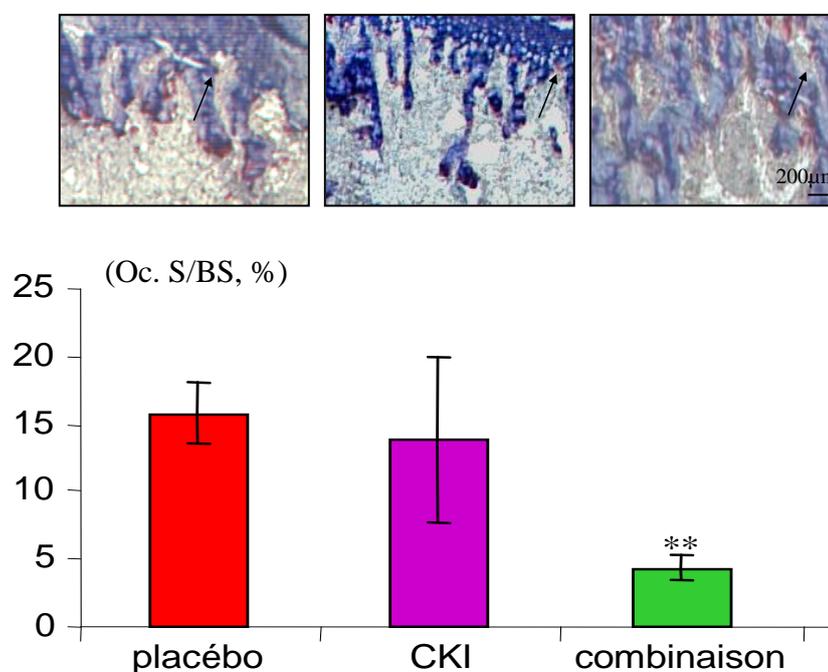


Figure 24. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K sur les ostéoclastes au site métastatique.

(A) Examens histologiques représentatifs de sections au niveau des métaphyses de tibia d'animaux métastatiques, 33 jours après l'injection des cellules tumorales. L'os est coloré en bleu et les ostéoclastes en rouge. (B) Le ratio Oc.S/BS a été quantifié. Les résultats sont la moyenne \pm SD de 4-5 pattes par groupe. **, $P < 0.001$ comparé au contrôle en utilisant ANOVA suivi d'un test PLSD de Fischer.

Alors qu'aux sites métastatiques le nombre d'ostéoclastes n'est pas diminué après un traitement avec le CKI, une diminution de la résorption osseuse est observée. Nous avons donc suggéré que l'inhibiteur de cathepsine K agit sur l'activité ostéoclastique sans induire leur apoptose. Cette hypothèse a pu être vérifiée *in vitro*. En effet, comme le montre la figure

25, lorsque des ostéoclastes cultivés sur lamelles résorbables d'ACC sont traités avec le CKI, le cytosquelette d'actine des ostéoclastes n'est pas modifié (Figure 25, panneaux a, b et c). En revanche, à une concentration de 10^{-5} M, la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes est inhibée (Figure 25, panneau f) par rapport aux cas où il n'y a pas eu de traitements ou avec de plus faibles concentrations (10^{-8} M) (Figure 25, panneaux d, et e). Ainsi, l'inhibiteur de cathepsine K agirait donc sur l'activité ostéoclastique *in vitro* et *in vivo*, sans affecter la survie des ostéoclastes.

Inhibiteur de Cathepsine K :

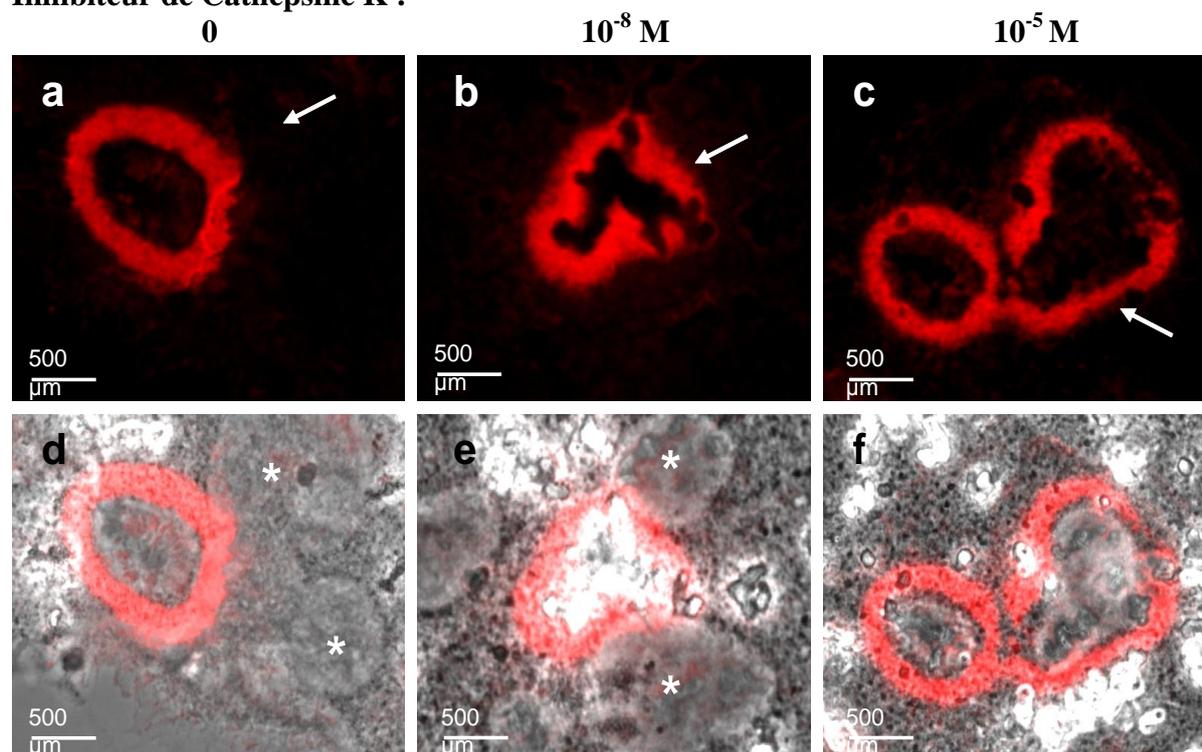


Figure 25. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K sur la résorption osseuse régulée par les ostéoclastes *in vitro*.

(panneaux A à C) Analyse au microscope confocal d'ostéoclastes ensemencés sur des lamelles d'ACC marqués à la phalloïdine, soit non traités (A), soit traités avec le CKI à des concentrations de 10^{-8} M (B) ou 10^{-5} M (C). Les ostéoclastes possèdent une zone d'attachement (sealing zone) normale (flèche), indépendamment du traitement utilisé. (panneaux D à F) Visualisation des lacunes de résorption (astérisque blanc) en absence (D) ou présence de CKI à 10^{-8} M (E) ou 10^{-5} M (F). Seule la concentration à 10^{-5} M bloque la formation de lacunes de résorption par les ostéoclastes.

2.4. Discussion

Dans les métastases ostéolytiques associées au cancer du sein, les cellules tumorales sécrètent des facteurs (*i.e.*, PTHrP, IL-6, IL-8, IL-11, prostaglandines) qui stimulent l'activité ostéoclastique (Mundy, 2002) et augmentent ainsi la résorption osseuse. Les ostéoclastes

résorbent l'os en sécrétant des protons et la cathepsine K (Baron, 2001; Teitelbaum, 2000). Les protons dissolvent le minéral osseux et fournissent un environnement acide optimal pour l'activité protéolytique de la cathepsine K qui est responsable de la dégradation de la matrice collagénique (Teitelbaum, 2000). Des métalloprotéases MMPs sont aussi impliquées dans le processus de résorption (Delaisse et al., 2003; Everts et al., 2006). Toutefois, la cathepsine K est une protéinase clé de la résorption osseuse (Saftig et al., 1998; Teitelbaum, 2000).

Nos travaux montrent tout d'abord que la cathepsine K est non seulement exprimée par les ostéoclastes mais aussi par les cellules de cancer du sein de tumeurs primaires et de métastases osseuses. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant rapporté l'expression de l'enzyme par les cellules de cancer du sein et de la prostate (Brubaker et al., 2003; Littlewood-Evans et al., 1997). De plus, nous avons observé que les cellules métastatiques surexpriment la cathepsine K par rapport aux cellules présentes dans la tumeur primaire ou dans les métastases aux tissus mous du même patient. Bien qu'il soit nécessaire d'étudier plus d'échantillons avant de confirmer ces premières observations, nous pensons que nos résultats sont en accord avec la théorie de l'ostéomimétisme (Barnes et al., 2004; Yeung et al., 2002). Celle-ci suggère que les cellules tumorales qui métastasent à l'os expriment des gènes normalement exprimés par les cellules de l'os pour pouvoir proliférer dans l'environnement osseux. Suite à ces observations, nous avons pensé qu'un traitement avec un inhibiteur de cathepsine K, en ciblant les ostéoclastes et les cellules métastatiques, pourrait être doublement efficace pour traiter les métastases osseuses associées au cancer du sein.

Nos résultats montrent en effet qu'un inhibiteur de cathepsine K réduit significativement l'ostéolyse dans deux modèles animaux différents de métastases osseuses causées par des cellules de cancer du sein. De plus, nous avons observé que le traitement a un effet anti-tumoral au site osseux. Cet effet anti-tumoral est toutefois indirect, il est la conséquence de l'activité anti-résorptive de l'inhibiteur, qui, en retour, prive les cellules cancéreuses de facteurs de croissance qui sont nécessaires à la prolifération tumorale. Cette hypothèse est d'abord supportée par le fait que nous n'observons pas d'effet anti-tumoral du CKI sur les cellules B02 lorsqu'elles sont injectées par voie sous-cutanée chez des souris. De plus, un traitement préventif ne réduit pas plus la masse tumorale au site métastatique qu'un traitement curatif. Des résultats similaires ont été obtenus dans différents modèles animaux dans lesquels un traitement avec l'ostéoprotégérine, un inhibiteur directe de l'activité ostéoclastique, provoque une réduction de la masse tumorale au site métastatique osseux mais

pas dans les tissus mous (Jones et al., 2006; Morony et al., 2001; Yonou et al., 2003; Zhang et al., 2001).

Le rôle de la cathepsine K produite par les cellules tumorales n'est pas encore connu. Nous avons montré que l'inhibition de la cathepsine K réduit l'invasion des cellules de cancer du sein *in vitro*, ce qui suggère que l'enzyme aurait un rôle dans l'invasion tumorale *in vivo*. Un inhibiteur de cathepsine K devrait donc aussi pouvoir inhiber l'invasion tumorale *in vivo*. Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment, l'inhibiteur que nous avons utilisé n'a pas d'effet anti-tumoral direct dans nos modèles animaux. Peut-être que de plus fortes doses d'inhibiteur seraient requises pour cibler la cathepsine K tumorale *in vivo*. Toutefois au vu de récentes données obtenues en recherche clinique (Adami et al., 2006), nous anticipons que de plus fortes doses auraient des effets secondaires indésirables.

Les bisphosphonates sont utilisés en clinique pour le traitement des cancers du sein avec métastases osseuses (Brown et al., 2004). Le zolédronate fait partie de la classe des BPs azotés qui inhibent la FPP synthase de la voie du mévalonate et conduisent ainsi à l'inhibition de la prénylation des petites protéines G. La perte de prénylation induit alors la rupture de la ceinture d'actine dans les ostéoclastes et par conséquent l'apoptose de ces cellules (Coxon et al., 2006). Comme nous l'avons montré (Figure 24), ainsi que d'autres (Grabowski et al., 2005), un inhibiteur de cathepsine K ne rompt pas la ceinture d'actine, mais inhibe la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes en inhibant l'activité protéolytique de la cathepsine K. Le zolédronate et les inhibiteurs de cathepsine K ayant des cibles moléculaires différentes dans l'ostéoclaste, nous les avons utilisés en traitement combiné en espérant obtenir une meilleure inhibition de la progression des métastases osseuses chez l'animal. Une seule dose clinique de zolédronate (100µg/kg) n'améliore pas l'efficacité du CKI à réduire l'ostéolyse maligne et la masse tumorale au site osseux. A l'inverse, l'administration de zolédronate seul avec des doses hebdomadaires à 50µg/kg est si efficace pour inhiber la masse tumorale au site osseux, qu'il n'est pas possible de voir si l'association du BP avec le CKI améliore le traitement (résultats non publiés). Nos résultats suggèrent que pour améliorer les effets anti-résorptifs et anti-tumoraux de ces drogues lorsqu'elles sont utilisées en combinaison, il faudrait optimiser les doses et mode d'administration.

Pour conclure, les résultats de notre étude préclinique montrent pour la première fois qu'un inhibiteur de cathepsine K diminue l'ostéolyse induite par les cellules tumorales de cancer du sein et la masse tumorale au site osseux. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de cathepsine K en association avec d'autres agents pharmacologiques anti-

ostéoclastiques pourrait être un futur traitement pour des patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade avancé.

3. ETUDE PRECLINIQUE DE L'EFFET D'UNE POLYTHÉRAPIE (INHIBITEUR DE CATHEPSINE K, ZOLEDRONATE ET GLEEVEC) SUR LES MÉTASTASES OSSEUSES DU CANCER DU SEIN

3.1. Introduction

Dans le cadre de recherche de nouvelles thérapies potentielles pour le traitement des métastases osseuses associées au cancer du sein, nous avons ensuite étudié les effets de l'imatinib mesylate (Gleevec). L'imatinib mesylate est un agent pharmacologique qui inhibe l'activité tyrosine kinase de Abl. Il s'est avéré efficace dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique en bloquant l'activité de BCR-Abl (Druker et al., 2001). L'imatinib mesylate inhibe aussi les récepteurs tyrosine kinases, tels que c-Kit et le récepteur du PDGF, et s'est avéré efficace dans le traitement de tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) et, sur le plan expérimental, dans le traitement des métastases osseuses associées aux cancers de la prostate et du sein (Kim et al., 2006; Lev et al., 2005; Uehara et al., 2003). L'action inhibitrice de l'imatinib mesylate dans le contexte des métastases osseuses se ferait vraisemblablement par le biais d'une inhibition de la phosphorylation du récepteur du PDGF exprimé par les cellules endothéliales (activité anti-angiogénique) (Kim et al., 2006; Lev et al., 2005; Uehara et al., 2003). Toutefois, l'imatinib mesylate bloque également le récepteur du M-CSF (lequel récepteur est exprimé par les précurseurs ostéoclastiques), suggérant qu'il puisse inhiber aussi la formation d'ostéoclastes (Dewar et al., 2005; Dewar et al., 2006). Par ailleurs, il a été observé récemment que la combinaison du zolédronate (25µg/kg, deux fois par jour) avec l'imatinib et le paclitaxel (un agent chimiothérapeutique) améliore l'inhibition de la masse tumorale dans un modèle animal de métastases osseuses de cancer de la prostate, par rapport à l'administration de chaque drogue seule (Kim et al., 2005).

Compte tenu de ces observations, nous avons testé *in vivo* l'effet du Gleevec, seul ou en association avec d'autres agents (zolédronate, inhibiteur de cathepsine K) sur la formation et le développement des métastases osseuses, ainsi que sur le développement tumoral dans un contexte non osseux. Nous avons également étudié l'effet du Gleevec *in vitro* sur la prolifération et l'invasion tumorale.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Culture cellulaire.

Les cellules B02 sont des cellules épithéliales de type mésenchymateux qui ont été sélectionnées à partir de métastases osseuses induites par les cellules MDA-MB-231 chez la souris *nude* (Peyruchaud et al., 2001). Les cellules B02 ont la particularité de ne former que des métastases osseuses après injection dans la veine caudale de souris *nude* (Peyruchaud et al., 2001). Les cellules sont cultivées à 37°C en milieu DMEM, 10% SVF, 1% P/S en atmosphère humide et 5% de CO₂.

3.2.2. Drogues.

L'inhibiteur de cathepsine K (CKI), le zolédronate (Zometa[®]) et l'imatinib mesylate (STI571/Gleevec[®]/Glivec[®]) ont été fournis par Novartis Pharma AG. L'inhibiteur de cathepsine K et le zolédronate ont été préparés comme décrit précédemment dans l'article (Le Gall et al., 2007), et l'Imatinib a été préparé dans de l'eau pure.

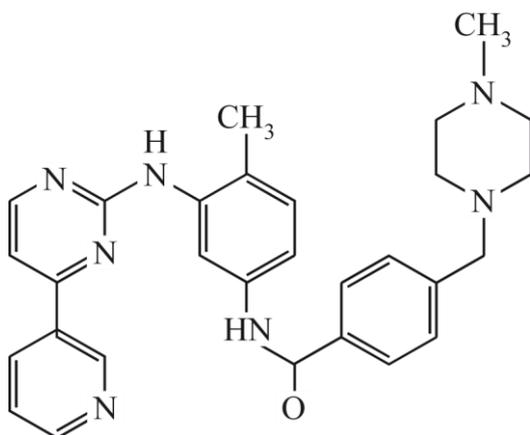


Figure 26. Structure du Gleevec.

3.2.3. Test de viabilité/prolifération cellulaire.

Les cellules B02 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (10³ cellules/100µl/puits). Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules en culture ont été lavées et mises en présence ou en absence de drogue, diluée dans du milieu complet à des concentrations croissantes. Après 6 jours de traitement, nous avons mesuré la quantité de cellules présentes en ajoutant 20µL/puits d'une solution de MTT (5mg/mL). Le MTT est transformé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables en un composé bleu de formazan sous forme cristallisée. Après 5 heures d'incubation à 37°C, les cellules ont été

solubilisées dans une solution d'HCl (0,01M) contenant 10% de SDS, pendant une incubation de 16 heures, à 37°C. Le bleu formazan solubilisé est mesurable par spectrométrie à une longueur d'onde de 570nm avec un lecteur de microplaque (Model 680, BioRad). Toutes les conditions sont réalisées en sextuplicata.

3.2.4. Test d'invasion cellulaire.

Les expériences d'invasion ont été effectuées comme décrit précédemment (Le Gall et al., 2007; Pecheur et al., 2002) en utilisant des chambres de migration Bio-Coat (Beckton-Dickinson Biosciences) qui consistent en inserts contenant un filtre avec pores de 8 µm, accompagnant des plaques de 24 puits. Les filtres ont été recouverts d'une membrane basale de Matrigel, déplétée en facteurs de croissance (37µg/filtre, BD Biosciences) qui polymérise en 1h30 à 37°C. Les cellules tumorales (5×10^4 /500µl) traitées ou non ont ensuite été ajoutées à chaque insert (chambre supérieur), et le chimioattractant (10% SVF) dans chaque puits de la plaque à 24 puits (750µl/puits dans la chambre inférieur). Après 48h d'incubation à 37°C, les cellules non invasives ont été éliminées avec un coton-tige, et les cellules invasives sur la face inférieure de la membrane fixées et colorées avec une solution de cristal violet (0,1% p/v) resuspendu dans de l'éthanol (20% v/v), pendant 10 minutes. Après séchage, les membranes ont été montées sur lames de verre, et les cellules ont été comptées au microscope (grossissement $\times 400$) dans 10 champs d'observation répartis sur un trajet identique pour toutes les membranes (Boucharaba et al., 2004; Pecheur et al., 2002). Toutes les expériences sont faites en duplicata et l'invasion cellulaire est exprimée en nombre de cellules par mm².

3.2.5. Animaux.

Les expériences de métastases osseuses et de tumorigenèse ont été effectuées sur des souris Balb/c *nu/nu* femelles de 4 semaines (Charles River Laboratories). Tous les protocoles animaux sont réalisés en accord avec les recommandations du comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CREEA, Lyon, France) concernant la stabulation, les soins, les manipulations et l'euthanasie des animaux.

3.2.6. Modèle de métastases osseuses.

Les expériences de métastases osseuses chez la souris ont été réalisées comme décrit précédemment (Le Gall et al., 2007; Peyruchaud et al., 2001). Des cellules B02 (5×10^5 cellules dans 100µL de PBS) ont été injectées à J0 dans la veine caudale de souris *nude*

anesthésiées. Dans le cas d'un traitement préventif, les souris reçoivent les traitements quotidiens à partir de J0 jusqu'à la fin du protocole (J+33). Dans le cas d'un traitement curatif, les animaux reçoivent les traitements à partir de J18, date à laquelle les animaux sont randomisés en groupes homogènes en fonction des surfaces de lyse visibles au niveau de leurs pattes arrières. Le Gleevec a été administré en p.o. 2 fois par jour (100mg/kg/2x/jour), l'inhibiteur de cathepsine K en i.p. 2 fois par jour (50mg/kg/jour) et le placebo (PBS) en i.p. 2 fois par jour (200µl/2x/jour). Le zolédronate a été administré hebdomadairement en s.c., soit 5 fois à 20µg/kg en traitement préventif et 2 fois à 50µg/kg en traitement curatif. L'ostéolyse a été analysée par radiographie (films MIN-R2000, Kodak) avec un appareil à rayon-X (MX-20, Faxitron X-Ray Corporation). La quantification des surfaces de lyse sur radiographies a été réalisée avec une station d'analyse d'image (Visiolab 2000, Biocom) et les résultats sont exprimés en mm² d'ostéolyse par animal.

3.2.7. Analyse osseuse.

Après euthanasie, les pattes arrières des animaux (tibia et fémur) ont été prélevées, fixées dans une solution de paraformaldéhyde (4% p/v) et envoyées dans de l'EtOH70% à Novartis Pharma AG. La reconstitution micro-CT en trois dimensions des pattes a ainsi permis de faire des mesures de la densité minérale osseuse (BMD). Ensuite, les pattes ont été incluses dans une résine plastique de méthylmétacrylate pour des analyses histomorphométriques qui seront faites ultérieurement (travaux en cours).

3.2.8. Modèle animal de tumorigenèse sous-cutanée.

Les expériences de tumorigenèse chez la souris ont été réalisées comme décrit précédemment (Boucharaba et al., 2004; Le Gall et al., 2007). Les souris *nude* ont été inoculées au jour J0, avec une suspension de cellules B02 (10⁶ cellules dans 100µL de PBS1%) administrée par voie s.c., dans les flancs. La taille des tumeurs, longueur (L) et largeur (l) est mesurée avec un pied à coulisse. Le volume tumorale (V, exprimé en mm³) est calculé selon la formule $V=(L \times l^2)/2$. Lorsque les tumeurs étaient palpables, les animaux ont été randomisés et ont reçu un traitement p.o. 2 fois par jour avec une solution de Gleevec (100mg/kg/2x/jour), un traitement i.p. 2 fois par jour avec une solution d'inhibiteur de cathepsine K (50mg/kg/2x/jour) ou un traitement i.p. 2 fois par jour avec le placebo (PBS) (200µl/2x/jour) jusqu'à la fin du protocole (J+71).

3.2.9. Analyse statistique.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Statview v5.0 en utilisant ANOVA suivi du test PLSD de Fischer. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SD (ou SEM) et les différences ont été considérées comme statistiquement différentes pour une valeur de P inférieure à 0,05.

3.3. Résultats

3.3.1. Effet du Gleeevec sur la progression des lésions ostéolytiques de cancer du sein (Protocole curatif).

Nous avons testé l'efficacité *in vivo* du Gleeevec (100 mg/kg, deux fois par jour) sur la progression des métastases osseuses induites par les cellules B02, seul ou en association avec un inhibiteur de cathepsine K (50 mg/kg/j) et/ou le zolédronate (50 μ g/kg/sem). Les effets des traitements sur la progression de lésions ostéolytiques ont été étudiés en utilisant un protocole curatif dans lequel l'administration des drogues commence 18 jours après l'injection des cellules tumorales. Nous avons ainsi observé que 32 jours après l'injection des cellules tumorales, les animaux ayant reçu un traitement avec le Gleeevec ont des surfaces de lyse 50% plus petites que celles observées chez les animaux placebo (Figure 27 et Tableau 6). Nous avons également reproduit les résultats présentés dans la première partie expérimentale, à savoir qu'un traitement seul avec un inhibiteur de cathepsine K ou du zolédronate diminue significativement les surfaces de lyse osseuse (53.3% et 58.3% respectivement, Tableau 6). Toutefois, nos résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de traitements combinés, et notamment d'une tri-thérapie, ne diminue pas plus la progression des lésions ostéolytiques que lorsque les agents sont utilisés seuls. Ces résultats sont confirmés par les mesures de densité minérale osseuse BMD faites en micro-CT (Tableau 6). En effet, les traitements augmentent significativement la densité minérale osseuse, mais nous n'avons pas noté de différence significative entre les groupes traités.

Tableau 6. Effet d’un inhibiteur de Cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec, seuls ou en association sur la progression des métastases osseuses du cancer du sein.

Traitement ^a	Radiographie (mm ²)	BMD (mg/cm ³)
Placébo	6 ± 3.6 (<i>n</i> = 14)	397 ± 65 (<i>n</i> ' = 28)
CKI	2.8 ± 2 (<i>n</i> = 15)*	475 ± 54 (<i>n</i> ' = 30)**
Zol	2.5 ± 1.8 (<i>n</i> = 9)*	475 ± 58 (<i>n</i> ' = 18)**
Glee	3 ± 3.1 (<i>n</i> = 17)*	469 ± 61 (<i>n</i> ' = 34)**
CKI+Glee	1.9 ± 1.7 (<i>n</i> = 14)**	487 ± 57 (<i>n</i> ' = 27)**
Zol+Glee	2.1 ± 1.8 (<i>n</i> = 9)*	498 ± 60 (<i>n</i> ' = 18)**
CKI+Zol+Glee	1.8 ± 2.1 (<i>n</i> = 9)*	514 ± 70 (<i>n</i> ' = 16)**

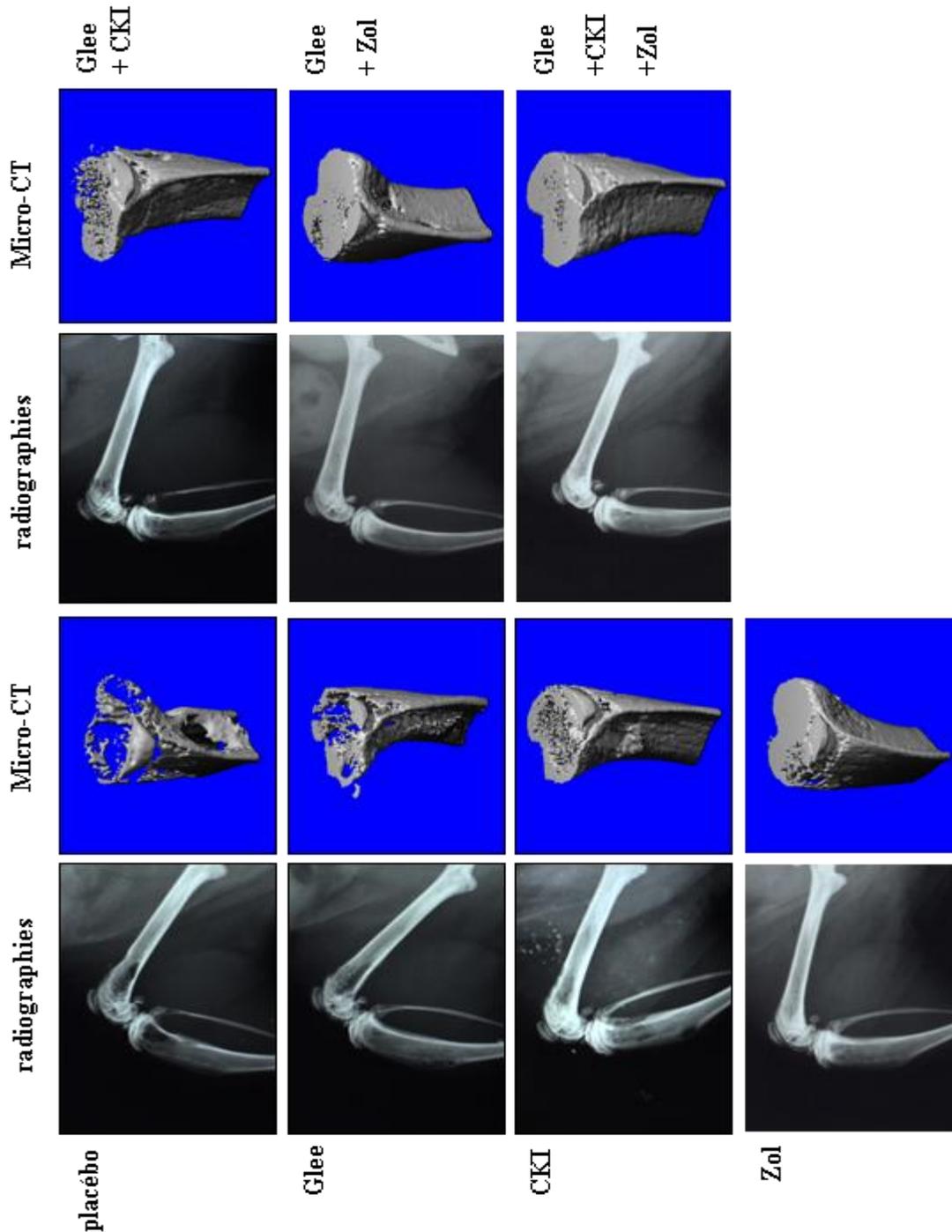
^a Les traitements ont été commencés après que les métastases osseuses se soient développées (*i.e.*, 18 jours après l’injection des cellules tumorales B02). Toutes les mesures ont été faites 32 jours après l’injection des cellules tumorales. Les résultats sont les moyennes ± SD de deux expériences séparées. Le CKI est administré à 50 mg/kg, deux fois par jour ; le zolédronate, à 50 µg/kg, à J18 et J25; et le Gleevec, à 100 mg/kg, deux fois par jour.

n est le nombre d’animaux métastatiques et *n*' est le nombre de pattes métastatiques.

*, *P*<0.05 ; **, *P*<0.01 comparé au contrôle en utilisant ANOVA suivi d’un test PLSD de Fischer.

Figure 27. Effet d'un inhibiteur de cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec sur la progression des métastases osseuses chez la souris *nude*.

Les traitements ont été commencés après que les métastases osseuses se soient développées (*i.e.*, 18 jours après l’injection des cellules tumorales B02). Le CKI est administré à 50 mg/kg, deux fois par jour ; le zolédronate, à 100 µg/kg, une seule dose à J18 ; et le Gleevec, à 100 mg/kg, deux fois par jour. Images représentatives (A) de radiographies et (B) de reconstitution en 3 dimensions micro-CT de pattes arrière de souris à la fin du protocole, soit 32 jours après l’injection des cellules.



3.3.2. Effet du Gleevec sur la formation des lésions ostéolytiques de cancer du sein (Protocole préventif).

Nous avons également testé l’efficacité *in vivo* du Gleevec (100 mg/kg, deux fois par jour) sur la formation des métastases osseuses induites par les cellules B02, seul ou en association avec un inhibiteur de cathepsine K (50 mg/kg/j) et/ou le zolédronate (20 µg/kg/sem). Les effets des traitements sur le développement des lésions ostéolytiques ont été étudiés en utilisant un protocole préventif dans lequel l’administration des drogues commence en même temps que l’injection des cellules tumorales. Nous avons ainsi observé que 32 jours après l’injection des cellules tumorales, les animaux ayant reçu un traitement avec le Gleevec ont des surfaces de lyse 66% plus petites que celles observées chez les animaux placebo (Tableau 7). Nous avons aussi observé que le traitement avec un inhibiteur de cathepsine K ou du zolédronate diminue significativement les surfaces de lyse osseuse (55% et 85% respectivement, Tableau 7). Ces observations sont en accord avec les résultats de BMD obtenus par analyse micro-CT. Par ailleurs, nos résultats montrent que l’utilisation de traitements combinés dans un protocole préventif ne diminue pas significativement plus la progression des lésions ostéolytiques que lorsque les agents sont utilisés seuls (Tableau 7). En revanche, nous pouvons noter que l’utilisation du Gleevec en traitement préventif diminue les lésions ostéolytiques de 66%, alors que la diminution en traitement curatif est de 50% ($P=0.055$ en utilisant ANOVA suivi d’un test PLSD de Fischer). Ces résultats suggèrent que le Gleevec inhibe l’invasion tumorale par un effet direct anti- tumoral.

Tableau 7. Effet d’un inhibiteur de Cathepsine K, du zolédronate ou du Gleevec, seuls ou en association sur la formation des métastases osseuses du cancer du sein.

Traitement ^a	Radiographie (mm ²)	BMD (mg/cm ³)
Placébo	16.7 ± 4.3 (n = 10)	417 ± 65 (n'=17)
CKI	7.6 ± 5.5 (n = 12)**	521 ± 82 (n'=19)**
Zol	2.5 ± 2.3 (n = 5)**	495 ± 110 (n'=5)*
Glee	5.6 ± 4.2 (n = 14)**	475 ± 76 (n'=21)*
CKI+Glee	4.3 ± 4.4 (n = 16)**	519 ± 88 (n'=21)**
Zol+Glee	1.5 ± 1.1 (n = 9)**	522 ± 77 (n'=9)*
CKI+Zol+Glee	2.2 ± 1.9 (n = 9)**	537 ± 34 (n'=8)**

^a Les traitements ont été commencés en même temps que l’injection des cellules tumorales B02. Toutes les mesures ont été faites 32 jours après l’injection des cellules tumorales. Les résultats sont les moyennes ± SD de deux expériences séparées. Le CKI est administré à 50 mg/kg, deux fois par jour ; le zolédronate, à 20 µg/kg/sem ; et le Gleevec, à 100 mg/kg, deux fois par jour. *n* est le nombre d’animaux métastatiques et *n'* est le nombre de pattes métastatiques..
*, *P*<0.05 ; **, *P*<0.01 comparé au contrôle en utilisant ANOVA suivi d’un test PLSD de Fischer.

3.3.3. Effet du Gleevec sur la prolifération des cellules B02 *in vivo*

Afin de déterminer si le Gleevec a un effet direct anti-tumoral, nous avons utilisé un modèle de tumorigenèse *in vivo* dans lequel les cellules tumorales B02 ont été injectées en s.c. à des souris *nude*. Lorsque les tumeurs sont devenues palpables, 50 jours après l’injection des cellules, les animaux ont été traités avec le Gleevec (100 mg/kg, deux fois par jour), le CKI (50 mg/kg/j), ou le traitement placébo (PBS). Comparé au traitement placébo, le Gleevec a inhibé significativement la croissance des tumeurs sous cutanées chez l’animal (Figure 28). Le Gleevec a donc des propriétés anti-tumorales directes *in vivo*. En revanche, comme nous l’avons montré dans la première partie expérimentale, le CKI n’a pas d’effet.

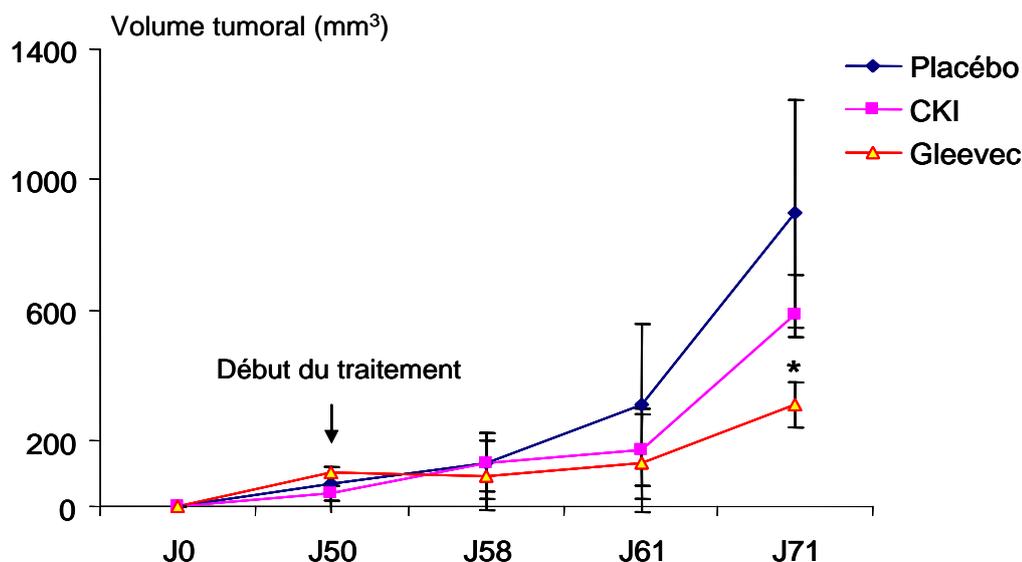


Figure 28. Effet du Gleevec sur la croissance sous-cutanée des xénogreffes de cellules B02.

Les cellules B02 (10^6 cellules) ont été injectées sous la peau de souris Balb/c *nu/nu* femelles de 4 semaines au niveau des flancs. Lorsque les tumeurs sont devenues palpables, les animaux ont été randomisés en 3 groupes et traités quotidiennement 2 fois avec un inhibiteur de cathepsine K (50mg/kg/2x/jour), du Gleevec (100mg/kg/2x/jour), ou du PBS (groupe placebo) (200 μ l/2x/jour) jusqu'à la fin du protocole J71. Les volumes tumoraux ont été mesurés aux différents temps indiqués sur le graphique et sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD de 5 animaux pour les groupes CKI et placebo, et 8 pour le groupe Gleevec.

3.3.4. Effet du Gleevec sur la prolifération et l'invasion des cellules B02 *in vitro*

Nous avons également observé que le Gleevec a des propriétés anti-tumorales *in vitro*: il peut inhiber la prolifération et l'invasion des cellules tumorales B02. Lorsque les cellules B02 sont cultivées pendant 6 jours avec des concentrations de Gleevec allant de 10^{-8} à 10^{-6} M, la prolifération des cellules n'est pas inhibée. En revanche, à 10^{-5} M, la prolifération est inhibée (Figure 29). De plus, nous avons observé que l'invasion tumorale des cellules B02 est significativement inhibée après 48h de traitement avec des concentrations de Gleevec allant de 10^{-7} à 10^{-5} M (Figure 30). Le Gleevec inhibe donc l'invasion tumorale, à des concentrations qui n'ont pas d'effet sur la prolifération tumorale. Il est intéressant de noter que Dewar *et coll.* (2006) ont observé *in vitro* qu'à partir de 3×10^{-7} M, le Gleevec inhibe aussi l'activité des ostéoclastes et qu'à partir de 3×10^{-6} M, il inhibe l'ostéoclastogénèse.

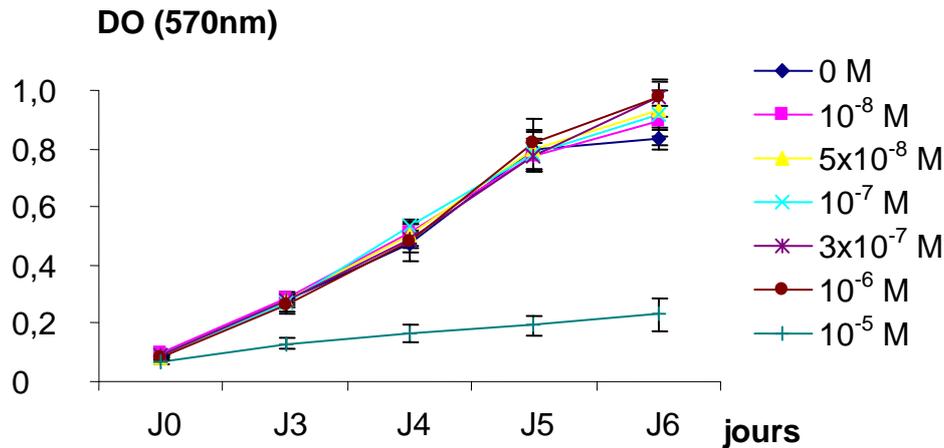


Figure 29. Effet du Gleevec sur la prolifération des cellules B02 *in vitro*.

Des cellules B02 en culture ont été traitées avec des concentrations croissantes de Gleevec (10^{-8} , 5×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M) pendant 6 jours. Le nombre de cellules viables a alors été estimé en utilisant un test MTT. Toutes les conditions ont été réalisées en sextuplicata et les résultats sont sous la forme de moyenne \pm SD.

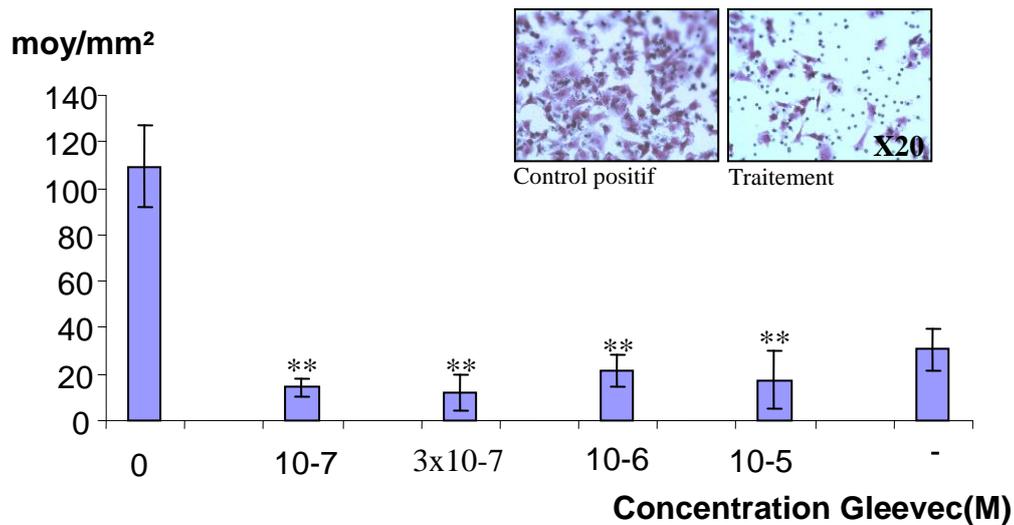


Figure 30. Effet du Gleevec sur l’invasion des cellules tumorales B02 *in vitro*.

Les cellules B02, traitées ou non avec des concentrations croissantes de Gleevec (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M), ont été ensemencées à une concentration de 50 000 cellules/500 μ l dans des inserts contenant une membrane poreuse recouverte de Matrigel. Après 48h, les cellules invasives ont été fixées, colorées et comptées. Le témoin négatif (-) ne contient pas de chimioattractant (SVF) dans la chambre inférieure. L’invasion tumorale est exprimée par la moyenne \pm SD, en cellules/mm². *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ comparé au contrôle en utilisant ANOVA suivi d’un test PLSD de Fischer. *En insert*, photos d’analyse au microscope avec ou sans traitement (grossissement x 20)

3.4. Discussion

Les résultats obtenus *in vitro* avec le Gleevec montrent que celui-ci peut cibler directement les cellules tumorales en inhibant leur prolifération avec la plus forte concentration que nous avons utilisée (10 μ M), et en inhibant leur invasion avec de faibles concentrations (indépendamment d'une action sur la survie cellulaire). Les doses de Gleevec utilisées *in vivo* (100 mg/kg/j 2 fois) ont aussi une action anti-tumorale directe : (1) nous avons observé qu'après 21 jours de traitement, il y a une réduction significative de la croissance tumorale de cellules B02 injectées en sous cutané et (2), dans notre modèle animal de métastases osseuses, un traitement préventif est plus efficace qu'un traitement curatif, suggérant un rôle inhibiteur sur l'invasion tumorale. L'action du Gleevec pourrait alors être non seulement directe, mais également indirecte en bloquant la phosphorylation du PDGFR (Kim et al., 2006; Lev et al., 2005). En effet, il a été observé dans d'autres études *in vivo* que le traitement au Gleevec (50 mg/kg/j) provoque non seulement l'apoptose des cellules de cancer du sein et de la prostate après 6 à 10 semaines de traitement, mais également l'apoptose des cellules endothéliales (Kim et al., 2006; Lev et al., 2005). Les résultats de Kim *et al.* (2006) montrent par ailleurs que l'apoptose des cellules endothéliales précède l'apoptose des cellules de cancer de la prostate, suggérant que cette dernière pourrait être la conséquence d'un effet anti-angiogénique du Gleevec.

Nous ne pouvons exclure que l'effet du Gleevec sur la formation des métastases osseuses induites par les cellules B02 soit non seulement le fait d'une inhibition de l'invasion, de la prolifération tumorale et de l'angiogenèse, mais également la conséquence d'une inhibition de la résorption osseuse. D'autres études ont en effet montré *in vitro* et *in vivo* que le Gleevec inhibe la formation et l'activité des ostéoclastes *via* une inhibition de la voie de signalisation induite par le récepteur M-CSF (Gallet et al. 2006, Dewar et al. 2005). En utilisant le Gleevec avec le CKI et le zolédronate, trois agents pharmaceutiques ciblant différentes voies moléculaires dans l'ostéoclaste, nous pensions ainsi pouvoir augmenter l'efficacité anti-métastatique de chacun de nos composés. Cependant, nos résultats montrent que dans nos conditions d'utilisation, aucune synergie d'action significative n'est observée pour ce qui est des lésions ostéolytiques (nous n'avons pas encore de données sur la masse tumorale à l'os). Les doses de zolédronate utilisées seraient trop efficaces pour noter une synergie d'action. Par contre, même si elle n'est pas significative, nous pouvons noter que la

combinaison CKI avec du Gleevec tend à améliorer l'inhibition de l'ostéolyse par rapport aux traitements seuls.

Il est prévu dans cette étude de faire des analyses histomorphométriques complémentaires afin de déterminer l'effet du Gleevec plus en détail sur l'ostéolyse (BV/TV), la masse tumorale (TB/STV), sur les ostéoclastes (coloration TRAP) et l'angiogenèse (CD31) dans nos modèles de métastases osseuses et de tumorigenèse animaux.

Par ailleurs, une étude clinique réalisée sur 116 patients atteints d'un cancer de la prostate hormono-résistant métastatique à l'os a montré récemment que non seulement l'association du Gleevec avec une chimiothérapie (docetaxel) n'améliore pas la survie des patients, mais aussi que l'addition de Gleevec est associée à une toxicité importante (fatigue et troubles gastro-intestinaux) (Mathew et al., 2007). Pourtant, ce même groupe a montré en 2006 dans un modèle animal orthotopique de cancer de la prostate, qu'un traitement avec des doses quotidiennes de Gleevec (50 mg/kg/j) équivalentes aux 600 mg donnés en clinique diminue significativement la progression des métastases osseuses (Kim et al., 2006).

Au vu de ces résultats cliniques et précliniques, nous pensons qu'il sera nécessaire d'utiliser des doses plus faibles de Gleevec si nous voulons reconduire des études avec cet agent pharmacologique à l'avenir. En effet, les doses que nous avons utilisées dans cette étude s'élèvent à 2 fois 100mg/kg/j, doses 4 fois supérieures à la dose administrée en clinique (600mg/j). Nous pourrions alors probablement diminuer les risques de toxicité observés en clinique.

PARTIE IV.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse a été de définir de nouvelles cibles thérapeutiques (cathepsine K) et de juger de la pertinence de l'association de nouvelles thérapeutiques (CKI, Gleevec) avec les thérapeutiques existantes (bisphosphonates) dans le traitement expérimental des métastases osseuses associées au cancer du sein.

Bien que la cathepsine K soit produite par les ostéoclastes et les cellules tumorales qui métastasent à l'os, nous avons constaté que l'utilisation d'un antagoniste non peptidique de la cathepsine K (CKI) permet d'inhiber essentiellement l'ostéolyse maligne ; la réduction de la masse tumorale au site osseux n'étant que secondaire à l'inhibition de la destruction osseuse. Cette constatation s'appuie également sur le fait que des doses équivalentes de CKI n'inhibe pas la croissance sous cutané de xénogreffes tumorales. De plus, l'efficacité de cet antagoniste sur les métastases osseuses est la même, que le CKI soit donné dans des conditions curative ou préventive. Si le CKI avait agi directement sur les cellules tumorales, nous aurions anticipé une plus grande efficacité de cet antagoniste pour inhiber la formation de métastases osseuses. Toutefois, dans la mesure où les cellules tumorales produisent également de la cathepsine K, il serait intéressant de tester (à l'image des BPs) d'autres antagonistes plus puissants afin de savoir si on peut obtenir une meilleure efficacité thérapeutique sur la formation des métastases osseuses.

L'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase tel que le Gleevec dans le traitement des métastases osseuses semble être une approche thérapeutique intéressante. Nous avons observé que cet inhibiteur, à la dose utilisée, agissait directement sur les cellules tumorales et bloquait la destruction osseuse. Il est vraisemblable que cette inhibition de la destruction osseuse soit directe en bloquant l'activité des ostéoclastes. Il est par contre surprenant que nous n'ayons pas observé de synergie d'action lorsque nous avons utilisé le Gleevec en association avec le CKI et/ou le zolédronate. Il est vraisemblable que nous ayons à trouver les doses minimales efficaces de chacun de ces agents pharmacologiques pour que nous observions une synergie d'action sur l'inhibition de la formation des métastases osseuses. Ce type d'expérience devra être réalisé dans le futur. D'autre part, nous projetons d'étudier l'effet de cette polythérapie (CKI, Gleevec, Zolédronate) dans un modèle animal de cancer du sein qui forme spontanément des métastases dans les poumons et la moelle osseuse. Ce modèle que j'ai mis en place au laboratoire consiste à injecter des cellules murines de cancer du sein (4T1) dans la glande mammaire d'animaux immunocompétents. Ces cellules induisent une tumeur primaire qui, même après résection, métastase spontanément dans différents tissus dont la moelle osseuse. L'utilisation de ce modèle nous permettra de juger de l'efficacité de nouvelles thérapeutiques sur toutes les étapes de la tumorigénèse et de la cascade

métastatique. Nous espérons ainsi, grâce à l'utilisation de différents modèles expérimentaux de formation de métastases, que nous pourrions améliorer les thérapeutiques existantes en clinique.

PARTIE V.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adami, S., Supronik, J., and Hala, T. (2006). Effect of one year treatment with the cathepsin-K inhibitor, balicatib, on bone mineral density in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. *J Bone and Miner Res* 21, 1085 (abstract).
- Amhlaioibh, R. N., Hoeg-Andersen, P., Brunner, N., Sorensen, A., Winding, B., Holst-Hansen, C., Karsdal, M. A., Engsig, M. T., Delaisse, J. M., and Heegaard, A. M. (2004). Measurement of tumor load and distribution in a model of cancer-induced osteolysis: a necessary precaution when testing novel anti-resorptive therapies. *Clin Exp Metastasis* 21, 65-74.
- Amin, D., Cornell, S. A., Gustafson, S. K., Needle, S. J., Ullrich, J. W., Bilder, G. E., and Perrone, M. H. (1992). Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 33, 1657-1663.
- Bakewell, S. J., Nestor, P., Prasad, S., Tomasson, M. H., Dowland, N., Mehrotra, M., Scarborough, R., Kanter, J., Abe, K., Phillips, D., and Weilbaecher, K. N. (2003). Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14205-14210.
- Bamias, A., Kastritis, E., Bamia, C., Moulopoulos, L. A., Melakopoulos, I., Bozas, G., Koutsoukou, V., Gika, D., Anagnostopoulos, A., Papadimitriou, C., *et al.* (2005). Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 23, 8580-8587.
- Bandyopadhyay, A., Agyin, J. K., Wang, L., Tang, Y., Lei, X., Story, B. M., Cornell, J. E., Pollock, B. H., Mundy, G. R., and Sun, L. Z. (2006). Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res* 66, 6714-6721.
- Barnes, G. L., Hebert, K. E., Kamal, M., Javed, A., Einhorn, T. A., Lian, J. B., Stein, G. S., and Gerstenfeld, L. C. (2004). Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 64, 4506-4513.
- Baron, R. (2001). L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/Sciences* 17, 1260-1269.
- Baron, R. (2003). General principles of bone biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 5th ed American Society for Bone and Mineral Research, 1-8.
- Bellahcène, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clezardin, P., and Castronovo, V. (2007). Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101, 135-148.
- Bendre, M., Gaddy, D., Nicholas, R. W., and Suva, L. J. (2003a). Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP. *Clin Orthop Relat Res*, S39-45.
- Bendre, M. S., Gaddy-Kurten, D., Mon-Foote, T., Akel, N. S., Skinner, R. A., Nicholas, R. W., and Suva, L. J. (2002). Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res* 62, 5571-5579.
- Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., and Suva, L. J. (2003b). Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33, 28-37.

- Benford, H. L., Frith, J. C., Auriola, S., Monkkonen, J., and Rogers, M. J. (1999). Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* *56*, 131-140.
- Beresford, J. N., Fedarko, N. S., Fisher, L. W., Midura, R. J., Yanagishita, M., Termine, J. D., and Robey, P. G. (1987). Analysis of the proteoglycans synthesized by human bone cells in vitro. *J Biol Chem* *262*, 17164-17172.
- Bianco, P., Fisher, L. W., and Young, M. F. (1990). Expression and localization of the two small proteoglycans biglycans and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* *38*, 1549-1563.
- Bierie, B., and Moses, H. L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 506-520.
- Boissier, S., Ferreras, M., Peyruchaud, O., Magonetto, S., Ebetino, F. H., Colombel, M., Delmas, P., Delaisse, J. M., and Clezardin, P. (2000). Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* *60*, 2949-2954.
- Boissier, S., Magonetto, S., Frappart, L., Cuzin, B., Ebetino, F. H., Delmas, P. D., and Clezardin, P. (1997). Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* *57*, 3890-3894.
- Boucharaba, A., Serre, C. M., Gres, S., Saulnier-Blache, J. S., Bordet, J. C., Guglielmi, J., Clezardin, P., and Peyruchaud, O. (2004). Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* *114*, 1714-1725.
- Bouizar, Z., Spyrtos, F., and De vernejoul, M. C. (1999). The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene: use of downstream TATA promotor and PTHrP 1-139 coding pathways in primary breast cancers vary with the occurrence of bone metastasis. *J Bone Miner Res* *14*, 406-414.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein: At the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* *19*, 816-827.
- Breuil, V., Cosman, F., Stein, L., Horbert, W., Nieves, J., Shen, V., Lindsay, R., and Dempster, D. W. (1998). Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res* *13*, 1721-1729.
- Brown, J. E., Neville-Webbe, H., and Coleman, R. E. (2004). The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* *11*, 207-224.
- Brubaker, K. D., Vessella, R. L., True, L. D., Thomas, R., and Corey, E. (2003). Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res* *18*, 222-230.
- Bruzzaniti, A., and Baron, R. (2006). Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* *7*, 123-139.

- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., *et al.* (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* *12*, 1260-1268.
- Buhling, F., Gerber, A., Hackel, C., Kruger, S., Kohnlein, T., Bromme, D., Reinhold, D., Ansorge, S., and Welte, T. (1999). Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* *20*, 612-619.
- Bundred, N. J., Walker, R. A., Ratcliffe, W. A., Warwick, J., Morrison, J. M., and Ratcliffe, J. G. (1992). Parathyroid hormone related protein and skeletal morbidity in breast cancer. *Eur J Cancer* *28*, 690-692.
- Chen, P. S., Wang, M. Y., Wu, S. N., Su, J. L., Hong, C. C., Chuang, S. E., Chen, M. W., Hua, K. T., Wu, Y. L., Cha, S. T., *et al.* (2007). CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α v β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J Cell Sci* *120*, 2053-2065.
- Cheng, K. W., Lahad, J. P., Kuo, W. L., Lapuk, A., Yamada, K., Auersperg, N., Liu, J., Smith-McCune, K., Lu, K. H., Fishman, D., *et al.* (2004). The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* *10*, 1251-1256.
- Chenu, C., Pfeilschifter, J., Mundy, G. R., and Roodman, G. D. (1988). Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 5683-5687.
- Chiao, J. W., Moonga, B. S., Yang, Y. M., Kancherla, R., Mittelman, A., Wu-Wong, J. R., and Ahmed, T. (2000). Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer* *83*, 360-365.
- Clézardin, P., Ebetino, F. H., and Fournier, P. G. (2005). Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* *65*, 4971-4974.
- Clézardin, P., Fournier, P., Boissier, S., and Peyruchaud, O. (2003). In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. *Curr Med Chem* *10*, 173-180.
- Clines, G. A., and Guise, T. A. (2005). Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* *12*, 549-583.
- Clines, G. A., Mohammad, K. S., Bao, Y., Stephens, O. W., Suva, L. J., Shaughnessy, J. D., Jr., Fox, J. W., Chirgwin, J. M., and Guise, T. A. (2007). Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* *21*, 486-498.
- Coleman, R. E., and Rubens, R. D. (1987). The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* *55*, 61-66.
- Colucci, S., Minielli, V., Zambonin, G., Cirulli, N., Mori, G., Serra, M., Patella, V., Zambonin Zallone, A., and Grano, M. (1998). Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int* *63*, 230-235.

- Cooper, C. R., Bhatia, J. K., Muenchen, H. J., McLean, L., Hayasaka, S., Taylor, J., Poncza, P. J., and Pienta, K. J. (2002). The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by androgen dihydrotestosterone and cytokines. *Clin Exp Metastasis* *19*, 25-33.
- Corey, E., Brown, L. G., Quinn, J. E., Poot, M., Roudier, M. P., Higano, C. S., and Vessella, R. L. (2003). Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* *9*, 295-306.
- Cornish, J., Grey, A., Callon, K. E., Naot, D., Hill, B. L., Lin, C. Q., Balchin, L. M., and Reid, I. R. (2004). Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin, adrenomedullin, and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun* *318*, 240-246.
- Corso, A., Ferretti, E., Lunghi, M., Zappasodi, P., Mangiacavalli, S., De Amici, M., Rusconi, C., Varettoni, M., and Lazzarino, M. (2005). Zoledronic acid down-regulates adhesion molecules of bone marrow stromal cells in multiple myeloma: a possible mechanism for its antitumor effect. *Cancer* *104*, 118-125.
- Coxon, F. P., Helfrich, M. H., Larijani, B., Muzylak, M., Dunford, J. E., Marshall, D., McKinnon, A. D., Nesbitt, S. A., Horton, M. A., Seabra, M. C., *et al.* (2001). Identification of a novel phosphonocarboxylate inhibitor of Rab geranylgeranyl transferase that specifically prevents Rab prenylation in osteoclasts and macrophages. *J Biol Chem* *276*, 48213-48222.
- Coxon, F. P., and Rogers, M. J. (2003). The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* *72*, 80-84.
- Coxon, F. P., Thompson, K., and Rogers, M. J. (2006). Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol* *6*, 307-312.
- Coxon, J. P., Oades, G. M., Kirby, R. S., and Colston, K. W. (2004). Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int* *94*, 164-170.
- Cramer, S. D., Chen, Z., and Peehl, D. M. (1996). Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol* *156*, 526-531.
- Croucher, P. I., De Hendrik, R., Perry, M. J., Hijzen, A., Shipman, C. M., Lippitt, J., Green, J., Van Marck, E., Van Camp, B., and Vanderkerken, K. (2003). Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone and Miner Res*.
- Cruz, J. C., Alsina, M., Craig, F., Yoneda, T., Anderson, J. L., Dallas, M., and Roodman, G. D. (2001). Ibandronate decreases bone disease development and osteoclast activity in an in vivo model of human myeloma. *Exp Hematol* *29*, 441-447.
- Dai, J., Keller, J., Zhang, J., Lu, Y., Yao, Z., and Keller, E. T. (2005). Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res* *65*, 8274-8285.

Dallas, S. L., Rosser, J. L., Mundy, G. R., and Bonewald, L. F. (2002). Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 277, 21352-21360.

Dancey, J. E., and Chen, H. X. (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5, 649-659.

Daubiné, F., Le Gall, C., Gasser, J., Green, J., and Clezardin, P. (2007). Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 99, 322-330.

David, P., Nguyen, H., Barbier, A., and Baron, R. (1996). The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* 11, 1498-1507.

de Bruyn, K. M., Rangarajan, S., Reedquist, K. A., Figdor, C. G., and Bos, J. L. (2002). The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 277, 29468-29476.

De, S., Chen, J., Narizhneva, N. V., Heston, W., Brainard, J., Sage, E. H., and Byzova, T. V. (2003). Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 278, 39044-39050.

Deckers, M., van Dinther, M., Buijs, J., Que, I., Lowik, C., van der Pluijm, G., and ten Dijke, P. (2006). The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 2202-2209.

Delaisse, J. M., Andersen, T. L., Engsig, M. T., Henriksen, K., Troen, T., and Blavier, L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 61, 504-513.

Delany, A. M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R., and Canalis, E. (2000). Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 1325.

Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, J. P., Soria, J., and Soria, C. (2003). New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer* 88, 1631-1640.

Dewar, A. L., Cambareri, A. C., Zannettino, A. C., Miller, B. L., Doherty, K. V., Hughes, T. P., and Lyons, A. B. (2005). Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 105, 3127-3132.

Dewar, A. L., Farrugia, A. N., Condina, M. R., Bik To, L., Hughes, T. P., Vernon-Roberts, B., and Zannettino, A. C. (2006). Imatinib as a potential antiresorptive therapy for bone disease. *Blood* 107, 4334-4337.

Dimitroff, C. J., Descheny, L., Trujillo, N., Kim, R., Nguyen, V., Huang, W., Pienta, K. J., Kutok, J. L., and Rubin, M. A. (2005). Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* 65, 5750-5760.

- Dimitroff, C. J., Lechpammer, M., Long-Woodward, D., and Kutok, J. L. (2004). Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* 64, 5261-5269.
- Doerr, M. E., and Jones, J. I. (1996). The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271, 2443-2447.
- Dougall, W. C., and Chaisson, M. (2006). The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Rev* 25, 541-549.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., and Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344, 1031-1037.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., *et al.* (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448-452.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754.
- Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., Ebetino, F. H., and Rogers, M. J. (2001). Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 235-242.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Ye, J. Q., and Derynck, R. (1998). Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 9, 1903-1918.
- Evdokiou, A., Labrinidis, A., Bouralexis, S., Hay, S., and Findlay, D. M. (2003). Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone* 33, 216-228.
- Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., and Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17, 77-90.
- Everts, V., Korper, W., Hoeben, K. A., Jansen, I. D., Bromme, D., Cleutjens, K. B., Heeneman, S., Peters, C., Reinheckel, T., Saftig, P., and Beertsen, W. (2006). Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res* 21, 1399-1408.
- Feeley, B. T., Gamradt, S. C., Hsu, W. K., Liu, N., Krenek, L., Robbins, P., Huard, J., and Lieberman, J. R. (2005). Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res* 20, 2189-2199.
- Feeley, B. T., Krenek, L., Liu, N., Hsu, W. K., Gamradt, S. C., Schwarz, E. M., Huard, J., and Lieberman, J. R. (2006). Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 38, 154-166.

- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.
- Frediani, B., Spreafico, A., Capperucci, C., Chellini, F., Gambera, D., Ferrata, P., Baldi, F., Falsetti, P., Santucci, A., Bocchi, L., and Marcolongo, R. (2004). Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone* 35, 859-869.
- Frith, J. C., Monkkonen, J., Blackburn, G. M., Russell, R. G., and Rogers, M. J. (1997). Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12, 1358-1367.
- Fromigue, O., Kheddoumi, N., and Body, J. J. (2003). Bisphosphonates antagonise bone growth factors' effects on human breast cancer cells survival. *Br J Cancer* 89, 178-184.
- Gao, L., Deng, H., Zhao, H., Hirbe, A., Harding, J., Ratner, L., and Weilbaecher, K. (2005). HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition. *Blood* 106, 4294-4302.
- Garnero, P., Bianchi, F., Carlier, M. C., Genty, V., Jacob, N., Kamel, S., Kindermans, C., Plouvier, E., Pressac, M., and Souberbielle, J. C. (2000). [Biochemical markers of bone remodeling: pre-analytical variations and guidelines for their use. SFBC (Societe Francaise de Biologie Clinique) Work Group. Biochemical markers of bone remodeling]. *Ann Biol Clin (Paris)* 58, 683-704.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280, 33132-33140.
- Gay, C. V., Zheng, B., and Gilman, V. R. (2003). Co-detection of PTH/PTHrP receptor and tartrate resistant acid phosphatase in osteoclasts. *J Cell Biochem* 89, 902-908.
- Girasole, G., Passeri, G., Jilka, R. L., and Manolagas, S. C. (1994). Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 93, 1516-1524.
- Giraud, E., Inoue, M., and Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 114, 623-633.
- Giuliani, N., Pedrazzoni, M., Passeri, G., and Girasole, G. (1998). Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27, 38-41.
- Gokhale, J. A., Robey, P. G., and Boskey, A. L. (2001). The biochemistry of bone. In: Marcus, R, Feldman, D, Kelsey, A (eds) *Osteoporosis Vol 1 Academic Press, San Diego, CA, USA* 1, 107-188.
- Gouin, F., Ory, B., Redini, F., and Heymann, D. (2006). Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int J Cancer* 119, 980-984.
- Grabowski, U., Chambers, T. J., and Shiroo, M. (2005). Recent developments in cathepsin K inhibitor design. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8, 619-630.

- Green, J. R. (2003). Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97, 840-847.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C., and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420, 636-642.
- Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T. A., and Vaananen, H. K. (2005). Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 1095-1101.
- Guise, T. A., Mohammad, K. S., Clines, G., Stebbins, E. G., Wong, D. H., Higgins, L. S., Vessella, R., Corey, E., Padalecki, S., Suva, L., and Chirgwin, J. M. (2006). Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 12, 6213s-6216s.
- Guise, T. A., and Mundy, G. R. (1998). Cancer and bone. *Endocr Rev* 19, 18-54.
- Guise, T. A., Yin, J. J., and Mohammad, K. S. (2003). Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 97, 779-784.
- Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., and Mundy, G. R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98, 1544-1549.
- Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.
- Halasy-Nagy, J. M., Rodan, G. A., and Reszka, A. A. (2001). Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 29, 553-559.
- Hall, C. L., Bafico, A., Dai, J., Aaronson, S. A., and Keller, E. T. (2005). Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 65, 7554-7560.
- Hall, C. L., Dai, J., van Golen, K. L., Keller, E. T., and Long, M. W. (2006). Type I Collagen Receptor ($\alpha 2\beta 1$) Signaling Promotes the Growth of Human Prostate Cancer Cells within the Bone. *Cancer Res* 66, 8648-8654.
- Hall, D. G., and Stoica, G. (1994). Effect of the bisphosphonate risedronate on bone metastases in a rat mammary adenocarcinoma model system. *J Bone and Miner Res* 9, 221-230.
- Halleen, J. (2006). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. Review series Immunodiagnostic Systems (IDS) 3.
- Hashimoto, K., Morishige, K., Sawada, K., Tahara, M., Kawagishi, R., Ikebuchi, Y., Sakata, M., Tasaka, K., and Murata, Y. (2005). Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. *Cancer Res* 65, 540-545.
- Henderson, M., Danks, J., Moseley, J., Slavin, J., Harris, T., McKinlay, M., Hopper, J., and Martin, T. (2001). Parathyroid hormone-related protein production by breast cancers, improved survival, and reduced bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 93, 234-237.

- Henderson, M. A., Danks, J. A., Slavin, J. L., Byrnes, G. B., Choong, P. F., Spillane, J. B., Hopper, J. L., and Martin, T. J. (2006). Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. *Cancer Res* 66, 2250-2256.
- Henthorn, P. S. (1996). Alkaline Phosphatase. In: Bilezikian, J.P., Raisz L.A., Rodan, G.A. (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 197-216.
- Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W., and Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8, 727-738.
- Hillner, B. E., Ingle, J. N., Berenson, J. R., Janjan, N. A., Albain, K. S., Lipton, A., Yee, G., Biermann, J. S., Chlebowski, R. T., and Pfister, D. G. (2000). American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel. *J Clin Oncol* 18, 1378-1391.
- Hiraga, T., Myoui, A., Choi, M. E., Yoshikawa, H., and Yoneda, T. (2006). Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 66, 2067-2073.
- Hiraga, T., Williams, P. J., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (2001). The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res* 61, 4418-4424.
- Hiraga, T., Williams, P. J., Ueda, A., Tamura, D., and Yoneda, T. (2004). Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 10, 4559-4567.
- Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 313-335.
- Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M., and Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132, 49-60.
- Huang, J. C., Sakata, T., Pflieger, L. L., Bencsik, M., Halloran, B. P., Bikle, D. D., and Nissenson, R. A. (2004). PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 19, 235-244.
- Hunter, G. K., and Goldberg, H. A. (1993). Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8562-8565.
- Ilvesaro, J., Metsikko, K., Vaananen, K., and Tuukkanen, J. (1999). Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells. *J Bone Miner Res* 14, 1338-1344.
- Im, G. I., Qureshi, S. A., Kenney, J., Rubash, H. E., and Shanbhag, A. S. (2004). Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 25, 4105-4115.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M., and Rauvala, H. (1998). Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Cell Biol* 143, 1113-1128.

- Iwamura, M., Hellman, J., Cockett, A. T., Lilja, H., and Gershagen, S. (1996). Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology* 48, 317-325.
- Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., and Kleinman, H. K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 59, 4453-4457.
- Jagdev, S. P., Coleman, R. E., Shipman, C. M., Rostami, H. A., and Croucher, P. I. (2001). The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 84, 1126-1134.
- Javed, A., Barnes, G. L., Pratap, J., Antkowiak, T., Gerstenfeld, L. C., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., and Stein, G. S. (2005). Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1454-1459.
- Javelaud, D., Mohammad, K. S., McKenna, C. R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., Andre, J., Delmas, V., Larue, L., Guise, T. A., and Mauviel, A. (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res* 67, 2317-2324.
- Jones, D. H., Nakashima, T., Sanchez, O. H., Kozieradzki, I., Komarova, S. V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C. V., *et al.* (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692-696.
- Kakonen, S. M., Selander, K. S., Chirgwin, J. M., Yin, J. J., Burns, S., Rankin, W. A., Grubbs, B. G., Dallas, M., Cui, Y., and Guise, T. A. (2002). Transforming growth factor-beta stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via Smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 277, 24571-24578.
- Kaneda, T., Nojima, T., Nakagawa, M., Ogasawara, A., Kaneko, H., Sato, T., Mano, H., Kumegawa, M., and Hakeda, Y. (2000). Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol* 165, 4254-4263.
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G. P., Serganova, I., Chen, C. R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W. L., and Massague, J. (2005). Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13909-13914.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., and Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537-549.
- Karadag, A., Ogbureke, K. U., Fedarko, N. S., and Fisher, L. W. (2004). Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J Natl Cancer Inst* 96, 956-965.
- Keller, R. K., and Fliesler, S. J. (1999). Mechanism of aminobisphosphonate action: characterization of alendronate inhibition of the isoprenoid pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 560-563.

- Khan, S. A., Kanis, J. A., Vasikaran, S., Kline, W. F., Matuszewski, B. K., McCloskey, E. V., Beneton, M. N., Gertz, B. J., Sciberras, D. G., Holland, S. D., *et al.* (1997). Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 12, 1700-1707.
- Kim, S. J., Uehara, H., Yazici, S., Busby, J. E., Nakamura, T., He, J., Maya, M., Logothetis, C., Mathew, P., Wang, X., *et al.* (2006). Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98, 783-793.
- Kim, S. J., Uehara, H., Yazici, S., He, J., Langley, R. R., Mathew, P., Fan, D., and Fidler, I. J. (2005). Modulation of bone microenvironment with zoledronate enhances the therapeutic effects of STI571 and paclitaxel against experimental bone metastasis of human prostate cancer. *Cancer Res* 65, 3707-3715.
- Kitagawa, Y., Dai, J., Zhang, J., Keller, J. M., Nor, J., Yao, Z., and Keller, E. T. (2005). Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer-mediated osteoblastic activity. *Cancer Res* 65, 10921-10929.
- Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J., and Vasioukhin, V. (2004). Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Cell* 6, 185-195.
- Kloog, Y., and Cox, A. D. (2004). Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin Cancer Biol* 14, 253-261.
- Kohno, N., Kitazawa, S., Fukase, M., Sakoda, Y., Kanbara, Y., Furuya, Y., Ohashi, O., Ishikawa, Y., and Saitoh, Y. (1994). The expression of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer with skeletal metastases. *Surg Today* 24, 215-220.
- Kominsky, S. L., Doucet, M., Brady, K., and Weber, K. L. (2007). TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. *J Bone Miner Res* 22, 37-44.
- Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99, 1233-1239.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A. J., Van, G., Itie, A., *et al.* (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.
- Krishnan, V., Moore, T. L., Ma, Y. L., Helvering, L. M., Frolik, C. A., Valasek, K. M., Ducy, P., and Geiser, A. G. (2003). Parathyroid hormone bone anabolic action requires *Cbfa1/Runx2*-dependent signaling. *Mol Endocrinol* 17, 423-435.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.

- Laing, K. J., and Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28, 443-460.
- Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 12, 634-640.
- Le Brun, G., Aubin, P., Soliman, H., Ropiquet, F., Villette, J. M., Berthon, P., Creminon, C., Cussenot, O., and Fiet, J. (1999). Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1beta, TNF-alpha, and TGF-beta in the PC3 human prostate cancer cell line. *Cytokine* 11, 157-162.
- Le Gall, C., Bellahcène, A., Bonnelye, E., Gasser, J. A., Castronovo, V., Green, J., Zimmermann, J., and Clezardin, P. (2007). A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer-induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res*, October 15.
- Lee, M. H., Kwon, T. G., Park, H. S., Wozney, J. M., and Ryoo, H. M. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 689-694.
- Lee, M. V., Fong, E. M., Singer, F. R., and Guenette, R. S. (2001). Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 61, 2602-2608.
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., *et al.* (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
- Lehenkari, P. P., Kellinsalmi, M., Napankangas, J. P., Ylitalo, K. V., Monkkonen, J., Rogers, M. J., Azhayev, A., Vaananen, H. K., and Hassinen, I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* 61, 1255-1262.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C. T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16, 143-163.
- Lev, D. C., Kim, S. J., Onn, A., Stone, V., Nam, D. H., Yazici, S., Fidler, I. J., and Price, J. E. (2005). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling restricts the growth of human breast cancer in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 11, 306-314.
- Lian, J. B. (2003). Bone formation : maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 5th ed American Society for Bone and Mineral Research, 13-28.
- Liang, Z., Wu, T., Lou, H., Yu, X., Taichman, R. S., Lau, S. K., Nie, S., Umbreit, J., and Shim, H. (2004). Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 64, 4302-4308.
- Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M. M., Williams, L., and Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65, 967-971.
- Liao, J., Schneider, A., Datta, N. S., and McCauley, L. K. (2006). Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res* 66, 9065-9073.

- Lin, D. L., Tarnowski, C. P., Zhang, J., Dai, J., Rohn, E., Patel, A. H., Morris, M. D., and Keller, E. T. (2001). Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate* 47, 212-221.
- Littlewood-Evans, A. J., Bilbe, G., Bowler, W. B., Farley, D., Wlodarski, B., Kokubo, T., Inaoka, T., Sloane, J., Evans, D. B., and Gallagher, J. A. (1997). The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 57, 5386-5390.
- Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yao, S., and Levine, A. C. (2006). Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 225-233.
- Logothetis, C. J., and Lin, S. H. (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5, 21-28.
- Lowe, L. C., Senaratne, S. G., and Colston, K. W. (2005). Induction of apoptosis in breast cancer cells by apomine is mediated by caspase and p38 mitogen activated protein kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 772-779.
- Luckman, S. P., Coxon, F. P., Ebetino, F. H., Russell, R. G., and Rogers, M. J. (1998). Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* 13, 1668-1678.
- Luo, G., Ducey, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., and Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78-81.
- Luo, J. L., Tan, W., Ricono, J. M., Korchynskyi, O., Zhang, M., Gonias, S. L., Cheresch, D. A., and Karin, M. (2007). Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446, 690-694.
- Lynch, C. C., Hikosaka, A., Acuff, H. B., Martin, M. D., Kawai, N., Singh, R. K., Vargo-Gogola, T. C., Begtrup, J. L., Peterson, T. E., Fingleton, B., *et al.* (2005). MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* 7, 485-496.
- Manolagas, S. C., and Jilka, R. L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332, 305-311.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G. H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., and Wu, D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809.
- Marie, P., and De vernejoul, M. C. (1996). Facteurs systémiques et locaux du remodelage osseux. In: Kuntz D (ed) *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte* Flammarion, 49-68.
- Martin, R. B. (2000). Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 26, 1-6.

Mathew, P., Thall, P. F., Bucana, C. D., Oh, W. K., Morris, M. J., Jones, D. M., Johnson, M. M., Wen, S., Pagliaro, L. C., and Tannir, N. M. (2007). Platelet-derived growth factor receptor inhibition and chemotherapy for castration-resistant prostate cancer with bone metastases. *Clin Cancer Res* 13, 5816-5824.

Matsumoto, S., Kimura, S., Segawa, H., Kuroda, J., Yuasa, T., Sato, K., Nogawa, M., Tanaka, F., Maekawa, T., and Wada, H. (2005). Efficacy of the third-generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 47, 31-39.

Matsuura, N., Puzon-McLaughlin, W., Irie, A., Morikawa, Y., Kakudo, K., and Takada, Y. (1996). Induction of experimental bone metastasis in mice by transfection of integrin alpha 4 beta 1 into tumor cells. *Am J Pathol* 148, 55-61.

McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., and Foord, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393, 333-339.

McTaggart, S. J. (2006). Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 255-267.

Merle, B., Malaval, L., Lawler, J., Delmas, P., and Clézardin, P. (1997). Decorin inhibits cell attachment to Thrombospondine-1 by binding to a KKTR-dependant cell adhesive site present within the N-terminal domain of Thrombospondine-1. *J Cell Biochem* 67, 75-83.

Michigami, T., Hiraga, T., Williams, P. J., Niewolna, M., Nishimura, R., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (2002). The effect of the bisphosphonate ibandronate on breast cancer metastasis to visceral organs. *Breast Cancer Res Treat* 75, 249-258.

Michigami, T., Shimizu, N., Williams, P. J., Niewolna, M., Dallas, S. L., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (2000). Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* 96, 1953-1960.

Migliorati, C. A. (2003). Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol* 21, 4253-4254.

Miwa, S., Mizokami, A., Keller, E. T., Taichman, R., Zhang, J., and Namiki, M. (2005). The bisphosphonate YM529 inhibits osteolytic and osteoblastic changes and CXCR-4-induced invasion in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 8818-8825.

Mönkkönen, H., Auriola, S., Lehenkari, P., Kellinsalmi, M., Hassinen, I. E., Vepsäläinen, J., and Monkkonen, J. (2006a). A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* 147, 437-445.

Mönkkönen, H., Ottewill, P., Holen, I., Evans, A., Lefley, D., and Kuokkanen, J. (2006b). Zoledronic acid induced IPP/ApppI accumulation in different cancer cell lines and in vivo. VI International Conference on Cancer-Induced Bone Disease (CIBD) San Antonio, Texas, USA, December 10-14.

- Mori, Y., Shimizu, N., Dallas, M., Niewolna, M., Story, B., Williams, P. J., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (2004). Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* *104*, 2149-2154.
- Morony, S., Capparelli, C., Sarosi, I., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., and Kostenuik, P. J. (2001). Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* *61*, 4432-4436.
- Mulari, M. T., Qu, Q., Harkonen, P. L., and Vaananen, H. K. (2004). Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calcif Tissue Int* *75*, 253-261.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50-56.
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* *2*, 584-593.
- Mundy, G. R. (2003). Bone remodeling. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 5th ed American Society for Bone and Mineral Research, 46-58.
- Mundy, G. R., and Poser, J. W. (1983). Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcif Tissue Int* *35*, 164-168.
- Mundy, G. R., Yoneda, T., and Hiraga, T. (2001). Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates: impact on the bone microenvironment. *Semin Oncol* *28*, 35-44.
- Nagashima, M., Sakai, A., Uchida, S., Tanaka, S., Tanaka, M., and Nakamura, T. (2005). Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone* *36*, 502-511.
- Nakamura, E. S., Koizumi, K., Kobayashi, M., Saitoh, Y., Arita, Y., Nakayama, T., Sakurai, H., Yoshie, O., and Saiki, I. (2006). RANKL-induced CCL22/macrophage-derived chemokine produced from osteoclasts potentially promotes the bone metastasis of lung cancer expressing its receptor CCR4. *Clin Exp Metastasis* *23*, 9-18.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17-29.
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P. (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* *3*, 110-116.
- Nelson, J. B., Hedican, S. P., George, D. J., Reddi, A. H., Piantadosi, S., Eisenberger, M. A., and Simons, J. W. (1995). Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* *1*, 944-949.

- Neudert, M., Fischer, C., Krempien, B., Bauss, F., and Seibel, M. J. (2003). Site-specific human breast cancer (MDA-MB-231) metastases in nude rats: model characterisation and in vivo effects of ibandronate on tumour growth. *Int J Cancer* *107*, 468-477.
- Neville-Webbe, H. L., Rostami-Hodjegan, A., Evans, C. A., Coleman, R. E., and Holen, I. (2005). Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. *Int J Cancer* *113*, 364-371.
- Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S., and Kodama, H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* *190*, 293-298.
- Nishikawa, M., Yamamoto, M., Murakami, T., Akatsu, T., Kugai, N., and Nagata, N. (1998). A third-generation bisphosphonate, YM175, inhibits osteoclast formation in murine cocultures by inhibiting proliferation of precursor cells via supporting cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res* *13*, 986-995.
- Noble, B. S., Peet, N., Stevens, H. Y., Brabbs, A., Mosley, J. R., Reilly, G. C., Reeve, J., Skerry, T. M., and Lanyon, L. E. (2003). Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* *284*, C934-943.
- Noda, M., and Denhardt, D. T. (2002). Osteopontin. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G. and Rodan, G.A. (eds.) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 235-250.
- Oades, G. M., Senaratne, S. G., Clarke, I. A., Kirby, R. S., and Colston, K. W. (2003). Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J Urol* *170*, 246-252.
- Odvina, C. V., Zerwekh, J. E., Rao, D. S., Maalouf, N., Gottschalk, F. A., and Pak, C. Y. (2005). Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 1294-1301.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., *et al.* (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* *89*, 765-771.
- Pan, B., Farrugia, A. N., To, L. B., Findlay, D. M., Green, J., Lynch, K., and Zannettino, A. C. (2004a). The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* *19*, 147-154.
- Pan, B., To, L. B., Farrugia, A. N., Findlay, D. M., Green, J., Gronthos, S., Evdokiou, A., Lynch, K., Atkins, G. J., and Zannettino, A. C. (2004b). The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* *34*, 112-123.
- Parikka, V., Vaananen, A., Risteli, J., Salo, T., Sorsa, T., Vaananen, H. K., and Lehenkari, P. (2005). Human mesenchymal stem cell derived osteoblasts degrade organic bone matrix in vitro by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol* *24*, 438-447.

Park, B. K., Zhang, H., Zeng, Q., Dai, J., Keller, E. T., Giordano, T., Gu, K., Shah, V., Pei, L., Zarbo, R. J., *et al.* (2007). NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med* 13, 62-69.

Pecheur, I., Peyruchaud, O., Serre, C. M., Guglielmi, J., Volland, C., Bourre, F., Margue, C., Cohen-Solal, M., Buffet, A., Kieffer, N., and Clezardin, P. (2002). Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *Faseb J* 16, 1266-1268.

Peyruchaud, O., Winding, B., Pecheur, I., Serre, C. M., Delmas, P., and Clezardin, P. (2001). Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J Bone Miner Res* 16, 2027-2034.

Pollock, J. H., Blaha, M. J., Lavish, S. A., Stevenson, S., and Greenfield, E. M. (1996). In vivo demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor. *J Bone Miner Res* 11, 754-759.

Poole, K. E., van Bezooijen, R. L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., Lowik, C. W., and Reeve, J. (2005). Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* 19, 1842-1844.

Pourpak, A., Dorr, R. T., Meyers, R. O., Powell, M. B., and Stratton, S. P. (2007). Cytotoxic activity of Apomine is due to a novel membrane-mediated cytolytic mechanism independent of apoptosis in the A375 human melanoma cell line. *Invest New Drugs* 25, 107-114.

Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E. S., Subramaniam, M., Ingle, J. N., and Spelsberg, T. C. (2000). Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60, 6001-6007.

Robey, P. G., and Boskey, A. L. (2003). Extracellular matrix and biomineralization of bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 5th ed American Society of Bone and Mineral Research, 38-46.

Rogers, M. J., Brown, R. J., Hodkin, V., Blackburn, G. M., Russell, R. G., and Watts, D. J. (1996). Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 863-869.

Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., and Frith, J. C. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961-2978.

Rogers, M. J., Xiong, X., Brown, R. J., Watts, D. J., Russell, R. G., Bayless, A. V., and Ebetino, F. H. (1995). Structure-activity relationships of new heterocycle-containing bisphosphonates as inhibitors of bone resorption and as inhibitors of growth of *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Mol Pharmacol* 47, 398-402.

Romberger, D. J. (1997). Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 939-943.

Roodman, G. D. (2006). Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 100-109.

- Ruggiero, S. L., Mehrotra, B., Rosenberg, T. J., and Engroff, S. L. (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 527-534.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P., and von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13453-13458.
- Sahni, M., Guenther, H. L., Fleisch, H., Collin, P., and Martin, T. J. (1993). Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 91, 2004-2011.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D., and Jurdic, P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell* 15, 5231-5241.
- Sanders, J. L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., and Brown, E. M. (2001). Ca(2+)-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E1267-1274.
- Sanders, J. L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Butters, R. R., and Brown, E. M. (2000). Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 141, 4357-4364.
- Sanna, G., Preda, L., Bruschini, R., Cossu Rocca, M., Ferretti, S., Adamoli, L., Verri, E., Franceschelli, L., Goldhirsch, A., and Nole, F. (2006). Bisphosphonates and jaw osteonecrosis in patients with advanced breast cancer. *Ann Oncol* 17, 1512-1516.
- Sanna, G., Zampino, M. G., Pelosi, G., Nole, F., and Goldhirsch, A. (2005). Jaw avascular bone necrosis associated with long-term use of bisphosphonates. *Ann Oncol* 16, 1207-1208.
- Santini, D., Vincenzi, B., Dicuonzo, G., Avvisati, G., Massacesi, C., Battistoni, F., Gavasci, M., Rocci, L., Tirindelli, M. C., Altomare, V., *et al.* (2003a). Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 2893-2897.
- Santini, D., Vincenzi, B., Tonini, G., Scarpa, S., and Baldi, A. (2003b). Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 3215; author reply 3216.
- Sasaki, A., Boyce, B. F., Story, B., Wright, K. R., Chapman, M., Boyce, R., Mundy, G. R., and Yoneda, T. (1995). Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res* 55, 3551-3557.
- Sasaki, A., Kitamura, K., Alcalde, R. E., Tanaka, T., Suzuki, A., Etoh, Y., and Matsumara, T. (1998). Effect of a newly developed bisphosphonate, YH529, on osteolytic bone metastases in nude mice. *Int J Cancer* 77, 279-285.

- Sato, K., Yuasa, T., Nogawa, M., Kimura, S., Segawa, H., Yokota, A., and Maekawa, T. (2006). A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 95, 1354-1361.
- Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E., and Rodan, G. A. (1991). Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88, 2095-2105.
- Sato, Y., Sakai, H., Kobayashi, Y., Shibasaki, Y., and Sasaki, T. (2000). Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H(+)-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Rec* 260, 72-80.
- Schmidt, G., Robenek, H., Harrach, B., Glossl, J., Nolte, V., Hormann, H., Richter, H., and Kresse, H. (1987). Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin. *J Cell Biol* 104, 1683-1691.
- Schwartz, I., Seger, D., and Shaltiel, S. (1999). Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 539-544.
- Schwaninger, R., Rentsch, C. A., Wetterwald, A., van der Horst, G., van Bezooijen, R. L., van der Pluijm, G., Lowik, C. W., Ackermann, K., Pyerin, W., Hamdy, F. C., *et al.* (2007). Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am J Pathol* 170, 160-175.
- Selvamurugan, N., Kwok, S., and Partridge, N. C. (2004). Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 279, 27764-27773.
- Senaratne, S. G., Mansi, J. L., and Colston, K. W. (2002). The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *Br J Cancer* 86, 1479-1486.
- Shimo, T., Kubota, S., Yoshioka, N., Ibaragi, S., Isowa, S., Eguchi, T., Sasaki, A., and Takigawa, M. (2006). Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Res* 21, 1045-1059.
- Shipman, C. M., Croucher, P. I., Russell, R. G., Helfrich, M. H., and Rogers, M. J. (1998). The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 58, 5294-5297.
- Shulby, S. A., Dolloff, N. G., Stearns, M. E., Meucci, O., and Fatatis, A. (2004). CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 4693-4698.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
- Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ayers, G. D., Wei, C., and Lucci, A. (2007). COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene* 26, 3789-3796.

- Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., and Lucci, A. (2006a). COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells. *J Surg Res* 131, 267-275.
- Singh, B., Berry, J. A., Vincent, L. E., and Lucci, A. (2006b). Involvement of IL-8 in COX-2-mediated bone metastases from breast cancer. *J Surg Res* 134, 44-51.
- Sipkins, D. A., Wei, X., Wu, J. W., Runnels, J. M., Cote, D., Means, T. K., Luster, A. D., Scadden, D. T., and Lin, C. P. (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435, 969-973.
- Sohara, Y., Shimada, H., Scadeng, M., Pollack, H., Yamada, S., Ye, W., Reynolds, C. P., and DeClerck, Y. A. (2003). Lytic bone lesions in human neuroblastoma xenograft involve osteoclast recruitment and are inhibited by bisphosphonate. *Cancer Res* 63, 3026-3031.
- Sotiriou, C., Lacroix, M., Lespagnard, L., Larsimont, D., Paesmans, M., and Body, J. J. (2001). Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. *Cancer Lett* 169, 87-95.
- Stearns, M. E., and Wang, M. (1996). Effects of alendronate and taxol on PC-3 ML cell bone metastases in SCID mice. *Invasion Metastasis* 16, 116-131.
- Stresing, V., Daubine, F., Benzaid, I., Monkkonen, H., and Clezardin, P. (2007). Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett* 257, 16-35.
- Sun, Y. X., Fang, M., Wang, J., Cooper, C. R., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2007). Expression and activation of alpha(v)beta(3) integrins by SDF-1/CXCL12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* 67, 61-73.
- Sun, Y. X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N. I., Koh-Paige, A. J., Shim, H., *et al.* (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res* 20, 318-329.
- Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J. E., Winkler, D. G., and Latham, J. A. (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 35, 828-835.
- Takami, M., Suda, K., Sahara, T., Itoh, K., Nagai, K., Sasaki, T., Udagawa, N., and Takahashi, N. (2003). Involvement of vacuolar H⁺-ATPase in incorporation of risedronate into osteoclasts. *Bone* 32, 341-349.
- Tasab, M., Batten, M. R., and Bulleid, N. J. (2000). Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *Embo J* 19, 2204-2211.
- Tassone, P., Tagliaferri, P., Viscomi, C., Palmieri, C., Caraglia, M., D'Alessandro, A., Galea, E., Goel, A., Abbruzzese, A., Boland, C. R., and Venuta, S. (2003). Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *Br J Cancer* 88, 1971-1978.
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.

- Terpos, E., Politou, M., Szydlo, R., Nadal, E., Avery, S., Olavarria, E., Kanfer, E., Goldman, J. M., Apperley, J. F., and Rahemtulla, A. (2004). Autologous stem cell transplantation normalizes abnormal bone remodeling and sRANKL/osteoprotegerin ratio in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 18, 1420-1426.
- Thomas, R. J., Guise, T. A., Yin, J. J., Elliott, J., Horwood, N. J., Martin, T. J., and Gillespie, M. T. (1999). Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 140, 4451-4458.
- Thompson, K., Rogers, M. J., Coxon, F. P., and Crockett, J. C. (2006). Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 69, 1624-1632.
- Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J. D., Jr. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349, 2483-2494.
- Tometsko, M., Armstrong, A., Miller, R., Jones, J., Chaisson, M., Branstetter, D., and Dougall, W. (2004). RANK ligand directly induces osteoclastogenic, angiogenic, chemoattractive and invasive factors on RANK-expressing human cancer cells MDA-MB-231 and PC-3. *J Bone Miner Res* 19, S25.
- Toru, J., and Akira, M. (2001). Blockade of IGF signaling and NF-kappaB activation inhibits bone metastases in breast cancer. *J Bone and Miner Metab*, 19S:39.
- Uehara, H., Kim, S. J., Karashima, T., Shepherd, D. L., Fan, D., Tsan, R., Killion, J. J., Logothetis, C., Mathew, P., and Fidler, I. J. (2003). Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 95, 458-470.
- Van Beek, E. R., Lowik, C. W., and Papapoulos, S. E. (2002). Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone* 30, 64-70.
- van der Pluijm, G., Sijmons, B., Vloedgraven, H., van der Bent, C., Drijfhout, J. W., Verheijen, J., Quax, P., Karperien, M., Papapoulos, S., and Lowik, C. (2001). Urokinase-receptor/integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer in vivo. *Am J Pathol* 159, 971-982.
- van der Pluijm, G., Vloedgraven, H., van Beek, E., van der Wee-Pals, L., Lowik, C., and Papapoulos, S. (1996). Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *J Clin Invest* 98, 698-705.
- Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K. H., Blaschke, S., Grundker, C., and Hofbauer, L. C. (2002). Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 680-686.
- Virtanen, S. S., Vaananen, H. K., Harkonen, P. L., and Lakkakorpi, P. T. (2002). Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 62, 2708-2714.

- Vogel, K. G., Paulsson, M., and Heinegard, D. (1984). Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223, 587-597.
- Voorzanger-Rousselot, N., Goehrig, D., Journe, F., Doriath, V., Body, J. J., Clezardin, P., and Garnero, P. (2007). Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* 97, 964-970.
- Wada, A., Fukui, K., Sawai, Y., Imanaka, K., Kiso, S., Tamura, S., Shimomura, I., and Hayashi, N. (2006). Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 44, 142-150.
- Wakchoure, S., Merrell, M. A., Aldrich, W., Millender-Swain, T., Harris, K. W., Triozzi, P., and Selander, K. S. (2006). Bisphosphonates inhibit the growth of mesothelioma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 2862-2868.
- Walther, H. (1948). *Krebmetastasen*. Verlag Bs, editor Basel, Switzerland.
- Westendorf, J. J., Kahler, R. A., and Schroeder, T. M. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19-39.
- Wysolmerski, J. J., Dann, P. R., Zelazny, E., Dunbar, M. E., Insogna, K. L., Guise, T. A., and Perkins, A. S. (2002). Overexpression of parathyroid hormone-related protein causes hypercalcemia but not bone metastases in a murine model of mammary tumorigenesis. *J Bone Miner Res* 17, 1164-1170.
- Yamagishi, S., Abe, R., Inagaki, Y., Nakamura, K., Sugawara, H., Inokuma, D., Nakamura, H., Shimizu, T., Takeuchi, M., Yoshimura, A., *et al.* (2004). Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *Am J Pathol* 165, 1865-1874.
- Yamagushi, Y., Mann, D. M., and Ruoslahti, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-284.
- Yano, S., Zhang, H., Hanibuchi, M., Miki, T., Goto, H., Uehara, H., and Sone, S. (2003). Combined therapy with a new bisphosphonate, minodronate (YM529), and chemotherapy for multiple organ metastases of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 9, 5380-5385.
- Yeung, F., Law, W. K., Yeh, C. H., Westendorf, J. J., Zhang, Y., Wang, R., Kao, C., and Chung, L. W. (2002). Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-independent human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277, 2468-2476.
- Yi, B., Williams, P. J., Niewolna, M., Wang, Y., and Yoneda, T. (2002). Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer. *Cancer Res* 62, 917-923.
- Yin, J. J., Mohammad, K. S., Kakonen, S. M., Harris, S., Wu-Wong, J. R., Wessale, J. L., Padley, R. J., Garrett, I. R., Chirgwin, J. M., and Guise, T. A. (2003). A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10954-10959.

Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G. R., and Guise, T. A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103, 197-206.

Yoneda, T. (1995). Growth of metastatic cancer cells in bone is enhanced by bone-derived insulin-like growth factors (IGFs). *J Bone Miner Res* 10, S269.

Yoneda, T., Sasaki, A., Dunstan, C., Williams, P. J., Bauss, F., De Clerck, Y. A., and Mundy, G. R. (1997). Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 99, 2509-2517.

Yonou, H., Kanomata, N., Goya, M., Kamijo, T., Yokose, T., Hasebe, T., Nagai, K., Hatano, T., Ogawa, Y., and Ochiai, A. (2003). Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 63, 2096-2102.

Yoshida, A., Nakamura, Y., Shimizu, A., Harada, M., Kameda, Y., Nagano, A., Inaba, M., and Asaga, T. (2000). Significance of the parathyroid hormone-related protein expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 7, 215-220.

Zayzafoon, M., Abdulkadir, S. A., and McDonald, J. M. (2004). Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem* 279, 3662-3670.

Zhang, H., Yano, S., Miki, T., Goto, H., Kanematsu, T., Muguruma, H., Uehara, H., and Sone, S. (2003). A novel bisphosphonate minodronate (YM529) specifically inhibits osteolytic bone metastasis produced by human small-cell lung cancer cells in NK-cell depleted SCID mice. *Clin Exp Metastasis* 20, 153-159.

Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D. L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., and Keller, E. T. (2001). Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 107, 1235-1244.

Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., Pujuguet, P., Peyruchaud, O., Baron, R., Clement-Lacroix, P., and Clezardin, P. (2007). Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* 67, 5821-5830.

Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.

PARTIE VI. ANNEXE

A Cathepsin K Inhibitor Reduces Breast Cancer–Induced Osteolysis and Skeletal Tumor Burden

Céline Le Gall,^{1,2} Akeila Bellahcène,³ Edith Bonnelye,^{1,2} Jürg A. Gasser,⁴ Vincent Castronovo,³ Jonathan Green,⁴ Johann Zimmermann,⁴ and Philippe Clézardin^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 664, IFR62, Lyon, France; ²Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France; ³Metastasis Research Laboratory, University of Liège, Liège, Belgium; and ⁴Novartis Institutes for Biomedical Research, Basle, Switzerland

Abstract

Osteoclasts mediate bone destruction in breast cancer skeletal metastases. Cathepsin K is a proteinase that is secreted by osteoclasts and degrades bone. Here, immunohistochemistry revealed that cathepsin K was expressed not only by osteoclasts but also by breast cancer cells that metastasize to bone. Following intratibial injection with cathepsin K–expressing human BT474 breast cancer cells, tumor-bearing mice treated with a clinical dosing regimen of cathepsin K inhibitor (CKI; 50 mg/kg, twice daily) had osteolytic lesions that were 79% smaller than those of tumor-bearing mice treated with the vehicle. The effect of CKI was also studied in a mouse model in which the i.v. inoculation of human B02 breast cancer cells expressing cathepsin K leads to bone metastasis formation. Drug administration was started before (preventive protocol) or after (treatment protocol) the occurrence of osteolytic lesions. In treatment protocols, CKI (50 mg/kg, twice daily) or a single clinical dose of 100 µg/kg zoledronic acid (osteoclast inhibitor) reduced the progression of osteolytic lesions by 59% to 66%. CKI therapy also reduced skeletal tumor burden by 62% compared with vehicle, whereas zoledronic acid did not decrease the tumor burden. The efficacy of CKI at inhibiting skeletal tumor burden was similar in the treatment and preventive protocols. By contrast, CKI did not block the growth of s.c. B02 tumor xenografts in animals. Thus, CKI may render the bone a less favorable microenvironment for tumor growth by inhibiting bone resorption. These findings raise the possibility that cathepsin K could be a therapeutic target for the treatment of bone metastases. [Cancer Res 2007;67(20):1–9]

Introduction

Bone metastases are common complications of breast cancer (1, 2). They can be fatal or may rapidly impede the quality of life (1, 2). Bone-residing breast cancer cells do not directly destroy bone (2). Instead, they secrete molecules like parathyroid hormone–related protein, interleukins (IL-6, IL-8, and IL-11), and prostaglandins that stimulate osteoclast activity, leading to osteolysis (2–6).

Osteoclasts are large multinucleated cells formed by fusion of mononuclear monocyte-macrophage progenitors whose differenti-

ation is principally regulated by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and macrophage colony-stimulating factor (7). Osteoclasts are the bone resorptive cells. They resorb bone by secreting protons and a lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K (7). Protons dissolve bone mineral and provide an acidic microenvironment enabling cathepsin K to degrade the demineralized collagenous matrix (7). The most compelling evidence that cathepsin K is involved in osteoclast-mediated bone resorption comes from the demonstration that cathepsin K–knockout mice display an osteopetrotic phenotype associated with a severe impairment of the resorptive activity of osteoclasts (8).

The observation that osteoclasts play a pivotal role in the formation of osteolytic lesions has provided the rationale for using bisphosphonates as potent inhibitors of osteoclast-mediated bone resorption in the treatment of breast cancer patients with bone metastases (1). Bisphosphonates bind avidly to bone mineral, and those containing a nitrogen moiety in their structure target osteoclast farnesyl diphosphate synthase, a key enzyme in the mevalonate pathway (9, 10). The inhibition of farnesyl diphosphate synthase by nitrogen-containing bisphosphonates prevents the prenylation of small GTPases that are essential for osteoclast activity and survival, thereby causing a reduction of bone resorption (1). Yet, in the clinic, bisphosphonate treatment is only palliative and does not provide a life-prolonging benefit to the majority of patients with advanced cancer (1). New therapeutics targeting osteoclast activity are therefore required. They could be used in combination with bisphosphonates to more efficiently treat breast cancer patients with bone metastases.

This need could be fulfilled by cathepsin K inhibitors (CKI). They have successfully been used in the treatment of bone loss associated with osteoporosis (11). In addition, cathepsin K is expressed by human breast cancer cells in skeletal metastases (12), suggesting that CKIs could target not only osteoclasts but also tumor cells. Here, we present experimental evidence that a CKI, alone or in combination with nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid, reduces breast cancer–induced osteolysis and skeletal tumor burden in animals.

Materials and Methods

Drugs and reagents. CKIs and zoledronic acid [1-hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl)ethylidene-bisphosphonic acid, used as a disodium salt] were obtained from Novartis Pharma AG. The structure of CKI has previously been reported (11, 13). CKI was dissolved in 65% (v/v) cremophor EL and 35% (v/v) absolute ethanol, and this solution was used as the vehicle for *in vitro* and *in vivo* experiments. Zoledronic acid was dissolved in PBS.

Breast cancer cell lines. Human BT474 breast carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection. Human B02 breast carcinoma cells are a subpopulation of the MDA-MB-231 breast cancer cell

Note: C. Le Gall and A. Bellahcène contributed equally to this work.

Requests for reprints: Philippe Clézardin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U.664, Faculté de Médecine Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. Phone: 33-4-78-78-57-37; Fax: 33-4-78-77-87-72; E-mail: clezardin@lyon.inserm.fr.

©2007 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3940

line specifically selected for its high efficiency to metastasize to bone after i.v. inoculation (14). A mouse mammary carcinoma cell line (CCL-51) stably transfected to express cathepsin K has been provided by Novartis and was used here as a positive control for Western immunoblotting experiments. Characteristics of the BT474, B02, and CCL-51 breast cancer cell lines have been described elsewhere (13–15). BT474, MDA-MB-231, B02, and CCL-51 cells are routinely cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Reverse transcription and PCR. Total RNA from BT474, B02, and MDA-MB-231 cells was extracted using Total RNA Isolation System (Promega). cDNA was synthesized using Moloney murine virus-1 reverse transcriptase (Promega). A 399-bp fragment of cathepsin K was amplified using 5'-CAGCAAAGGTGTGATATTATGATGAAAGC as the forward primer and 5'-ATGGGTGGAGAGAAGCAAAGTAGGAAGG as the reverse primer. PCR reactions were run using a program consisting of 1 cycle at 94°C for 5 min, and then 40 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 15 s, and 72°C for 30 s.

Breast cancer tissue specimens. The autopsy files of the Department of Pathology (Pr. J. Boniver, Centre Hospitalier Universitaire of Liège, Belgium) were searched for diagnosis of disseminated breast cancer with histologically proven bone metastases during the period of 1991 to 1998. Slides were retrieved and clinical history was obtained. Two breast cancer patients deceased of disseminated disease, including bone metastases, were selected for this study (case A: primary breast carcinoma with bone, liver, and lung metastatic lesions; case B: primary breast carcinoma with bone, liver, and renal metastatic lesions). Twelve additional specimens of bone metastasis were also randomly selected for the present study. Soft tissue metastases were fixed in formalin, dehydrated, and paraffin embedded. Formalin-fixed bone specimens were decalcified with a solution of EDTA and hydrochloric acid (Decalcifier II, Surgipath Europe Ltd.) or with a solution of formalin (20%) containing 5% (v/v) nitric acid. Paraffin-embedded tissue blocks were sectioned at 5 µm. Slides were then processed for immunostaining.

Antibodies and immunodetection of cathepsin K. The presence of cathepsin K in human breast cancer tissue specimens, experimental bone metastases, and s.c. tumor xenografts was immunodetected with a rabbit polyclonal antibody (Biovision) followed by immunoperoxidase staining (ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Inc.) according to the supplier's instructions. Tissue sections were first deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanols. Blocking of the endogenous peroxidase activity was carried out by immersing the slides in 1.2% hydrogen peroxide (H₂O₂) in methanol for 30 min. For antigen retrieval, the slides were heated at 95°C during 40 min in 0.01 mol/L citrate buffer (pH 6.0), then incubated with normal goat serum (1:20) to block the nonspecific serum-binding sites. The anti-cathepsin K antibody (1:1,000 in PBS) was added and incubated overnight at 4°C in a humidified chamber. After washing in PBS, slides were incubated for 30 min with a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200), washed again with PBS, then incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex. Peroxidase activity was developed by addition of a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Vel) and 0.03% H₂O₂ in PBS. Slides were then counterstained with Carazzi's hematoxylin and washed in distilled water. After dehydration in graded alcohols, the slides were coverslipped. Negative control experiments included omission of the first antibody and preincubation of slides with a 100 molar excess of cathepsin K before antibody use.

The immunodetection of cathepsin K in BT474, B02, MDA-MB-231, and CCL-51 whole protein extracts was done by Western blotting with an anti-cathepsin K mouse monoclonal antibody (Novocastra) diluted 1:500 in TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20. The remainder of the experimental procedure was as previously described (14).

Scoring of cathepsin K immunostaining in human breast cancer tissue specimens. The immunostaining intensity was evaluated independently by two investigators (A.B. and V.C.). The intensity of the staining was scored arbitrarily as follows: negative (–), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+). In case of disagreement between examiners, slides were reviewed and a consensus opinion was obtained.

In vitro tumor cell invasion assay. This assay was done essentially as previously described (6, 14, 15). Tumor cell invasion experiments were conducted using Bio-Coat cell chambers (Becton Dickinson) consisting of 24-well companion plates with cell culture inserts containing 8-µm pore size filters coated with Matrigel (37 µg/filter). Untreated or CKI-treated B02 cells (0.25 × 10⁵/500 µL) were seeded in culture inserts (upper chamber) and the chemoattractant (10% FBS) was placed in each well of a companion plate (lower chamber). After a 24-h incubation at 37°C in a 5% CO₂ incubator, noninvading cells were removed and the invading cells on the under surface of the filter were fixed and stained. Membranes were mounted on glass slides and the cells from 10 random microscopic fields (×400 magnification) were counted. All experiments were run in duplicate, and invasion was expressed as the number of invading cells per square millimeter.

Animals. All procedures involving animals including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols were conducted in accordance with a code of practice established by the local ethical committee (CREEA, Lyon, France). Studies were routinely inspected by the attending veterinarian to ensure continued compliance with the proposed protocols. Four- or 10-week-old female BALB/c homozygous (*nu/nu*) athymic mice were obtained from Charles River.

Animal model of intraosseous tumorigenesis. For intraosseous tumor xenograft experiments in anesthetized 10-week-old nude mice, a small hole was drilled with a 30-gauge sterile needle through the left tibial plateau with the knee flexed. Using a new sterile needle fitted to a 50-µL sterile Hamilton syringe (Hamilton Co.), a single-cell suspension (5 × 10⁵ in 30-µL PBS) of BT474 cells was carefully injected in the bone marrow cavity. Fourteen days after tumor cell inoculation, CKI (50 mg/kg, twice daily) or the vehicle was given to animals by i.p. injection during 28 days. On day 42 after tumor cell inoculation, radiographs of anesthetized mice were taken with the use of MIN-R2000 films (Kodak) in an MX-20 cabinet X-ray system (Faxitron X-ray Corp.). The osteolytic lesion area on radiographs was measured using a Visiolab 2000 computerized image analysis system (Explora Nova) and the extent of bone destruction per animal was expressed in square millimeters, as previously described (6, 14, 15). Anesthetized mice were killed by cervical dislocation after radiography on day 42.

Animal model of bone metastasis. The bone metastasis experiments in mice were conducted as previously described (6, 14–16). B02 cells (5 × 10⁵ in 100-µL PBS) were inoculated into the tail vein of anesthetized nude mice. In this model, animals usually develop bone metastases 18 days after tumor cell inoculation, as judged by radiography (6, 14–16). Radiographs of animals were taken 18, 25, and 32 days after tumor cell inoculation, as described above. At sacrifice (day 32), metastatic hind limbs were collected for peripheral quantitative computed tomography (CT), histology, and histomorphometric analysis.

For treatment protocols, mice were first analyzed by radiography on day 18, and tumor-bearing mice were distributed among the different treatment groups to balance these groups for the extent of bone destruction at baseline. Metastatic animals were then treated with CKI, alone or in combination with zoledronic acid. For the preventive protocols, CKI treatment of animals began on the day of tumor cell inoculation (day 0). CKI (50 mg/kg) or the vehicle was given twice daily by i.p. injection from day 18 to day 32 (treatment protocols) or from day 0 to day 32 (preventive protocols). A single dose (100 µg/kg) of zoledronic acid was given to mice by s.c. injection on day 18 (treatment protocol only). This bisphosphonate dose is equivalent to the clinical dose of 4 mg every 3 to 4 weeks, after adjustment for the different molecular weights of the commercial clinical formulation (290.1, free acid monohydrate) and the research-grade compound (401.6, disodium salt, 4.75 hydrate) used in this study.

Animal model of s.c. tumorigenesis. B02 breast cancer cells (10⁶) were inoculated s.c. (200 µL) into the right flank of nude mice, as previously described (6). Twenty-one days after tumor cell inoculation, when tumor xenografts became palpable, mice were randomized into two groups: one group received CKI (50 mg/kg, twice daily), administered i.p., whereas the other group received the vehicle only. Tumor size was assessed by external measurement of the length (*L*) and width (*W*) of tumor xenografts. Tumor

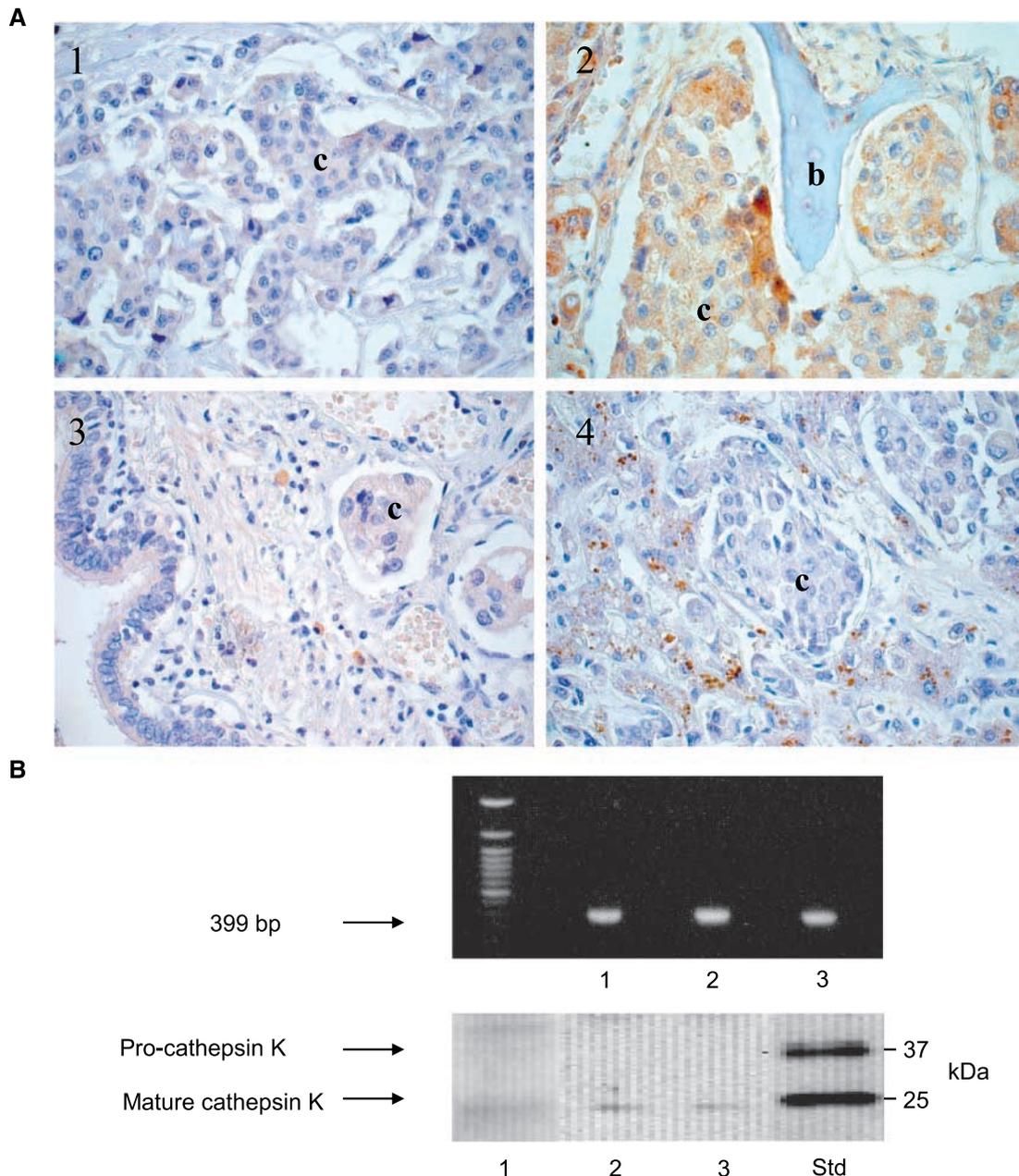


Figure 1. A, immunostaining of cathepsin K in cancer cells of a primary breast tumor and matching metastatic lesions from the same patient (case A). 1, primary breast tumor. 2, bone metastasis. 3, lung metastasis. 4, liver metastasis. In the skeletal metastasis, breast cancer cells (c) adjacent to bone (b) strongly expressed cathepsin K when compared with that observed in the primary tumor and matching lung and liver metastases. Original magnification, $\times 400$. B, top, cathepsin K mRNA expression in human BT474, B02, and MDA-MB-231 breast cancer cells (lanes 1–3, respectively). Reverse transcription-PCR fragments were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Bottom, immunodetection by Western blotting of cathepsin K in whole protein extracts from human BT474, B02, and MDA-MB-231 breast cancer cells (lanes 1–3, respectively) and murine CCL-51 mammary carcinoma cells stably transfected to overexpress cathepsin K (Std).

volume (TV; expressed in cubic millimeters) was calculated by using the following equation: $TV = (L \times W^2) / 2$.

Peripheral quantitative CT. Three-dimensional reconstruction of metastatic tibiae were done with an XCT Research SA+ scanner (Stratec Medizintechnik) fitted with a 0.5-mm collimator, as previously described (16).

Bone histology, histomorphometry, and immunohistochemistry. Hind limbs from animals were fixed and embedded in methylmethacrylate. Sections (7 μ m) of undecalcified long bones were then cut with a microtome (Polycut E, Reichert-Jung) and stained with Goldner's trichrome. Histologic and histomorphometrical analyses were done on Goldner's

trichrome-stained longitudinal medial sections of tibial metaphysis with the use of a Visiolab 2000 computerized image analysis system, as previously described (6, 14–16). Histomorphometric measurements [i.e., bone volume to tissue volume (BV/TV) and tumor burden to soft tissue volume (TB/STV) ratios] were done in a standard zone of the tibial metaphysis, situated at 0.5 mm from the growth plate, including cortical and trabecular bones.

Statistical analysis. Data were analyzed with the StatView 5.0 software using ANOVA followed by a Fisher's protected least significant difference (PLSD) test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Cathepsin K expression in human breast cancer bone metastases and breast cancer cell lines. As a first step toward studying the role of cathepsin K in breast cancer bone metastases, we did immunohistochemistry for cathepsin K expression in primary breast tumors, metastatic lesions, and breast cancer cell lines. Primary breast tumors and their matching metastatic lesions from two patients were initially studied (see cases A and B in Materials and Methods). As illustrated in Fig. 1A (case A), cathepsin K was strongly expressed in breast cancer cells of a bone metastasis (*image 2*) as opposed to that observed in the primary tumor (*image 1*) and matching lung and liver metastases (*images 3 and 4*, respectively). Similar results were obtained with case B (data not shown). This observation led us to extend our study and investigate the expression of cathepsin K in bone metastatic specimens from 12 patients with advanced breast cancer. The scoring of the cathepsin K staining intensity in these bone metastatic specimens showed a moderate to strong staining in tumor cells from 11 of 12 bone metastases, whereas a weak staining of tumor cells was observed in 1 bone metastatic specimen. For all of the bone metastatic specimens studied, the intensity of the cathepsin K staining in osteoclasts was stronger than that observed in tumor cells. Moreover, human breast cancer cell lines (BT474, B02, and MDA-MB-231) also expressed cathepsin K, as judged by both PCR and Western immunoblotting (Fig. 1B). Because of the expression of cathepsin K in breast cancer cells and osteoclasts, we next examined whether a CKI could inhibit breast cancer-induced bone destruction in animals.

Effect of a CKI on bone destruction in an animal model of intrasosseous tumorigenesis. We used an experimental model in which immunocompromised mice display radiographic evidence of osteolytic lesions 14 days after intratibial inoculation of human BT474 breast cancer cells (13). Tumor-bearing mice were treated with CKI (50 mg/kg, twice daily) or the vehicle from day 14 to day 42 after tumor cell inoculation. This dosing regimen of CKI was calculated on the basis of the daily 50-mg clinical dose of CKI that is given in phase II trials for the treatment of osteoporosis (11).

Radiographic analysis on day 42 revealed that tumor-bearing animals treated with CKI had osteolytic lesions (mean \pm SD, 0.43 ± 0.4 mm²/mouse; $n = 8$ mice) that were 79% smaller [95% confidence interval (95% CI), 62–95%; $P = 0.016$] than those of tumor-bearing mice treated with the vehicle (mean \pm SD, 2 ± 1.4 mm²/mouse; $n = 8$ mice; Fig. 2). The inhibitory effect of CKI on cancer-induced bone destruction was confirmed by three-dimensional micro-CT reconstruction of metastatic tibiae (Fig. 2).

To further assess the therapeutic efficacy of CKI on bone destruction, experiments were next conducted in a mouse model of bone metastasis caused by human B02 breast cancer cells, in which CKI treatment started before (preventive protocol) or after (treatment protocol) immunocompromised animals develop osteolytic lesions.

Effect of a CKI on the progression of established breast cancer bone metastases (treatment protocol). We used a mouse model of breast cancer bone metastasis in which animals display radiographic evidence of osteolytic lesions in hind limbs 18 days after i.v. inoculation of B02 tumor cells (6, 14–16). The effect of CKI (50 mg/kg, i.p., twice daily) was studied on the progression of established osteolytic lesions by using a treatment protocol in which drug administration to tumor-bearing mice was initiated on day 18 after tumor cell injection. We then compared the effect of

this CKI dosing regimen with that of a single dose of bisphosphonate zoledronic acid (100 μ g/kg of body weight) administered s.c. to animals on day 18 after tumor cell injection. The effect of CKI in combination with zoledronic acid was also examined. The dosage of 100 μ g/kg zoledronic acid was calculated to be equivalent to the 4-mg clinical i.v. dose given to breast cancer patients with bone metastases (see Materials and Methods for further details on the dose).

Radiographic analysis on day 32 after tumor cell injection revealed that tumor-bearing animals treated with CKI had osteolytic lesions that were 66% (95% CI, 53–79%; $P < 0.001$) smaller than those of tumor-bearing mice treated with the vehicle (Table 1; Fig. 3A). Similarly, tumor-bearing animals that were treated with zoledronic acid had osteolytic lesions that were 59% (95% CI, 48–69%; $P < 0.001$) smaller than those of vehicle-treated animals (Table 1; Fig. 3A). The inhibitory effect of zoledronic acid on progression of osteolytic lesions did not differ statistically significantly from that observed with CKI. In addition, the use of CKI in combination with zoledronic acid did not further reduce the progression of osteolytic lesions in metastatic animals (Table 1; Fig. 3A). These results were confirmed by three-dimensional micro-CT reconstruction of metastatic hind limbs (Fig. 3A).

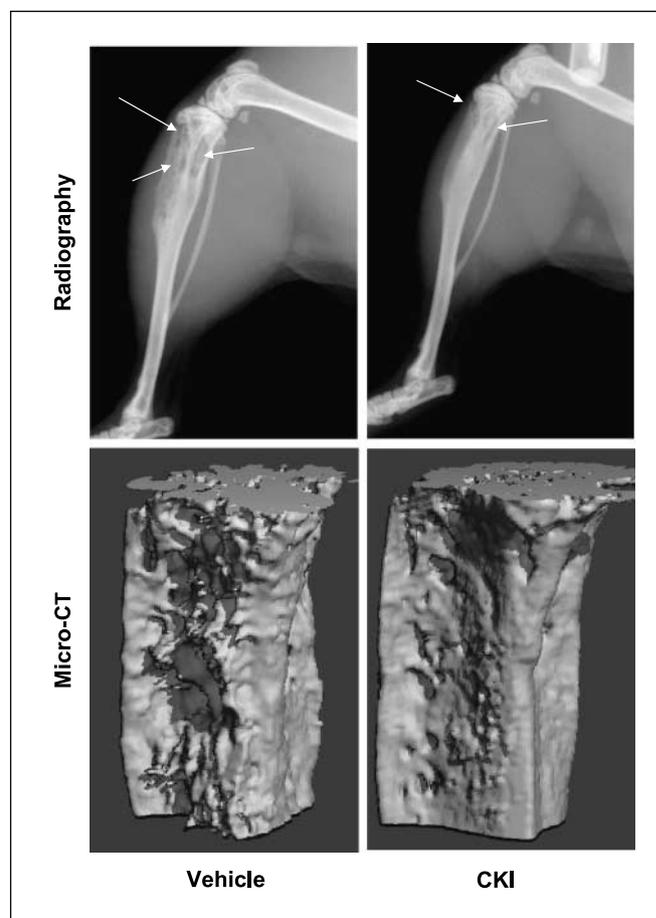


Figure 2. Effect of a CKI on experimental bone metastasis of human BT474 breast cancer. BT474 cells were injected in the tibial bone marrow cavity. Fourteen days after tumor cell inoculation, the CKI (50 mg/kg, twice daily) or the vehicle was administered to animals by i.p. injection during 28 d. *Top and bottom*, representative radiographs and three-dimensional micro-CT reconstruction of hind limbs from mice 42 d after tumor cell inoculation, respectively. *Top, arrows*, osteolytic lesions.

F1

F2

T1
F3

Table 1. Effect of a CKI, alone or in combination with zoledronic acid, on the progression of established breast cancer bone metastases

Treatment*	Radiography (mm ² /mouse)	Histomorphometry [†]	
		BV/TV (%)	TB/STV (%)
Vehicle	10.4 ± 3.9 (n = 34)	11.8 ± 5.1 (n = 34)	81.7 ± 20 (n = 33)
CKI	3.6 ± 3.3 (n = 23) [‡]	18.8 ± 8 (n = 18) [‡]	32.3 ± 37.7 (n = 18) [‡]
Zoledronic acid (single)	4.3 ± 2.2 (n = 18) [‡]	26.6 ± 7.8 (n = 14) [‡]	81.4 ± 11.6 (n = 14)
CKI + zoledronic acid (single)	3.5 ± 2.4 (n = 14) [‡]	22.4 ± 6.8 (n = 10) [‡]	27.1 ± 38.7 (n = 10) [‡]

*Drug administration was initiated after bone metastases had formed (i.e., 18 d after tumor cell injection). All measurements were made 32 d after tumor cell injection. Results are the mean ± SD of three to five separate experiments. CKI, 50 mg/kg, twice daily; zoledronic acid, single dose of 100 µg/kg administered on day 18.

[†]For histomorphometry, *n* is the number of legs with bone metastasis.

[‡]*P* < 0.001, compared with the vehicle-treated group by ANOVA followed by a Fisher's PLSD test.

Histomorphometric analysis of hind limbs with metastases showed that mice treated with CKI, zoledronic acid, or the combination of CKI with zoledronic acid had statistically significantly higher BV/TV ratios (indicating a prevention of bone loss) than vehicle-treated animals (Table 1). For instance, treatments with CKI, zoledronic acid, and CKI + zoledronic acid increased the BV/TV by 59% (95% CI, 44–96%), 125% (95% CI, 91–163%), and 102% (95% CI, 69–135%), respectively, compared with vehicle (*P* < 0.001 for all three regimens). Zoledronic acid (alone or in combination with CKI) was statistically significantly more effective (*P* = 0.001 and *P* = 0.05, respectively) than CKI alone in increasing the BV/TV ratio (Table 1). This higher BV/TV ratio was due mainly to the increased trabecular bone area that can be viewed on Goldner's trichrome-stained tissue sections of bones from animals treated with zoledronic acid, alone or in combination with CKI (Fig. 3A).

CKI, alone or in combination with zoledronic acid, statistically significantly decreased the TB/STV ratio (a measure of the skeletal tumor burden) by 60% (95% CI, 40–84%; *P* < 0.001) and 74% (95% CI, 44–98%; *P* < 0.001), respectively, compared with vehicle (Table 1; Fig. 3A). The TB/STV ratio for CKI alone did not differ statistically significantly from that obtained with CKI in combination with zoledronic acid (Table 1; Fig. 3A). By contrast, a single dose of zoledronic acid decreased the TB/STV ratio by only 0.5% (95% CI, –0.7–11%; Table 1; Fig. 3A).

CKI-treated animals did not have a loss of the body weight at the end of the treatment protocol when compared with vehicle-treated animals [19 ± 1.5 g (*n* = 9) and 18.9 ± 1.4 g (*n* = 8), respectively].

Effect of a CKI on the formation of experimental breast cancer bone metastases (preventive protocol). We next studied the effect of this dosing regimen of CKI (50 mg/kg, twice daily) on the formation of bone metastases by using a preventive protocol in which drug administration was initiated at the time of B02 breast cancer cell inoculation. Zoledronic acid is only approved for the treatment of patients with advanced cancer (1) and is not yet registered for use in the preventive setting.

Radiographic monitoring of the formation of osteolytic lesions in animals 18, 25, and 32 days after tumor cell inoculation indicated that CKI substantially reduced bone metastasis formation as early as day 25 (Fig. 3B). In the treatment protocol, CKI did not reduce the formation of osteolytic lesions on day 25 (data not shown). Yet, on day 32, the extent of inhibition of bone destruction in the treatment protocol [66% inhibition (95% CI, 53–79%)] was similar to that observed in the preventive protocol [61% inhibition (95% CI, 39–84%); Tables 1 and 2].

Histomorphometric analysis of metastatic hind limbs revealed that mice treated with CKI had a BV/TV ratio increased by 155% (95% CI, 81–237%; *P* < 0.001) compared with vehicle (Table 2). A preventive dosing regimen of CKI was more effective than a treatment dosing regimen in increasing the BV/TV ratio (Tables 1

T2

Table 2. Effect of a CKI on the formation of breast cancer bone metastases

Treatment*	Radiography (mm ² /mouse)	Histomorphometry [†]	
		BV/TV (%)	TB/STV (%)
Vehicle	7.7 ± 2.2 (n = 14)	8.4 ± 2.7 (n = 11)	82.8 ± 18.3 (n = 11)
CKI	3 ± 2.9 (n = 13) [‡]	21.4 ± 9.2 (n = 9) [‡]	39.1 ± 43 (n = 9) [§]

*Drug administration was initiated at the time of tumor cell injection. All measurements were made 32 d after tumor cell injection. Results are the mean ± SD of two separate experiments. CKI, 50 mg/kg, twice daily.

[†]For histomorphometry, *n* is the number of legs with bone metastasis.

[‡]*P* = 0.007, compared with the vehicle-treated group by ANOVA followed by a Fisher's PLSD test.

[§]*P* < 0.001, compared with the vehicle-treated group by ANOVA followed by a Fisher's PLSD test.

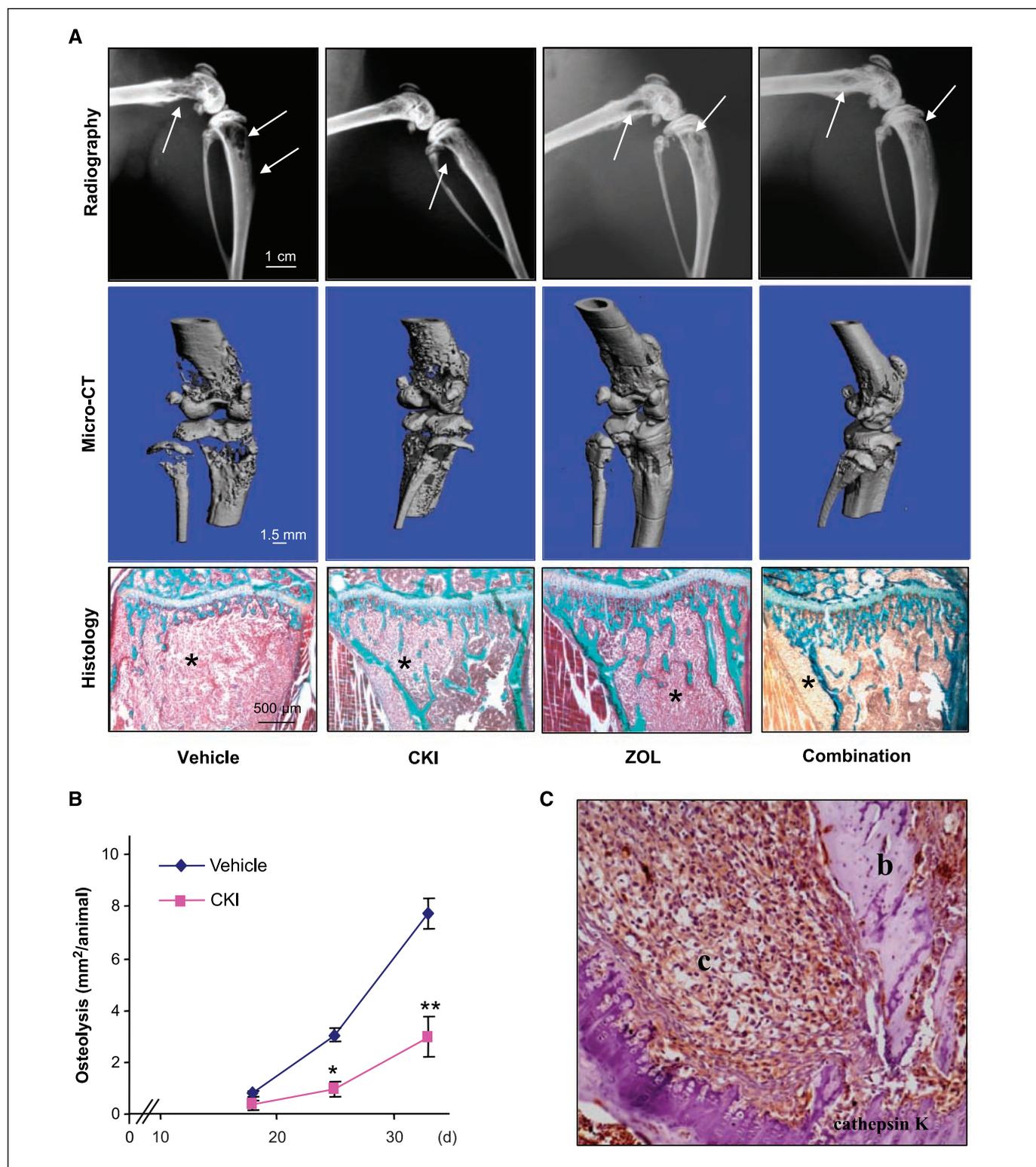


Figure 3. A, effect of a CKI, alone or in combination with zoledronic acid, on the progression of established breast cancer osteolytic lesions. B02 breast cancer cells were inoculated i.v. into nude mice. Eighteen days after tumor cell inoculation, animals bearing bone metastases received treatment with vehicle, CKI (50 mg/kg, twice daily), bisphosphonate zoledronic acid (ZOL; 100 μ g/kg, one single dose on day 18), or CKI in combination with zoledronic acid. *Top* and *middle*, representative radiographs and three-dimensional micro-CT reconstruction of hind limbs from mice 32 d after tumor cell inoculation, respectively. *Bottom*, representative bone histology of Goldner's trichrome-stained tibial metaphysis from metastatic animals. *Top*, arrows, osteolytic lesions. *Bottom*, bone is stained green whereas bone marrow and tumor cells (*) are stained red. B, effect of a CKI on the formation of breast cancer bone metastases. B02 breast cancer cells were inoculated i.v. into nude mice. The vehicle or CKI (50 mg/kg, twice daily) was administered to animals from the time of tumor cell inoculation to the end of the protocol. The extent of osteolytic lesions in animals was monitored by radiography on days 18, 25, and 32. *Points*, mean of two separate experiments (13–14 animals per group); *bars*, SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$, compared with vehicle-treated animals by ANOVA followed by a Fisher's PLSD test. C, immunostaining of cathepsin K in experimental bone metastasis. B02 breast cancer cells (c), which were present in the bone marrow cavity, strongly expressed cathepsin K. b, bone.

and 2). These results may be explained by the total cumulative dose of CKI administered to animals in the preventive setting (3,200 mg), which was 2.3-fold higher than in the treatment setting (1,400 mg).

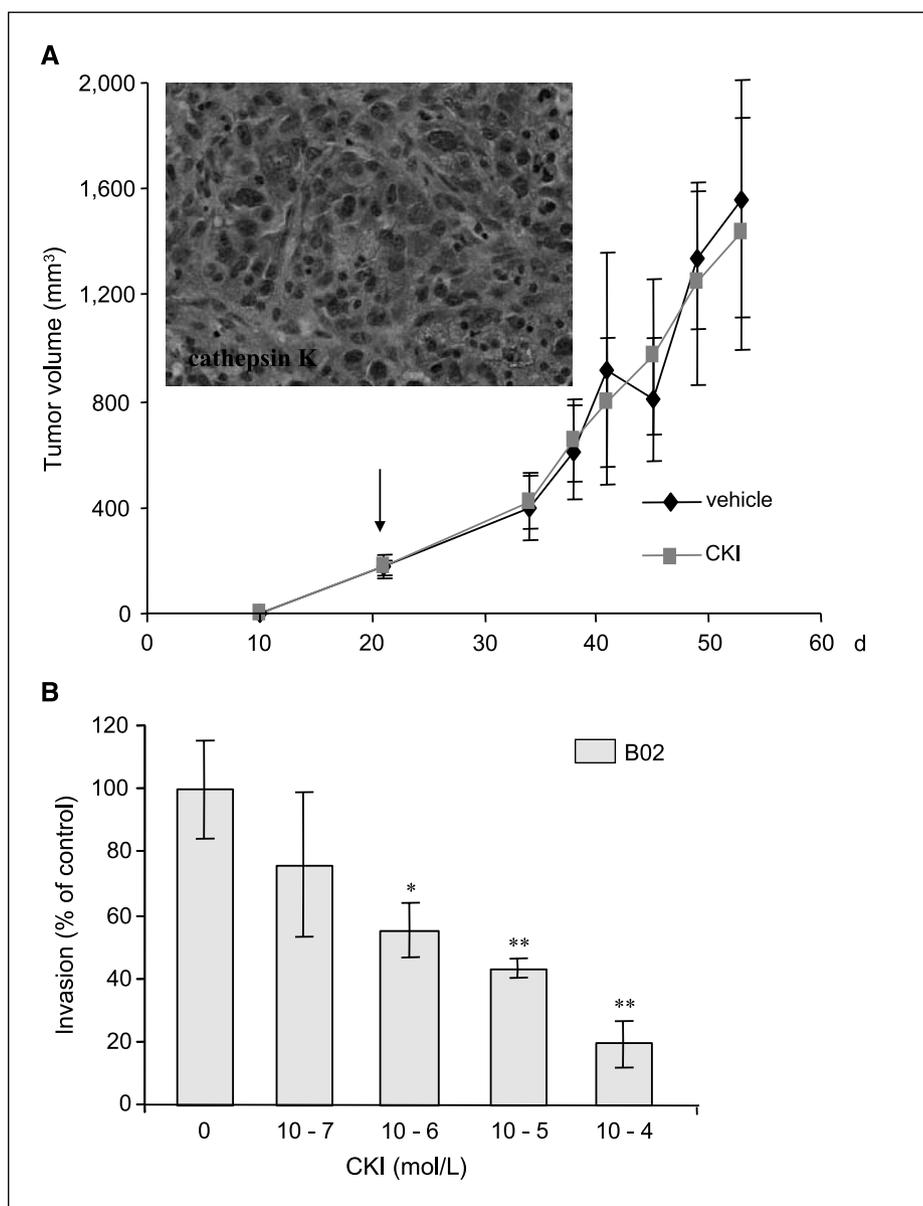
Compared with the vehicle, a preventive CKI dosing regimen also reduced the skeletal tumor burden by 54% (95% CI, 16–93%; $P = 0.007$; Table 2). However, the efficacy of CKI at inhibiting skeletal tumor burden in this preventive setting did not differ significantly from that observed in the treatment setting [62% inhibition (95% CI, 40–84%); Table 1]. We would have expected the preventive dosing regimen to have inhibited skeletal tumor burden more than what we observed because the cathepsin K immunostaining of bones bearing metastatic lesions revealed that B02 breast cancer cells strongly expressed cathepsin K *in situ* (Fig. 3C). We therefore examined whether the dosing regimen of CKI used in our bone metastasis model could directly affect the growth of s.c. B02 tumor xenografts in animals.

Effect of a CKI on the growth of s.c. breast cancer xenografts *in vivo*. We used a mouse model of tumorigenesis in which human B02 breast cancer cells were injected s.c. to immunocompromised mice. At the time the volume of tumor xenografts reached $\sim 200 \text{ mm}^3$ (21 days after tumor cell injection), animals were treated with CKI (50 mg/kg, i.p., twice daily) or the vehicle for 32 days (day 52). At the end of the protocol (day 52), the total cumulative dose of CKI given to each mouse was 3,200 mg.

Compared with the vehicle, CKI did not inhibit the growth of s.c. tumors in animals (Fig. 4A), whereas the same total cumulative dose of CKI reduced skeletal tumor growth (Table 2). Immunohistochemistry of s.c. tumors revealed that cathepsin K was strongly expressed in B02 cells (Fig. 4A, *inset*).

Effect of a CKI on breast cancer cell invasion *in vitro*. Tumor cell invasion is an early process occurring during breast cancer bone metastasis formation (2). It involves the degradation of the basement membrane by tumor-derived proteases. It has previously

Figure 4. A, effect of a CKI on the growth of s.c. breast cancer xenografts. B02 cells were inoculated s.c. into the right flank of nude mice. At the time (day 21) tumors reached 176 mm^3 (black arrow), animals were treated i.p. with the vehicle or CKI (50 mg/kg, twice daily) until the end of the protocol (day 52). The CKI did not inhibit the growth of B02 breast cancer cells *in vivo*. Points, mean of five to seven animals per group; bars, SD. Inset, immunostaining of cathepsin K in s.c. tumor xenografts. Cathepsin K was strongly expressed by B02 cancer cells. B, dose-dependent inhibitory effect of CKI on B02 tumor cell invasion *in vitro*. Columns, mean percentage of the control from three separate experiments; bars, SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$, compared with control by ANOVA followed by a Fisher's PLSD test.



been proposed that cathepsin K expressed by prostate cancer cells may contribute to the invasive potential of these cells (17). We therefore investigated whether CKI could interfere with breast cancer cell invasion.

The pharmacokinetic profile of a single dose of 50 mg/kg CKI revealed that concentrations in the bone marrow reached 10^{-5} mol/L. CKI concentrations in the range of 10^{-7} to 10^{-4} mol/L were therefore chosen to study the effect of the drug on B02 cell invasion *in vitro*. As shown in Fig. 4B, CKI dose-dependently inhibited B02 cell invasion through basement membrane Matrigel, reaching half-maximal inhibitory concentration at 10^{-5} mol/L.

Discussion

In breast cancer skeletal metastases, bone destruction is mediated by osteoclasts (2). Osteoclasts resorb bone by secreting protons and cathepsin K. Protons dissolve bone mineral and provide an acidic microenvironment, enabling cathepsin K to degrade the demineralized collagenous matrix (7). Matrix metalloproteinases are also involved in this resorptive process (18, 19). However, cathepsin K is a key proteinase in bone resorption (7, 8).

The results presented here first show that cathepsin K is expressed not only by osteoclasts but also by breast cancer cells. Similar findings showing the presence of cathepsin K in breast and prostate cancers have previously been reported (12, 17). In addition, we found that breast cancer cells in bone metastases overproduced cathepsin K compared with the expression observed in the primary tumor and soft tissue metastases of the same patient. Although more patients with advanced cancer need to be investigated to clearly address this question, our results are in accordance with the osteomimicry theory (20, 21), suggesting that cancers metastasizing to bone must express bone-related genes to grow and thrive in the bone microenvironment. Because cathepsin K was expressed by osteoclasts and bone-residing breast cancer cells, we therefore reasoned that a therapeutic approach using a CKI could be an effective way to treat breast cancer bone metastases.

Our results show that a clinically relevant dose of CKI substantially reduced osteolysis in two different mouse models of breast cancer bone metastasis. Moreover, we showed that CKI therapy produced meaningful antitumor effects in bone. We surmise that this reduction of skeletal tumor burden is due to the antiresorptive activity of CKI, which, in turn, deprives breast cancer cells of bone-derived growth factors that are required for tumor growth. This assumption is first supported by our finding that the preventive dosing regimen of CKI that inhibited skeletal tumor burden did not inhibit the growth of s.c. tumor xenografts in animals. Moreover, using the experimental model of B02 breast cancer bone metastasis, we found that CKI had a similar inhibitory effect on skeletal tumor burden in the treatment and preventive protocols. Yet, B02 cells residing at the bone metastatic site did express cathepsin K. If a decreased skeletal tumor burden on CKI therapy was the result of a combined effect of the drug on B02 cells and osteoclasts, we would have expected the preventive dosing regimen to have inhibited skeletal tumor burden more effectively than what we observed. Our results are therefore reminiscent of those obtained in different mouse models of bone metastasis in which it was found that osteoprotegerin, a direct inactivator of osteoclasts, causes a reduction of skeletal tumor burden, whereas it does not inhibit the growth of tumor cells in soft tissues (22–25). Thus, it is most likely that CKI renders the bone a less favorable microenvironment for tumor growth by inhibiting osteoclast-mediated bone resorption.

The function of cathepsin K in breast cancer cells is currently unknown. Our results show that CKI inhibited B02 cell invasion *in vitro*, suggesting that cathepsin K could contribute to the invasive potential of B02 breast cancer cells. As discussed above, the clinical dosing regimen of CKI that we used did not, however, exhibit direct antitumor activity *in vivo*. Perhaps, a higher dosing of CKI would have been required to target tumor-derived cathepsin K *in vivo*. However, given that bone turnover in rodents is three to five times higher than in humans (26), we chose to use a dose of 50 mg/kg (twice daily) CKI that corresponds to a realistic clinical situation. We anticipate that higher doses of CKI, which are well above the current clinical dosing regimens, could generate side effects. For example, in a recent placebo-controlled trial, 5-, 10-, 25-, and 50-mg daily doses of a CKI (balicatib) or placebo were given to 675 postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis, and the results obtained at 12 months show that balicatib increases the bone mineral density (27). However, there was a higher incidence of skin adverse events (mainly pruritus) with a daily dose of 50-mg balicatib (27).

Our contention that drugs like CKI should be used in preclinical studies at doses relevant to human clinical testing is reminiscent of the use of bisphosphonates in preclinical studies, in which high doses of these drugs not only reduce skeletal tumor burden by inhibiting bone resorption but also exhibit direct antitumor activity (28). There is much debate about the clinical relevance of these experimental findings because high doses of bisphosphonates are not feasible in humans as a result of concerns about renal toxicity (1). Moreover, the bisphosphonate dosing regimens that have been approved for the treatment of cancer patients with skeletal metastases to date have shown no convincing antitumor effects (1). In this respect, using our mouse model of B02 breast cancer bone metastasis, we have recently reported that a single dose of 100 μ g/kg zoledronic acid, calculated to be equivalent to the 4-mg i.v. dose given to patients, does not inhibit skeletal tumor burden (16). We confirmed here that tumor-bearing mice that were treated with a single clinically relevant dose of 100 μ g/kg zoledronic acid had less bone destruction, but not less skeletal tumor burden, than vehicle-treated animals. By contrast, if zoledronic acid is administered at a low dosage over shorter treatment intervals, the same total cumulative dose of 100 μ g/kg zoledronic acid does exhibit direct antitumor activity (16). For instance, we have shown that a weekly dosing regimen of 50 μ g/kg zoledronic acid substantially reduces skeletal tumor burden. These results are explained by the prolonged exposure of the bone marrow to the bisphosphonate, enabling a direct effect on tumor cells that reside in bone (16). It is interesting that Kim et al. (29) recently reported that zoledronic acid (used at a dosage of 25 μ g/kg, twice daily) in combination with imatinib (a protein tyrosine kinase inhibitor) and paclitaxel (a chemotherapeutic agent) produced a significant preservation of bone structure and decreased skeletal tumor burden in experimental bone metastasis of human prostate cancer when compared with each individual drug separately. Because CKI and zoledronic acid have different molecular targets in osteoclasts (9–11), we used them as a combination therapy in the hope that a greater inhibitory activity on the progression of established bone metastases might be attainable. We found that a single dose of 100 μ g/kg zoledronic acid did not statistically significantly improve the efficacy of CKI on inhibition of tumor-induced osteolysis and skeletal tumor burden. Conversely, a weekly dosing regimen of 50 μ g/kg zoledronic acid was so effective at inhibiting skeletal tumor burden when used as a single-agent therapy that the combination with CKI

did not further decrease the tumor burden (unpublished results). Although doses and schedules of administration of CKI and zoledronic acid need to be optimized, our results suggest that combination therapy might be an effective way to maximize the antiresorptive (and antitumor) effects of these drugs.

In conclusion, our preclinical study shows for the first time that a CKI reduces breast cancer-induced osteolysis and skeletal tumor burden. Our findings also support a promising future for the use of CKIs in combination with other molecularly targeted antiosteoclastic agents in the treatment of experimental bone metastases and, perhaps, in the treatment of breast cancer patients with advanced disease.

References

- Brown JE, Neville-Webbe H, Coleman RE. The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:207–24.
- Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2:584–93.
- Bendre SM, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, et al. Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62:5571–9.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3:537–49.
- Hiraga T, Myyoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor- β enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:2067–73.
- Boucharaba A, Serre CM, Grès S, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 2004;114:1714–25.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504–8.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13453–8.
- Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7829–34.
- Rondeau JM, Bitsch F, Bourquier E, et al. Structural basis for the exceptional *in vivo* efficacy of bisphosphonate drugs. *Chem Med Chem* 2006;1:267–73.
- Grabowska UB, Chambers TJ, Shiroo M. Recent developments in cathepsin K inhibitor design. *Curr Opin Drug Discovery Dev* 2005;8:619–30.
- Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:5386–90.
- Grosios K, Altmann E, Gasser JA, Stumm M, Zimmermann J. Efficacy of the bisphosphonate Zometa and the selective cathepsin K inhibitor AFG495 administered alone or in combination in a murine xenograft model of breast cancer cell induced osteolysis. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2005;46:Abs2910.
- Pécheur I, Peyruchaud O, Serre CM, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J* 2002;16:1266–8.
- Peyruchaud O, Serre CM, NicAmhlaoihb R, Fournier P, Clézardin P. Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem* 2003;278:45826–32.
- Daubiné F, Le Gall C, Gasser J, Green J, Clézardin P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:322–30.
- Brubaker KD, Vessella RL, True LD, Thomas R, Corey E. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Min Res* 2003;18:222–30.
- Delaisé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclast activities. *Microsc Res Techniq* 2003;61:504–13.
- Everts V, Korper W, Hoeben KA, et al. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Min Res* 2006;21:1399–1408.
- Yeung F, Law WK, Yeh CH, et al. Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-independent human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:2468–76.
- Barnes GL, Hebert KE, Kamal M, et al. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 2004;64:4506–13.
- Zhang J, Dai J, Qi Y, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclasto-genesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 2001;107:1235–44.
- Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 2001;61:4432–6.
- Yonou H, Kanomata N, Goya M, et al. Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor decreases human prostate cancer burden in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 2003;63:2096–102.
- Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440:692–6.
- Bauss F, Wagner M, Hothorn LH. Total administered dose of ibandronate determines its effect on bone mass and architecture in ovariectomized aged rats. *J Rheumatol* 2002;29:990–8.
- Adami S, Supronik J, Hala T, et al. Effect of one year treatment with the cathepsin-K inhibitor, balicatib, on bone mineral density in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. *J Bone Min Res* 2006;21:Abs1085.
- Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PGJ. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* 2005;65:4971–4.
- Kim SJ, Uehara H, Yazici S, et al. Modulation of bone microenvironment with zoledronate enhances the therapeutic effects of STI571 and paclitaxel against experimental bone metastasis of human prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:3707–15.

Acknowledgments

Received 10/24/2006; revised 5/19/2007; accepted 8/2/2007.

Grant support: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Novartis Pharma, the League against Cancer (Rhône Committee), and ARC grants 3502 and 7853 (P. Clézardin); European Commission grant LSHC-CT-2004-503049 and Tournesol program grant 08786YD (P. Clézardin and V. Castronovo); and fellowship from Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate and Association pour la Recherche sur le Cancer (C. Le Gall). A. Bellahçène is a Research Associate from the Belgium National Fund for Scientific Research.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Dr. Petra Kessler for helpful discussion, Dr. Laurence de Leval for information retrieval on patients and tumor specimens, and Pascale Heneaux for expert technical assistance in immunohistochemistry.

AUTHOR QUERY
AUTHOR PLEASE ANSWER QUERY

Q1: Running head: Cathepsin K and Breast Cancer Bone Metastasis. Short title OK?

Antitumor Effects of Clinical Dosing Regimens of Bisphosphonates in Experimental Breast Cancer Bone Metastasis

Florence Daubiné, Céline Le Gall, Juerg Gasser, Jonathan Green, Philippe Clézardin

- Background** Bisphosphonates exhibit direct antitumor activity in animal models, but only at high doses that are incompatible with the clinical dosing regimens approved for the treatment of cancer patients with skeletal metastases. We compared the antitumor effects of clinical dosing regimens of the bisphosphonates zoledronic acid and clodronate in a mouse model of bone metastasis.
- Methods** Mice (n = 6–10 per group) were treated with zoledronic acid, clodronate, or vehicle starting before (preventive protocols) or after (treatment protocols) intravenous injection with human B02/GFP.2 breast cancer cells, which express green fluorescent protein (GFP) and luciferase and metastasize to bone. Zoledronic acid was given as daily, weekly, or single doses at a cumulative dose of 98–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight, equivalent to the 4-mg intravenous dose given to patients. Clodronate was given as a daily dose (530 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$), equivalent to the daily 1600-mg oral clinical dose given to patients. Bone destruction was measured by radiography, x-ray absorptiometry or tomography, and histomorphometry (as the ratio of bone volume to tissue volume). Skeletal tumor burden was measured by histomorphometry (as the ratio of tumor burden to soft tissue volume [TB/STV]) and luciferase activity. All statistical tests were two-sided.
- Results** In treatment protocols, daily clodronate was less effective at decreasing the TB/STV ratio than daily (53% versus 87%, difference = 34%, 95% confidence interval [CI] = 16% to 44%, $P < .001$) or weekly (53% versus 90%, difference = 37%, 95% CI = 19% to 46%, $P < .001$) zoledronic acid-dosing regimens. Compared with vehicle, a single dose of zoledronic acid decreased tumor burden by only 16% (95% CI = 9% to 22%, $P < .001$). In preventive protocols, daily clodronate and daily or weekly zoledronic acid decreased the TB/STV ratio by 49% (95% CI = 40% to 57%, $P = .006$), 83% (95% CI = 68% to 98%, $P < .001$), and 66% (95% CI = 47% to 84%, $P < .001$), respectively, compared with vehicle, whereas a single dose of zoledronic acid decreased tumor burden by only 13% (95% CI = –2% to 28%, $P = .84$). Mice treated with a daily preventive regimen of clodronate or with a daily or weekly preventive regimen of zoledronic acid showed a decreased B02/GFP.2 cell tumor burden compared with vehicle, whereas a single preventive dose of zoledronic acid had no effect.
- Conclusion** Daily or repeated intermittent therapy with clinical doses of bisphosphonates inhibits skeletal tumor growth in a mouse model.

J Natl Cancer Inst 2007;99:322–30

Bisphosphonates are potent inhibitors of osteoclast-mediated bone resorption and have demonstrated clinical utility in the palliative treatment of patients with bone metastases (1). There is now extensive *in vivo* preclinical evidence that bisphosphonates can reduce skeletal tumor burden and inhibit the formation of bone metastases in animal models (2). Several mechanisms have been proposed to explain these observations. For example, bisphosphonates may render the bone a less favorable microenvironment for tumor cell colonization by reducing osteoclast-mediated bone resorption, which, in turn, would deprive tumor cells of bone-derived growth factors released from the bone matrix (3,4). In addition, bisphosphonates appear to have direct antitumor effects (2). Bisphosphonates have been shown to inhibit tumor cell adhesion, invasion, and proliferation, and they induce apoptosis of a variety of human tumor cell

lines *in vitro* (2). Bisphosphonates also inhibit tumor growth *in vivo* through antiangiogenic, anti-invasive, and immunomodulatory activities (2). However, the experimental conditions that have been

Affiliations of authors: INSERM, Research Unit U.664; Universit  Claude Bernard Lyon 1; and Faculté de Médecine Laennec, Lyon, France (FD, CLG, PC); Novartis Institutes for Biomedical Research, WKL-125.901, Basle, Switzerland (J. Gasser, J. Green).

Correspondence to: Philippe Clézardin, PhD, DSc, INSERM Research Unit U.664, Faculté de Médecine Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France (e-mail: clezardin@lyon.inserm.fr).

See "Notes" following "References."

DOI: 10.1093/jnci/djk054

  The Author 2007. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org.

used to study the efficacy of bisphosphonates in tumor-bearing animals are far removed from the conditions that have been used to treat patients with bone metastases (2). For example, the high doses of bisphosphonates that have been used in most animal studies are incompatible with the clinical dosing regimens that have been approved for the treatment of cancer patients with skeletal metastases. Moreover, the bisphosphonate-dosing regimens that have been used in clinical trials to date have shown no convincing antitumor effects (1,3). Thus, it is important to determine if a clinically relevant dosing regimen of bisphosphonate can achieve meaningful antitumor effects in animal models of bone metastasis.

We used a mouse model of human breast cancer bone metastasis to examine the effects of different dosing regimens with two bisphosphonates, zoledronic acid and clodronate, on osteolysis and skeletal tumor growth.

Materials and Methods

Bisphosphonates

Clodronate (dichloromethylene bisphosphonic acid) and zoledronic acid [1-hydroxy-2-(1H-imidazole-1-yl)ethylidene-bisphosphonic acid], as the disodium salts, were provided by Novartis Pharma AG (Basle, Switzerland). These compounds were dissolved in water and stored at 4 °C.

Mouse Model of Bone Metastasis

All procedures involving mice including their housing and care, the method by which they were killed, and all experimental protocols were conducted in accordance with a code of practice established by the Experimentation Review Board from the Laennec School of Medicine. This study was monitored on a routine basis by the attending veterinarian to ensure continued compliance with the proposed protocols. Four-week-old female BALB/c athymic (nu/nu) mice were purchased from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). The bone metastasis experiments in mice were conducted as previously described (5,6) using B02 cells, a subpopulation of the human MDA-MB-231 breast cancer cell line that was selected for the high efficiency with which it metastasizes to bone after intravenous inoculation (5). We specifically used B02 cells that had been stably transfected with the genes encoding green fluorescent protein (GFP) and luciferase (B02/GFP.2 cells); the characteristics of this cell line were described elsewhere (6). On day 0, B02/GFP.2 cells (5×10^5 cells in 100 μ L of phosphate-buffered saline [PBS]) were injected into the tail vein of mice anesthetized with 130 mg/kg ketamin and 8.8 mg/kg xylazin. In this model, mice usually develop bone metastases 18 days after tumor cell injection, as judged by radiography (6). For the treatment protocols (see "Dosing Regimens and Experimental Protocols"), mice were analyzed by radiography on day 18, and the area of osteolytic lesions on the skeleton of each animal was measured. Tumor-bearing animals were then distributed among the different treatment groups ($n = 6$ –10 mice per group) to balance these groups for the extent of bone destruction at baseline. For the preventive protocols (see "Dosing Regimens and Experimental Protocols"), mice were randomly assigned to treatment groups ($n = 6$ –10 mice per group) 1 day before B02/GFP.2 tumor cell injection. For both protocols, on day 32 after tumor cell inoculation, radiographs of anesthetized

CONTEXT AND CAVEATS

Prior knowledge

At high doses, bisphosphonates exhibit antitumor properties in animal models. However, the high doses of bisphosphonates used in animals are incompatible with approved treatment regimens for patients, and the bisphosphonate doses that are approved for patients do not have convincing antitumor effects.

Study design

In vivo study of clinical dosing regimens of bisphosphonates in a mouse model of breast cancer cell metastasis to bone.

Contribution

Bisphosphonates administered at low dosages on a daily or weekly dosing schedule were shown to inhibit skeletal tumor growth in a mouse model of bone metastasis.

Implications

Continuous or frequent intermittent low-dose therapy with bisphosphonates may facilitate the prolonged exposure of bone marrow to these drugs, thus enabling a direct effect on tumor cells that reside in bone.

Limitations

The mouse model does not recapitulate all steps required for spontaneous metastasis of breast cancer cells to bone and does not take into account the role of the immune system.

mice were taken with the use of MIN-R2000 film (Kodak, Rochester, NY) in an MX-20 cabinet X-ray system (Faxitron X-ray Corp, Wheeling, IL). Osteolytic lesions were identified on radiographs as demarcated radiolucent lesions in the bone. The area of the osteolytic lesions was measured using a Visiolab 2000 computerized image analysis system (Explora Nova, La Rochelle, France), and the extent of bone destruction per animal was expressed in square millimeters, as described previously (5,6). Anesthetized mice were killed by cervical dislocation after radiography on day 32.

Dosing Regimens and Experimental Protocols

The bisphosphonate doses we used were calculated on the basis of the current clinical doses that have been approved for the treatment of cancer patients with skeletal metastases (i.e., for zoledronic acid, 4 mg via intravenous injection every 3–4 weeks; for clodronate, 1600 mg taken orally daily), using an average body weight of 60 kg for patients and an oral bioavailability of 2% for clodronate (7). Based on an average body weight of 20 g for 4-week-old mice, clodronate was administered to mice at a dosage of 530 μ g/kg body weight/day for both the treatment and preventive protocols (Fig. 1). For zoledronic acid, we used three dosing regimens (daily, weekly, and single) for both the treatment and preventive protocols (Fig. 1). Zoledronic acid was administered to mice at a daily dose of 3 and 7 μ g/kg body weight for the preventive and treatment protocols, respectively, and a weekly dose of 20 and 50 μ g/kg body weight in the preventive and treatment protocols, respectively. However, the same total cumulative dose of zoledronic acid was given to each mouse (i.e., 98–100 μ g/kg body weight), regardless of the protocol or dosing regimen, which enabled us to directly compare the efficacy of zoledronic acid among the different dosing regimens and the two different protocols. This dose (100 μ g/kg) is theoretically

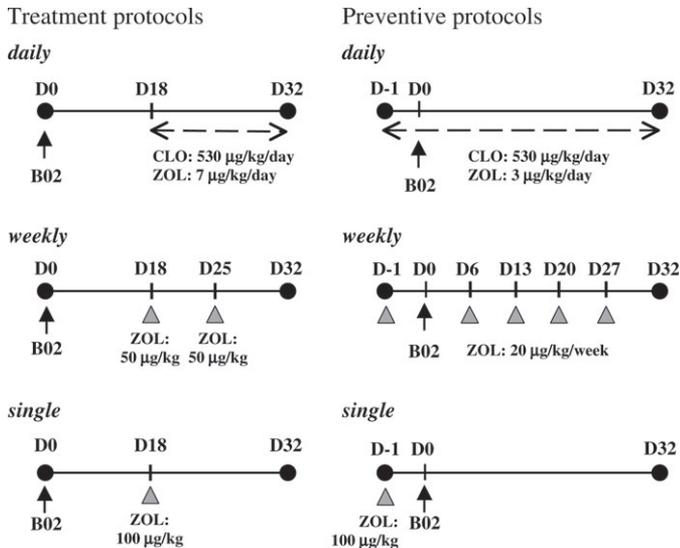


Fig. 1. Summary of treatment and preventive protocols for bisphosphonates in mouse model of human B02 breast cancer cell metastasis to bone. B02 cells were inoculated intravenously into 4-week-old female BALB/c nude mice on day 0 (D0). In the treatment protocols, bisphosphonates were administered by subcutaneous injection beginning on day 18 (D18) after tumor cell inoculation, at which time the mice had developed bone metastases. In the preventive protocols, bisphosphonates were administered by subcutaneous injection beginning 1 day before tumor cell inoculation (D-1). In both protocols, zoledronic acid (ZOL) was administered daily, weekly, or once (on day 18 in the treatment protocol and on day 1 in the preventive protocol); the total cumulative dose of ZOL was 98–100 µg/kg. For the daily dosage, ZOL was administered at a dose of 3 and 7 µg/kg in the preventive and treatment protocols, respectively. A weekly dose of 20 and 50 µg/kg of ZOL was used for the preventive and treatment protocols, respectively. Clodronate (CLO) was administered daily at a dose of 530 µg/kg in both the treatment and preventive protocols. The mice were killed 32 days after tumor cell inoculation.

equivalent to the clinical dose of 6 mg every 3–4 weeks; the actual dose given to patients is 4 mg. However, zoledronic acid in the commercial clinical vial (free acid monohydrate) has a lower molecular weight than the pure research-grade substance (disodium salt, 4.75 hydrate) used in this study. Because of the difference in molecular weights between the free acid monohydrate and the disodium salt, a 4-mg clinical dose of zoledronic acid is equivalent to 5.9 mg of pure research-grade substance. A total cumulative dose of 100 µg/kg was therefore chosen to adjust for the higher molecular weight of the pure research-grade substance. All doses of each bisphosphonate were administered by subcutaneous injection in 100 µL PBS (vehicle). Control mice received a daily treatment with vehicle only.

Detection of Luciferase-Expressing Tumor Cells in Bone Lysates

B02/GFP.2 cells were inoculated intravenously into mice (5×10^5 cells in 100 µL of PBS). Mice injected intravenously with B02/GFP.2 cells and treated on the three preventive protocols with zoledronic acid, clodronate, or vehicle were killed 14 days after tumor cell inoculation ($n = 4-6$ mice per group) and analyzed by radiography. None of these mice had radiographic evidence of bone destruction on the day they were killed. To produce a bone extract for each mouse, we harvested both tibiae, snap froze the limbs in liquid nitrogen, and crushed them together in 2 mL of lysate buffer (25 mM Tris-phosphate, pH 7.8, 2mM dithiothreitol,

2mM EDTA, 1% [vol/vol] Triton X-100, and 5 mg/mL lysozyme [Promega, Madison, WI]). We mixed 30 µL of bone extract of each mouse at room temperature with 100 µL of beetle luciferin (Promega) and then measured the luciferase activity of the mixture with the use of an automated luminometer (Lumat LB 9507; Berthold Technologies, Thoiry, France). Results are expressed as relative light units (RLUs).

Bone Mineral Density Measurement

Vehicle- and bisphosphonate-treated mice bearing radiographically confirmed tumors ($n = 6-10$ mice per group) were killed on day 32 after tumor cell inoculation for both protocols, and both hind limbs from each animal were dissected and fixed in 70% (vol/vol) alcohol. We measured the bone mineral density of tibiae with radiographic evidence of osteolytic lesions by dual-energy x-ray absorptiometry scanning with the use of a PIXI-mouse densitometer (Lunar Corp, Copenhagen, Denmark) or by peripheral quantitative computed tomography with the use of an XCT Research SA+ scanner (Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Germany) fitted with a 0.5-mm collimator, as previously described (8,9). For the peripheral quantitative computed tomography, the measurement of bone mineral density in tibiae was performed on four different locations within the proximal tibial metaphysis (S1–S4, with S1 being the closest to the growth plate). Only the data obtained at the S1 location are shown in this study because this region is highly vascularized and is the site where osteolytic lesions start to develop. Results obtained using dual-energy x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography are expressed as milligram per square centimeter and milligram per cubic centimeter, respectively.

Bone Histology and Histomorphometry

Bone histology and histomorphometric analysis of bone tissue sections were performed as previously described (5,6). Briefly, vehicle- and bisphosphonate-treated tumor-bearing mice ($n = 6-10$ mice per group) were killed on day 32 after tumor cell inoculation for both protocols, and both hind limbs from each animal were dissected, fixed in 80% (vol/vol) alcohol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. A microtome (Polycut E; Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) was used to cut 7-µm-thick sections of undecalcified long bones, and the sections were stained with Goldner's trichrome (5,6). Histologic and histomorphometric analyses were performed on Goldner's trichrome-stained longitudinal medial sections of tibial metaphysis with the use of a computerized image analysis system (Visiolab 2000), as previously described (5, 6). Histomorphometric measurements (i.e., bone volume to tissue volume [BV/TV] and tumor burden to soft tissue volume [TB/STV] ratios) were performed in a standard zone of the tibial metaphysis, situated at 0.5 mm from the growth plate, including cortical and trabecular bones. The BV/TV ratio represents the percentage of bone tissue. The TV/STV ratio represents the percentage of tumor tissue.

Statistical Analysis

All data were analyzed with the use of StatView software (version 5.0; SAS Institute Inc, Cary, NC). Pairwise comparisons were carried out by performing a nonparametric Mann–Whitney *U* test. *P* values less than .05 were considered statistically significant. All statistical tests were two-sided.

Results

Effects of Zoledronic Acid and Clodronate on the Progression of Established Breast Cancer Bone Metastases (Treatment Protocols)

We used a mouse model of human breast cancer bone metastasis in which animals display radiographic evidence of osteolytic lesions in hind limbs 18 days after tumor cell injection (5,6). We first compared the effects of different dosing regimens of zoledronic acid and a daily dosing regimen of clodronate on the progression of established bone metastases by using a treatment protocol in which drug administration to tumor-bearing mice was initiated on day 18 after tumor cell injection (Fig. 1). For all three regimens involving zoledronic acid (i.e., daily, weekly, and single), the total cumulative dose (administered by subcutaneous injection) was 98–100 µg/kg body weight, which we calculated was equivalent to the 4-mg clinical intravenous dose given to breast cancer patients on the basis of body weight. For the daily regimen involving clodronate, the dosage of 530 µg/kg/day (also administered by subcutaneous injection) was similarly calculated to be equivalent to a clinical oral dose of 1600 mg/day (assuming an oral bioavailability of 2%) (7).

Radiographic analysis on day 32 after tumor cell injection revealed that tumor-bearing mice treated with a single dose of zoledronic acid had osteolytic lesions that were 52% (95% confidence interval [CI] = 37% to 67%, $P < .001$) smaller than those of tumor-bearing mice treated with the vehicle (Table 1 and Fig. 2). Similarly, tumor-bearing mice treated with daily or weekly dosing regimens of zoledronic acid had osteolytic lesions that were 66% (95% CI = 56% to 76%, $P < .001$) and 50% (95% CI = 13% to 83%, $P = .04$) smaller, respectively, than those of vehicle-treated animals (Table 1 and Fig. 2). The inhibitory effect of zoledronic acid on the progression of osteolytic lesions did not differ statistically significantly among the different dosing regimens (Table 1). In addition, hind legs bearing metastases from mice treated with each of the three zoledronic acid-dosing regimens had statistically significantly higher bone mineral density than those from mice treated with vehicle (Table 1). Compared with vehicle, the daily, weekly, and single regimens of zoledronic acid increased the bone mineral density by 24% (95% CI = 18% to 31%, $P < .001$), 16% (95% CI = 10% to 23%, $P = .004$), and 14% (95% CI = 7% to 20%, $P = .01$), respectively (Table 1). Moreover, the daily dosing regimen with zoledronic acid was statistically significantly more effective than a

single dosing of zoledronic acid at increasing the bone mineral density (633 mg/cm³ versus 579 mg/cm³, difference = 54 mg/cm³, 95% CI = 9 to 99 mg/cm³, $P = .02$). By contrast, the bone mineral density did not differ statistically significantly among the weekly and single dosing regimens. Daily clodronate was less effective than daily zoledronic acid (580 mg/cm³ versus 633 mg/cm³, difference = 53 mg/cm³, 95% CI = 3 to 103 mg/cm³, $P = .04$) but similar to the weekly and single zoledronic acid-dosing regimens at increasing the bone mineral density.

Histomorphometric analysis of hind limbs with metastases showed that mice treated with each of the three regimens of zoledronic acid had statistically significantly higher BV/TV ratios (indicating a prevention of bone loss) than vehicle-treated mice. For example, the daily, weekly, and single regimens of zoledronic acid increased the BV/TV by 138% (95% CI = 126% to 150%), 79% (95% CI = 67% to 89%), and 90% (95% CI = 82% to 98%), respectively, compared with vehicle ($P < .001$ for all three regimens) (Table 1 and Fig. 2). Moreover, mice treated with a daily zoledronic acid regimen had a statistically significantly higher BV/TV ratio than mice receiving a weekly or single dosing regimen of zoledronic acid (mean BV/TV for daily zoledronic acid: 41%, mean BV/TV for weekly zoledronic acid: 30%, mean BV/TV for single zoledronic acid: 32%; difference for daily versus weekly zoledronic acid = 11%, 95% CI = 9% to 14%, $P < .001$; difference for daily versus single zoledronic acid = 9%, 95% CI = 7% to 11%, $P < .001$). Mice treated with daily clodronate also had statistically significantly higher BV/TV ratios than vehicle-treated mice (Table 1). However, daily clodronate was less effective than daily zoledronic acid at increasing the BV/TV ratio (28% versus 41%, difference = 13%, 95% CI = 10% to 16%, $P < .001$).

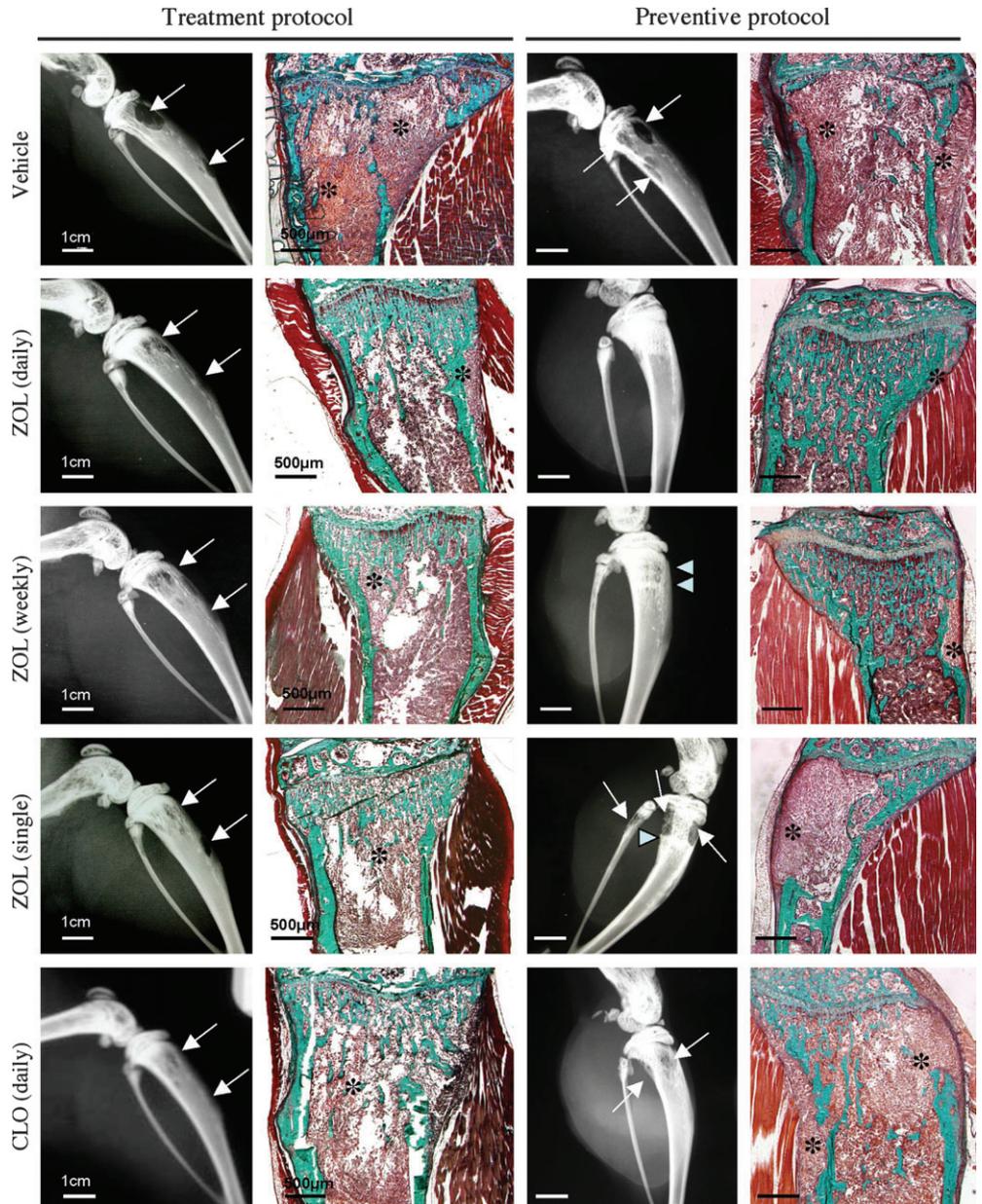
Compared with the vehicle, the daily and weekly regimens of zoledronic acid also substantially decreased the TB/STV ratio (a measure of the skeletal tumor burden) by 87% (95% CI = 75% to 93%, $P < .001$) and 90% (95% CI = 80% to 94%, $P < .001$), respectively, whereas a single dose of zoledronic acid decreased the TB/STV ratio by only 16% (95% CI = 9% to 22%, $P < .001$) (Table 1 and Fig. 2). Daily clodronate decreased the TB/STV ratio by 53% (95% CI = 39% to 64%, $P < .001$) compared with vehicle (Table 1 and Fig. 2). However, daily clodronate was statistically significantly less effective at decreasing skeletal tumor burden than the daily (53% versus 87%, difference = 34%, 95% CI = 16% to

Table 1. Effect of different dosing regimens of zoledronic acid and clodronate on the progression of established breast cancer bone metastases*

Bisphosphonate or vehicle (dosing schedule)	Radiography			Bone mineral density			Histomorphometry				
	No. of mice	mm ² /mouse (95% CI)	<i>P</i>	No. of legs with bone metastasis	mg/cm ³ (95% CI)	<i>P</i>	No. of legs with bone metastasis	BV/TV, % (95% CI)	<i>P</i>	TB/STV, % (95% CI)	<i>P</i>
Vehicle (daily)	27	9.7 (7.9 to 11.5)	–	11	510 (482 to 538)	–	22	17 (15 to 20)	–	96 (94 to 98)	–
ZOL (daily)	6	3.3 (2.4 to 4.3)	<.001	9	633 (599 to 667)	<.001	12	41 (40 to 43)	<.001	12 (6 to 19)	<.001
ZOL (weekly)	5	4.8 (1 to 8.6)	.04	9	592 (552 to 631)	.006	10	30 (29 to 32)	<.001	10 (5 to 16)	<.001
ZOL (single)	16	4.7 (3.2 to 6.1)	<.001	8	579 (544 to 614)	.001	16	32 (31 to 34)	<.001	81 (76 to 87)	<.001
CLO (daily)	6	3.5 (2.2 to 4.7)	<.001	10	580 (539 to 621)	.009	11	28 (25 to 32)	<.001	45 (31 to 60)	<.001

* Data are mean values from two to three independent experiments. All measurements were made 32 days after tumor cell injection. *P* values (two-sided) are for pairwise comparisons with vehicle-treated control group using the Mann–Whitney *U* test. ZOL = zoledronic acid; CLO = clodronate; CI = confidence interval; BV/TV = bone volume-to-tissue volume ratio; TB/STV = tumor burden-to-soft tissue volume ratio; – = not applicable (referent).

Fig. 2. Radiographic and histologic analyses of hind limbs from mice treated on treatment or preventive protocols with zoledronic acid (ZOL) or clodronate (CLO). For each protocol, the **left panels** show radiographs of hind limbs and the **right panels** show micrographs of Goldner's trichrome-stained sections of tibial metaphysis. All images were obtained from different mice on day 32 after B02 breast cancer cell inoculation. The images shown are examples that best illustrate the effects of the treatments. **Arrows** indicate osteolytic lesions. **Arrowheads** indicate dense transversal metaphyseal lines on radiographs of hind limbs from mice that have received a single or weekly dose of zoledronic acid on a preventive protocol. For histologic tissue sections, bone is stained **green** whereas bone marrow and tumor cells (**asterisk**) are stained **red**.



44%, $P < .001$) or weekly zoledronic acid-dosing regimens (53% versus 90%, difference = 37%, 95% CI = 19% to 46%, $P < .001$).

Effects of Zoledronic Acid and Clodronate on the Formation of Breast Cancer Bone Metastases (Preventive Protocols)

We next compared the effects of the different dosing regimens of zoledronic acid and the daily dosing regimen of clodronate on the formation of breast cancer bone metastases by using a preventive protocol in which drug administration was initiated 1 day before tumor cell inoculation (Fig. 1). We found that mice treated 1 day before tumor cell inoculation with a single dose of 100 µg zoledronic acid/kg body weight had osteolytic lesions that were the same size as those of mice treated with vehicle (Table 2 and Fig. 2). The average area of osteolytic lesions was decreased by only 13% (95% CI = -2% to 28%, $P = .84$) compared with the vehicle. By contrast, mice treated with the daily or weekly regimens of zole-

dronic acid beginning 1 day before tumor cell inoculation had osteolytic lesions that were 88% (95% CI = 81% to 95%) and 80% (95% CI = 71% to 90%), respectively, smaller than those of mice treated with vehicle ($P < .001$ for both regimens). Moreover, mice treated with the daily or weekly regimens of zoledronic acid had statistically significantly smaller osteolytic lesions than mice treated with a daily regimen of clodronate (mean area of osteolytic lesion for daily zoledronic acid: 1.4 mm²; weekly zoledronic acid: 2.1 mm²; daily clodronate: 5.5 mm²; difference for daily zoledronic acid versus daily clodronate = 4.1 mm², 95% CI = 2.3 to 6 mm², $P < .001$; difference for weekly zoledronic acid versus daily clodronate = 3.4 mm², 95% CI = 1.2 to 5.6 mm², $P = .006$) (Table 2 and Fig. 2). Radiographic analysis revealed the presence of dense transverse lines on the tibial metaphysis of mice treated with the weekly and single regimens of zoledronic acid (Fig. 2, arrowheads).

The bone mineral density of hind legs from mice treated with the daily or weekly regimens of zoledronic acid was statistically

Table 2. Effect of different dosing regimens of zoledronic acid and clodronate on the formation of breast cancer bone metastases*

Bisphosphonate or vehicle (dosing schedule)	Radiography			Bone mineral density			Histomorphometry				
	No. of mice	mm ² /mouse (95% CI)	<i>P</i>	No. of legs with bone metastasis	mg/cm ² (95% CI)	<i>P</i>	No. of legs with bone metastasis	BV/TV, % (95% CI)	<i>P</i>	TB/STV, % (95% CI)	<i>P</i>
Vehicle (daily)	17	11 (9.2 to 13)	–	6	77 (67 to 86)	–	11	12 (8 to 16)	–	59 (46 to 73)	–
ZOL (daily)	8	1.4 (0.6 to 2.1)	.002	8	94 (85 to 104)	.01	11	34 (30 to 37)	.001	10 (1 to 19)	.001
ZOL (weekly)	7	2.1 (1.1 to 3.2)	.004	5	104 (91 to 117)	.008	9	25 (20 to 29)	.004	20 (8 to 31)	.002
ZOL (single)	10	11 (9.7 to 12.4)	.86	3	87 (83 to 91)	.07	6	13 (10 to 16)	.7	60 (41 to 78)	.85
CLO (daily)	9	5.5 (3.7 to 7.3)	.004	7	72 (68 to 76)	.31	12	20 (17 to 22)	.005	30 (24 to 35)	.002

* Data are mean values from two to three independent experiments. All measurements were made 32 days after tumor cell injection. *P* values (two-sided) are for pairwise comparisons with vehicle-treated control group using the Mann–Whitney *U* test. ZOL = zoledronic acid; CLO = clodronate; CI = confidence interval; BV/TV = bone volume–to–tissue volume ratio; TB/STV = tumor burden–to–soft tissue volume ratio; – = not applicable (referent).

significantly greater than that of mice treated with vehicle, with the single dose of zoledronic acid before tumor cell inoculation or with the daily regimen of clodronate (Table 2). Histomorphometric analysis of metastasis-bearing hind limbs revealed that mice treated with the daily or weekly regimens of zoledronic acid had statistically significantly higher BV/TV ratios than mice treated with vehicle, whereas mice treated with the single dosing regimen of zoledronic acid did not (Table 2 and Fig. 2). For example, the daily and weekly regimens of zoledronic acid increased the BV/TV ratio by 180% (95% CI = 152% to 208%) and 103% (95% CI = 65% to 142%), respectively, compared with vehicle ($P < .001$ for both regimens). The BV/TV ratio for mice treated with daily clodronate was 63% higher (95% CI = 43% to 83%, $P = .006$) than that of vehicle-treated mice (Table 2). However, mice treated with the daily or weekly regimens of zoledronic acid had statistically significantly higher BV/TV ratios than mice treated with the daily regimen of clodronate (34% versus 20%, difference = 14%, 95% CI = 10% to 18%, $P < .001$, and 25% versus 20%, difference = 5%, 95% CI = 0.5% to 9%, $P = .03$, respectively). The daily and weekly regimens of zoledronic acid also reduced the TB/STV ratio by 83% (95% CI = 68% to 98%) and 66% (95% CI = 47% to 84%), respectively, compared with vehicle ($P < .001$ for both regimens). Daily clodronate also reduced the skeletal tumor burden by 49% (95% CI = 40% to 57%, $P = .006$) compared with vehicle (Table 2 and Fig. 2). However, mice treated with a daily clodronate regimen had a statistically significantly higher skeletal tumor burden than mice treated with a daily zoledronic acid regimen (30% versus 10%, difference = 20%, 95% CI = 10% to 29%, $P < .001$).

Our assessment of the histology of Goldner's trichrome–stained bones bearing metastatic lesions revealed that the reduction of skeletal tumor growth we observed with either bisphosphonate treatment was not associated with the concomitant invasion of soft tissues (muscle, tendon, or connective tissue) adjacent to bones (Fig. 2).

Effects of Zoledronic Acid and Clodronate on Tumor Cell Homing to Bone Marrow

The measurement of luciferase activity expressed by tumor cells is a highly sensitive and quantitative method to detect the early development of bone metastases (10). Our use of B02 breast cancer cells that expressed a stably transfected gene encoding luciferase (6) allowed us to examine whether mice treated on the preventive protocols with bisphosphonates displayed evidence of luciferase-

expressing B02/GFP.2 cells in bone extracts on day 14 after tumor cell inoculation, at which time there was no radiographic evidence of osteolytic lesions (data not shown). We assumed that detection of luciferase activity (expressed in RLU) was an indication that B02 breast cancer cells were present in the bone marrow. Bone extracts of hind limbs from vehicle-treated mice ($n = 6$) that had been inoculated with tumor cells had a mean luciferase activity of 147 894 RLU (95% CI = 85 525 to 210 263 RLU). By contrast, bone extracts of hind limbs from age-matched control mice ($n = 5$) that had not been inoculated with tumor cells had a very low (i.e., background) level of luciferase activity (443 RLU, 95% CI = 238 to 648 RLU), further indicating that the detection of luciferase activity was inherent to the presence of inoculated tumor cells.

The mean luciferase activities of bone extracts from mice treated with the daily, weekly, or single dosing regimens of zoledronic acid were 86 911 RLU (95% CI = 71 838 to 101 983 RLU; $n = 4$ mice), 55 236 RLU (95% CI = 41 474 to 68 998 RLU; $n = 4$ mice), and 152 692 RLU (95% CI = 58 714 to 246 669 RLU; $n = 4$ mice), respectively. Mice treated with the daily or weekly regimens of zoledronic acid had a statistically significantly lower B02 tumor burden than mice treated with the vehicle (mean luciferase activity for daily zoledronic acid: 86 911 RLU; weekly zoledronic acid: 55 236 RLU; vehicle: 147 894 RLU; difference for daily zoledronic acid versus vehicle = 60 983 RLU, 95% CI = –9484 to 131 451 RLU, $P = .01$; difference for weekly zoledronic acid versus vehicle = 92 658 RLU, 95% CI = 22 278 to 163 038 RLU, $P = .01$). The mean luciferase activity measured in bone extracts from clodronate-treated mice was 46 693 RLU (95% CI = 16 124 to 71 261 RLU; $n = 3$ mice), which was also statistically significantly lower than that of vehicle-treated mice (difference for clodronate versus vehicle = 104 201 RLU, 95% CI = 19 633 to 188 769 RLU, $P = .02$). By contrast, the mean luciferase activity of bone extracts from mice treated with the single dosing regimen of zoledronic acid was not statistically significantly different from that of vehicle-treated animals (152 692 versus 147 894 RLU, difference = 4797 RLU, 95% CI = –83 460 to 93 054 RLU, $P = .67$).

Discussion

There is a growing body of evidence from preclinical research showing that bisphosphonates exhibit antitumor activity, both in vitro and in vivo (2). However, there is much debate about the clinical relevance of these experimental findings because the high

doses of bisphosphonates used in most animal studies are incompatible with the dosing regimens that have been approved for the treatment of cancer patients with skeletal metastases. Given that the skeletal retention of bisphosphonates is related to the rate of bone turnover in breast cancer patients with bone metastases (11) and that bone turnover in rodents is three to five times higher than that in humans (12), it could be argued that a fivefold higher bisphosphonate dose in animal models of bone metastasis should mimic the clinical situation. Yet, most animal studies have used even higher doses of bisphosphonate (13). For example, in many animal models of multiple myeloma and breast and prostate cancers, it has been shown that zoledronic acid at total monthly cumulative doses that range from 30 to 150 mg reduces skeletal tumor growth (13). By contrast, the approved monthly dose of zoledronic acid for the treatment of cancer patients with skeletal metastases is 4 mg infused over 15 minutes; higher doses are not feasible because of concerns about renal toxicity (3). Therefore, we reasoned that a chemotherapeutic approach that emphasized dose density (i.e., the administration of a bisphosphonate over shorter treatment intervals) rather than dose escalation could be an effective way to minimize skeletal tumor burden in this mouse model of metastatic breast cancer, and perhaps, in the clinic.

Our results show that clinically relevant doses of bisphosphonates produced meaningful antitumor effects in an animal model of breast cancer bone metastasis, as long as the bisphosphonate was administered at a low dosage on a daily or weekly dosing schedule. Our results also suggest that, in the clinical setting, bisphosphonate therapy with a long dosing interval could reduce osteolysis by inhibiting bone resorption, whereas therapy with a more frequent dosing interval could also directly affect the growth of tumor cells resident in bone. Our contention that bisphosphonate therapy with a long dosing interval may inhibit cancer-induced bone loss is supported by our finding that mice with established bone metastases that were treated on the treatment protocol with a single clinical dose of zoledronic acid had less bone destruction, but not less skeletal tumor burden, than vehicle-treated animals. Moreover, the radiographic analysis of mice treated on the preventive protocols with weekly zoledronic acid or the single dose of zoledronic acid clearly showed the presence of dense transverse lines on the tibial metaphysis. Similar dense metaphyseal lines were previously noted in children with severe osteogenesis imperfecta after cyclic administration of the bisphosphonate pamidronate, where they were thought to arise after temporary interruption of growth plate cartilage resorption at the time of a pamidronate infusion (14). In agreement with these findings (14), the metaphyseal lines we observed in the bones of mice in our breast cancer metastasis model consisted of trabecular bone that had not been destroyed because a single or weekly bisphosphonate administration had temporarily interrupted osteoclast-mediated bone resorption; when bone growth later resumed, the growth plate moved away from these horizontal trabeculae, which then became visible as dense transverse lines on radiographs. However, we surmise that, concomitant with bone growth, breast cancer cells may have started to stimulate osteoclast-mediated bone resorption, leading to bone destruction. Conversely, a daily treatment with zoledronic acid induced a continuous inhibition of bone resorption, leading to an almost complete inhibition of skeletal tumor burden. A contin-

uous daily treatment with clodronate also reduced skeletal tumor burden, although the extent of inhibition was much less than that observed with zoledronic acid. These results are in accordance with the “vicious cycle” theory (4), in which breast cancer cells stimulate osteoclast-mediated bone resorption and bone-derived growth factors released from resorbed bone stimulate tumor growth. The results also suggest that bisphosphonates (as exemplified here by zoledronic acid and clodronate) inhibit bone resorption, which subsequently deprives breast cancer cells of bone-derived growth factors that are required for tumor cell proliferation.

Aside from our observation that bisphosphonates may render the bone a less favorable microenvironment for tumor growth by reducing osteoclast-mediated bone resorption, we used a continuous or frequent intermittent low-dose therapy with zoledronic acid to investigate whether bisphosphonates also have the potential to exert a direct antitumor effect *in vivo*. We found that although the different dosing regimens of zoledronic had similar inhibitory effects on bone resorption in the treatment protocols, only a daily or weekly regimen of zoledronic acid reduced skeletal tumor burden. If bisphosphonate treatment decreased skeletal tumor burden solely by reducing bone loss, we would have expected the single-dose regimen of zoledronic acid to have inhibited skeletal tumor growth more than what we observed. It is interesting that Gao et al. (15) recently reported that a preventive treatment regimen with zoledronic acid (used at dosage of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{wk}$, which was similar to the 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{wk}$ dosage that we used) inhibited not only the formation of bone tumors in transgenic mice that spontaneously develop leukemia and osteolytic lesions but also the formation of soft tissue tumors. These findings (15) suggest that a frequent zoledronic acid dosage may directly inhibit tumor growth. Indeed, we showed that a daily or weekly preventive regimen of zoledronic acid or a daily preventive regimen of clodronate interfered with the homing of luciferase-expressing B02 breast cancer cells to bone *in vivo*. van der Pluijm et al. (10) also recently reported that preventive treatment of nude mice with the bisphosphonate olpadronate (given in a daily clinical dosing regimen at 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$) inhibited the early development of luciferase-expressing MDA-MB-231 breast cancer cells (MDA-231-B/luc⁺) in bone. However, in this animal model, the inhibitory effect of olpadronate on skeletal tumor growth was transient, and tumor growth eventually resumed (although there was a substantial reduction in osteolysis) (10). These results may be explained by the extramedullary growth of MDA-231-B/luc⁺ cells that was observed in the surrounding soft tissues (10), which may have masked the inhibitory effect of olpadronate on skeletal tumor burden. A similar masking of the inhibitory effect of the bisphosphonate ibandronate on skeletal tumor burden has been observed in 5TGM1 and ARH-77 murine models of myeloma, in which tumor growth is not confined to bone (2). Conversely, we found that when tumor growth is restricted to bone, as in our breast cancer model, a continuous dosing regimen of zoledronic acid or clodronate or a frequent intermittent dosing regimen of zoledronic acid reduced both the progression of osteolysis and the homing of tumor cells to bone.

Our results are reminiscent of those obtained in a randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled chemotherapy in the adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients, in which dose density was found to be more effective than dose

escalation for reducing residual tumor burden (16). It is therefore possible that continuous or frequent intermittent low-dose therapy with zoledronic acid or clodronate allows prolonged exposure of the bone marrow to bisphosphonates, thus enabling a direct effect on tumor cells that reside in bone. The homing of tumor cells in bone likely involves early metastatic processes such as tumor cell invasion (4). In vitro, bisphosphonates inhibit breast cancer cell invasion (2). However, to our knowledge, there is no in vivo evidence that bisphosphonates directly inhibit tumor cell invasion. A daily or weekly preventive regimen of zoledronic acid or a daily preventive regimen of clodronate could therefore inhibit the homing of metastatic cells to bone by reducing tumor cell invasion. Additional mechanisms, such as the inhibition of tumor cell extravasation and proliferation within the bone microenvironment, may also be involved in reducing the homing of tumor cells to bone. For example, it was recently shown that the activation of bone turnover in athymic mice favored prostate cancer localization and growth in the skeleton, whereas zoledronic acid treatment reduced the development of these skeletal lesions (17). A continuous or frequent intermittent low-dose preventive therapy with zoledronic acid or clodronate could also reduce bone turnover in our animal model, thereby inhibiting the homing of B02 breast cancer cells in bone. Such potential inhibitory mechanisms using continuous or frequent intermittent bisphosphonate therapy merit a fuller investigation.

The main limitation of our study is that the bone metastases were induced by injecting human breast cancer cells into the systemic circulation in immunocompromised mice. Such an approach does not recapitulate all the steps that are required for tumor cells to spread from the primary tumor to distant organs and does not take the role of the immune system into account. An animal model that more likely reflects the clinical reality does exist, in which mouse 4T1 breast cancer cells implanted in the mammary gland spontaneously metastasize to bone, lungs, and liver in immunocompetent syngeneic mice (18). In that model, Hiraga et al. (18) found that zoledronic acid (used at a 60-mg total monthly cumulative dose) reduced 4T1 metastasis to visceral organs and bones. It would be interesting to examine the effect of a continuous or frequent intermittent low-dose preventive bisphosphonate therapy on spontaneous metastasis in this animal model.

Our results provide some support for an adjuvant role of bisphosphonates in breast cancer. In this respect, it was recently reported that the addition of oral clodronate (1600 mg daily for 2 years) to standard treatment for primary operable breast cancer statistically significantly reduced the risk of bone metastases by 31% over a 5-year period (19). Two larger phase III trials of bisphosphonates as adjuvant therapy for primary breast cancer, each enrolling more than 3000 patients with early-stage breast cancer, are underway. The National Surgical Adjuvant Breast Project B-34 trial will determine whether oral clodronate (1600 mg daily for 3 years) administered alone or in combination with chemotherapy and/or hormonal therapy reduces the incidence of skeletal and nonskeletal metastases or improves overall or relapse-free survival. The Southwest Oncology Group 0307 trial will compare zoledronic acid (4 mg administered intravenously every 4 weeks for 6 months, then every 3 months for 2.5 years), clodronate (1600 mg taken orally daily for 3 years), and the bisphosphonate

ibandronate (50 mg taken orally daily for 3 years) as adjuvant therapy for primary breast cancer. The first results from these clinical trials are expected to be available in 2008. On the basis of our preclinical results reported here and those obtained for clodronate and for dose-dense chemotherapy in clinical trials (16,19), we anticipate that the use of dose-dense bisphosphonate therapy as adjuvant treatment of primary breast cancer will decrease the risk of bone metastases.

References

- (1) Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, Janjan NA, Albain KS, Lipton A, et al. American society of clinical oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:1378–91.
- (2) Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PGJ. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res* 2005;65:4971–4.
- (3) Brown JE, Neville-Webbe H, Coleman RE. The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:207–24.
- (4) Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2:584–93.
- (5) Pécheur I, Peyruchaud O, Serre CM, Guglielmi J, Volland C, Bourre F, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J* 2002;16:1266–8.
- (6) Peyruchaud O, Serre CM, NicAmhlaibh R, Fournier P, Clézardin P. Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem* 2003;278:45826–32.
- (7) Pentikainen PJ, Elomaa I, Nurmi AK, Karkkainen S. Pharmacokinetics of clodronate in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989;27:222–8.
- (8) Herrak P, Gortz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2327–37.
- (9) Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, Gasser J, Hara H, Schett G, et al. The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat Med* 2005;11:394–9.
- (10) van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs JT, Lowik CW, Wetterwald A, et al. Interference with the microenvironmental support impairs the *de novo* formation of bone metastases *in vivo*. *Cancer Res* 2005;65:7682–90.
- (11) Cremers SCLM, Papapoulos SE, Gelderblom H, Seynaeve C, den Hartigh J, Vermeij P, et al. Skeletal retention of bisphosphonate (pamidronate) and its relation to the rate of bone resorption in patients with breast cancer and bone metastases. *J Bone Miner Res* 2005;20:1543–7.
- (12) Bauss F, Wagner M, Hothorn LH. Total administered dose of ibandronate determines its effects on bone mass and architecture in ovariectomized aged rats. *J Rheumatol* 2002;29:990–8.
- (13) Green J. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004;9:3–13.
- (14) Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 1998;339:947–52.
- (15) Gao L, Deng H, Zhao H, Hirbe A, Harding J, Ratner L, et al. HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition. *Blood* 2005;106:4294–302.
- (16) Citron ML, Berry DA, Cirrincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of intergroup trial C9741/cancer and leukemia group B trial 9741. *J Clin Oncol* 2003;21:1431–9.
- (17) Schneider A, Kalikin LM, Mattos AC, Keller ET, Allen MJ, Pienta KJ, et al. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology* 2005;146:1727–36.
- (18) Hiraga T, Williams PJ, Ueda A, Tamura D, Yoneda T. Zoledronic acid inhibits visceral metastases in the 4T1/luc mouse breast cancer model. *Clin Cancer Res* 2004;10:4559–67.

(19) Powles T, Paterson A, McCloskey E, Schein P, Scheffler B, Tidy A, et al. Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8:R13.

Notes

P. Clézardin conducts research sponsored by Novartis Pharma AG, the maker of zoledronic acid. J. Green and J. Gasser hold stock in Novartis Pharma AG. The manuscript was approved by the legal department of Novartis Pharma AG.

We thank Dr Patrick Garnero for helpful discussion and Julien Guglielmi for his expert technical assistance. P. Clézardin received financial support from INSERM (the National Agency for Health and Medical Research) and the Association for Cancer Research (grants 3502 and 7853). F. Daubiné is a recipient of a fellowship from the French Ministry for Research. C. Le Gall is a recipient of a fellowship from the Association for Prostate Cancer Research. The study sponsors had no role in the design of the study, the collection or analysis of the data, the writing of the study, or the decision to publish.

Manuscript received May 16, 2006; revised November 21, 2006; accepted December 22, 2006.