



Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines à bromodomaine et domaine extra-terminale dans l'ostéosarcome

Louise Marchandet

► To cite this version:

Louise Marchandet. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines à bromodomaine et domaine extra-terminale dans l'ostéosarcome. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. [⟨NNT : 2022NANU1037⟩](#). [⟨tel-03959219⟩](#)

HAL Id: tel-03959219

<https://theses.hal.science/tel-03959219v1>

Submitted on 27 Jan 2023

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Cancérologie

Par

« Louise MARCHANDET »

**« Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines à
bromodomaine et domaine extra-terminale dans l'ostéosarcome »**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12/12/2022

Unité de recherche : Équipe 9 : CHILD, CRCI²NA, Nantes Université, INSERM UMR1307, CNRS UMR 6075,
Université d'Angers

Rapporteurs avant soutenance :

Annie SCHMID-ALLIANA	DR, Institut de Biologie Valrose - CNRS UMR7277 – INSERM UMR 1091, Université de Côte d'azur, Nice
Florence APPARAILLY	DR, Institut for Regenerative Medicine and Biotherapy – INSERM UMR 118, Université de Montpellier, Montpellier

Composition du Jury :

Président : Dominique Heymann PU-PH, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Université de Nantes, Nantes

Examineurs : Laura Broutier	CR, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université de Lyon, Lyon
Edith Bonnelye	DR, UMR 9020 CNRS – UMR-S 1277 INSERM, Université de Lille, Lille
Dominique Heymann	PU-PH, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Université de Nantes, Nantes

Dir. de thèse : Frédéric Lézot CR, INSERM UMR 933, Sorbonne Université, Paris

Co-dir. de thèse : François Lamoureux CR, CRCI²NA – INSERM UMR 1307 – CNRS UMR 60775,
Nantes Université, Nantes

Table des matières

Liste des Figures.....	4
Liste des tableaux	6
Abréviations	7
Introduction	10
1. Le tissu osseux.....	10
a) Composition et organisation	10
b) Cellules osseuses	12
c) Remodelage osseux	14
2. L'ostéosarcome	20
a) Origine	20
b) Épidémiologie	22
c) Étiologie	22
d) Caractérisation clinique	25
e) Diagnostic	26
f) Caractérisation histologique et classification des ostéosarcomes	27
g) Prise en charge thérapeutique de l'ostéosarcome	31
h) Cercle Vicieux	34
i) Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome	36
3. Les mécanismes de résistance des ostéosarcomes aux thérapies conventionnelles.....	47
4. La thérapie épigénétique ciblant les protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal.....	72
a) La famille des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal	74
b) Rôle des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal dans le cancer.....	78
c) Inhibiteurs des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal	82
5. Résistance aux inhibiteurs de protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal ...	97
a) Hyperphosphorylation et stabilisation des protéines BET	98
b) Reprogrammation adaptative du kinome	99
c) Suractivation de voies de signalisation	100
d) Implication de l'autophagie	107
6. Objectif de thèse.....	118
Matériels et méthodes	120
1. Réactifs	120
2. Culture cellulaire	120
3. Établissement de la lignée HOS-MNNG résistante au JQ1.....	121
4. Tests de viabilité cellulaire et expériences de dose-réponse.....	121
5. Test de synergie.....	121
6. Tests de clonogénicité	122

7. Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	122
8. Extraction protéique et western-blot	123
9. Mesure de l'activité des caspases 3 et 7.....	125
10. Immunofluorescence et microscopie confocale	125
11. Expérimentations <i>In vivo</i>	125
12. Immunohistologie.....	126
13. siRNA interférence.....	128
14. shRNA interférence.....	128
15. Surexpression de KRAS4a ^{WT} et KRAS4a ^{G12S}	129
16. Séquençage d'ARN et traitement des données bio-informatiques.....	130
17. 3'SRP et traitements des données bio-informatiques.....	131
18. Séquençage Sanger.....	131
19. Dosage du glucose et du lactate	132
20. Seahorse.....	132
21. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase.....	133
22. Analyses statistiques.....	133
Chapitre I : L'inhibition des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal induit l'autophagie dans l'ostéosarcome	135
1. Introduction.....	135
2. Résultats	135
3. Conclusion/Discussion.....	153
Chapitre II : L'autophagie, la surexpression de KRAS, la suractivation des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt/mTOR ainsi qu'une potentielle dérégulation du métabolisme sont des mécanismes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans l'ostéosarcome.....	155
1. Introduction.....	155
2. Résultats	156
a) Développement d'une lignée résistante à JQ1	156
b) L'inhibition de l'autophagie, suractivée dans les HOS JQ1R, potentialise l'effet du JQ1 <i>in vitro</i>	162
c) Les cellules HOS JQ1R surexpriment KRAS et possèdent une éventuelle mutation de cette protéine	168
d) Suractivation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT/mTOR	189
e) L'activité métabolique semble être augmentée dans la lignée d'ostéosarcome résistante au JQ1 .	190
3. Conclusion/Discussion.....	195
Chapitre III : Le ciblage de la voie des MAP kinases pourrait resensibiliser les cellules d'ostéosarcome résistantes à JQ1	199
1. Introduction.....	200

2. Résultats	201
3. Conclusion/Discussion.....	217
<i>Discussion générale et perspectives</i>	<i>219</i>
<i>Bibliographie.....</i>	<i>224</i>

Liste des Figures

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

Figure 2 : Schéma du remodelage osseux.

Figure 3 : Origine de l'ostéosarcome.

Figure 4 : Fémur atteint d'un ostéosarcome intramédullaire.

Figure 5 : Sous-types histologiques des ostéosarcomes humains de type conventionnel.

Figure 6 : Schéma du cercle vicieux de l'ostéosarcome.

Figure 7 : Les protéines BET sont les lecteurs des modifications épigénétiques apposées sur les histones.

Figure 8 : Arbre phylogénétique représentant les 61 bromodomaines codés par le protéome humain

Figure 9 : Organisation des domaines des membres de la famille BET humaine BRD4, BRD2, BRD3, et BRDT.

Figure 10 : Rôle des protéines BET dans l'expression d'oncogènes.

Figure 11 : Structure chimique de l'inhibiteur JQ1.

Figure 12 : Structures chimiques des inhibiteurs pan-BET.

Figure 13 : Structures chimiques des inhibiteurs bivalents.

Figure 14 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine et du domaine extra-terminal des protéines BET.

Figure 15 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine 1 des protéines BET.

Figure 16 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine 2 des protéines BD2.

Figure 17 : Structures chimiques des dégradeurs PROTAC (Proteolytic Targeting Chimera).

Figure 18 : Voie de signalisation Nf- κ B.

Figure 19 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

Figure 20 : Voie de signalisation MAPK.

Figure 21 : Schéma du mécanisme de la macroautophagie.

Figure 22 : JQ1 induit l'autophagie

Figure 23 : JQ1 induit l'augmentation du flux autophagique dans différentes lignées cellulaires d'OS.

Figure 24 : L'inhibition de l'autophagie

Figure 25 : L'inhibition de l'autophagie par la cvhloroquine potentialise l'effet antitumoral de JQ1 dans un modèle murin d'ostéosarcome

Figure 26 : La lignée HOS JQ1R est résistante au JQ1.

Figure 27 : Sensibilité des cellules HOSn et HOS JQ1R à l'I-BET 151 et aux agents de chimiothérapie conventionnels, mafosfamide, cisplatine et doxorubicine.

Figure 28 : Les cellules HOSn et HOS JQ1R sont deux lignées distinctes présentant une expression différentielle de gènes et de voies de signalisation et processus biologiques.

Figure 29 : Les transcrits de l'autophagie sont différentiellement exprimés dans les cellules HOS JQ1R.

Figure 30 : Les cellules résistantes à JQ1 ont une forte activité autophagique, qui est amplifiée après un traitement au JQ1.

Figure 31 : L'inhibition de l'autophagie potentialise l'effet de JQ1 dans les cellules HOS JQ1R.

Figure 32 : Les cellules HOS JQ1R surexpriment la protéine KRAS et JQ1 amplifie cette expression.

Figure 33 : Le ciblage de KRAS par transfection de siRNA dans la lignée cellulaire résistante au JQ1 diminue la viabilité cellulaire.

Figure 34 : Le ciblage de KRAS par transduction de shRNA dans la lignée cellulaire résistante au JQ1 diminue la viabilité cellulaire.

Figure 35 : Le ciblage de la protéine KRAS dans les cellules HOS JQ1R par transduction et induction de shRNA est confirmé par 3'SRP.

Figure 36 : Les cellules HOSn et HOS JQ1R présentent une expression différentielle de gènes, de voies de signalisation et de processus biologiques.

Figure 37 : La transduction et l'induction du sh388, ciblant KRAS, dans les cellules HOS JQ1R régulent certaines voies de signalisation et processus biologiques tels que l'autophagie.

Figure 38 : Le ciblage de la surexpression de KRAS dans les cellules HOS JQ1R ne semble pas diminuer leur activité autophagique.

Figure 39 : Les données du RNA-seq montrent la présence d'une mutation de KRAS (KRASG12S) dans les cellules HOS JQ1R.

Figure 40 : Expression protéique de KRAS au sein des lignées d'ostéosarcomes présentes au laboratoire.

Figure 41 : Transduction des plasmides de surexpression de KRAS4aWT et KRAS4aG12S dans deux lignées d'ostéosarcome sensibles au JQ1 : HOSn et MG63.

Figure 42 : Transfection transitoire du plasmide de surexpression KRAS4aG12S dans une lignée cellulaire de rein HEK 293.

Figure 43 : Transduction et induction pendant 5, 10 ou 15 jours du plasmide de surexpression de KRAS4aG12S dans les cellules HOSn.

Figure 44 : Étude de l'autophagie par western blot dans les cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4aG12S

Figure 45 : Les cellules HOS JQ1R surexpriment p-ERK (une protéine de la voie MAPK) mais également Akt, mTOR, p-S6 (protéines de la voie PI3K/AKT/mTOR).

Figure 46 : L'expression et l'activité de la LDHA semble être augmentée dans les cellules HOS JQ1R comparées aux cellules HOSn.

Figure 47 : Profil respiratoire mitochondrial des cellules HOSn et HOS JQ1R.

Figure 48 : Consommation de glucose et production de lactate dans les cellules HOSn et HOS JQ1R.

Figure 49 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine Ras, le salirasib.

Figure 50 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine Raf, le sorafenib

Figure 51 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le binimetinib.

Figure 52 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le trametinib.

Figure 53 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le cobimetinib.

Figure 54 : Effet de la combinaison des inhibiteurs de la voie MAPK et du JQ1 sur l'expression des protéines de la voie MAP kinases.

Liste des tableaux

Tableau I : Système de classification Enneking ou MSTS (Musculo Skeletal Tumor Society).

Tableau II : Système de classification TNM de l'AJCC où chaque stade est défini par la taille de la tumeur (T), le grade (G), l'envahissement des ganglions (N) et la présence ou non de métastases (M).

Tableau III : Score de Huvos, évaluant le pourcentage de cellules tumorales viables après chimiothérapie néo-adjuvante et résection tumorale et permettant de classer les patients en bons ou mauvais répondeurs

Tableau IV : Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome testées en clinique.

Tableau V : Essais cliniques menés avec des inhibiteurs de protéines BET.

Tableau VI : Séquences d'amorces pour la RT-qPCR

Tableau VII : Liste des anticorps primaires utilisés pour les western-blots

Tableau VIII : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les western-blots

Tableau IX : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Tableau X : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Tableau XI : Séquences d'amorces pour le séquençage Sanger

Tableau XII : Tableau récapitulatif des effets de la combinaison de JQ1 avec différents inhibiteurs de la voie de signalisation MAPK

Abréviations

3'SRP : 3' Seq-RNA profiling	CSM : Cellules Souches
ALP : Alkaline Phosphatase	Mésenchymateuses
AMPK : Adenosine-Monophosphate activated Protein Kinase	CTHRC1 : Collagen Triple Helix Repeat Containing 1
ANK : progressive ankylosis	CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques CD8+
APC : Adenomatous Polyposis Coli	CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte- Associated protein 4
ATCC : American Type Culture Collection	CXCL10 : C-X-C motif chemokine ligand 10
ATF : Activating Transcription Factor	DC-STAMP : Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein
ATG : Autophagy-related genes	DFCP1 : Double FYVE Containing Protein 1
ATG2A : Autophagy-related protein 2 homolog A	DLG2 : Discs Large MAGUK Scaffold Protein 2
ATRX : alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked	Dlx5 : Distal-less homeobox 5
B2M : β -2-Microglobuline	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
B7-H3 : B7 Homologue 3 protein	DMSO : diméthylsulfoxyde
BCA : acide bicinchoninique	DNA-PK : DNA-dependant protein kinase
BD : bromodomaine	ECAR : taux d'acidification extracellulaire
BET : Bromodomaine et domaine ExtraTerminal	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
BETi : BET inhibitors	FANCC : Franconi Anemia group C
BGLAP : Gamma-Carboxyglutamic Acid- containing Protein	FGF : Fibroblast Growth Factor
BMAT : Bone Marrow Adipose Tissue	GD2 : DisialoGanglioside
BMP2 : Bone morphogenetic protein 2	GEP : Guanine nucleotide exchange factor
BMPs : Bone Morphogenic Protein	GNL3 : G Protein Nucleolar 3
BRD : bromodomaines	GTP : Guanosine-5'-triphosphate
BSP : Bone SialoProtein	HAT : Histone AcétylTransférase
CAF : fibroblastes associés au cancer	HDAC : Histone désacétylase
CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor-T	HER2 : Human Epidermal Growth Factor 2
CBF1 : C Promoter Binding Factor 1	HEXIM1 : hexamethylene bisacetamide inducible protein 1
CCCP : carbonylcyanure m- chlorophénylhydrazone	HGF : Hepatocyte Growth Factor
CCL5 : C-C Motif Chemokine Ligand 5	HH : Hedgehog
CD152 : Cluster of Differentiation 152	HMT : Histone MéthylTranférase
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	HP- β -CD : hydroxypropyl- β -cyclodextrine
CHEK2 : Checkpoint Kinase 2	hPRT : Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase
CIK : Cytokine-induced killer	IFN : interférons
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	IFN- α 2b : Interféron pégylé humain recombinant a
CoAs : Coenzyme A	
CollA1 : Collagen type I Alpha 1 chain	
CSF-1 : Colony-Stimulating Factor 1 receptor	

IGF : Insulin Growth Factor
 IGV : Integrative Genomic Viewer
 IL : interleukine
 INHBA : Inhibin Subunit Beta A
 IRF4 : Interferon regulatory factor 4
 IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
 JAK2 : Janus kinase 2
 KDM : lysine déméthylase
 KRAS4a : augmentation d'expression transcriptionnelle du variant « a »
 LAK : Lymphokine-Activated Killer cell
 LC3 : light chain 3
 LDH : lactate dehydrogenase
 LIR : LC3-interacting region
 LMA : leucémie myéloïde aiguë
 LRP5/6 : low density lipoprotein receptor-related protein-5/6
 LRRC15 : Leucine Rich Repeat Containing 15
 M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
 MDM2 : Murine Double Minute 2
 MEC : Matrice Extra-Cellulaire
 MEKi : MEK inhibitors
 MMP9 : Matrix MetalloPeptidase 9
 mTORC1 : Complexe 1 de mTOR
 NAVO₄ : orthovanadate de sodium
 NBN : Nibrin
 NBR1 : Neighbor of BRACA1 gene 1 protein
 ncARN : ARN non codants
 NDP52 :Nuclear Dot Protein 52
 NF-κB : nuclear factor-kappa B
 NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T cell cytoplasmic 1
 NK : Natural Killer
 NMC : NUT midline carcinoma
 OCR : taux de consommation d'oxygène
 OPG : Osteoprotegerin
 OPTN : optineurin
 OSM : oncostatin M
 OSX : Osterix
 P-TEFb : facteur positif d'élongation de la transcription-b
 p62 : ubiquitin-binding protein
 PARP : (poly(ADP-ribose)polymérase
 PD-1 : Programmed cell Death-protein 1
 PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
 PDGF-BB : Platelet-Derived Growth Factor-two B subunits
 PE : PhosphatidylEthanolamine
 PI3K : PhosphoInositide 3-Kinases
 PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
 PIC : cocktail complet d'inhibiteurs de protéases
 PMSF : fluorure de phénylméthyl-sulfonyl
 PRIM1 : DNA Primase Subunit 1
 PROTACS : proteolytic targeting chimera
 PSA : antigène spécifique de la prostate
 PTCH : Patched
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
 PTH : ParaThyroid Hormone
 PTHrP : ParaThyroid Hormone related Protein
 PVDF : fluorure de polyvinylidène
 RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor k B Ligand
 Rapamycin
 RB1 : Retinoblastoma 1
 RB1CC1/FIP200 : RB1 Inducible Coiled-Coil 1/ FAK-family Interacting Protein of 200 kDa
 RDM : arginine déméthylase
 RelA : REL-associated
 RIPA : Radio-Immuno-Precipitation Assay
 RNA seq : séquençage haut-débit de l'ARN
 RNAPII : ARN polymérase II
 RORC : Recombinant RAR-Related Orphan Receptor C
 RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase
 Runx2 : Runt-related transcription factor 2
 S1P : Sphingosine-1-Phosphate
 SASP : senescent-associated secreted phenotype
 SBFA : structures en charge du bien-être animal
 sCSC : sarcoma Cancer Stem Cell
 SDS-PAGE : dodécylsulfate de sodium
 shCT : shRNA contrôle
 siCT : siRNA control
 SMO : smoothened
 SPOP : POZ de type speckle
 SQSTM1 : Sequestosome 1
 STAB2 : Special AT-rich Binding protein 2

SVF : sérum de veau fœtal
TAMs : macrophages associés aux tumeurs
TAOK1/2/3 : TAO kinases
TAZ : Tafazzin
TCR : récepteurs de cellules T
TDM : TomoDensitoMétrie
TEM : transition épithéliale-
mésenchymateuse
TEP-scan : Tomographie à Émission de
Protons-scan
TGF- β : Tumor Growth Factor β
TIL : Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
TNM : Tumor Node Metastasis
TP53 : Tumor Protein 53
TPP1 : tripeptidyl peptidase-1

TRAP : Tartrate-Resistant Acid
Phosphatase
Tregs : Lymphocytes T régulateurs
UCHL3 : Ubiquitin carboxyl-terminal
hydrolase isozyme L3
ULK1 : Unc-51 Like Autophagy
Activating Kinase 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth
factor
VPS34 : Vacuolar Protein Sorting-
associated protein
WIPI2 : WD repeat domain
phosphoinositide-interacting protein 2
Wnt : Wingless integration site
WT : Wide Type
YAP : Yes-associated protein

Introduction

1. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu composé d'une matrice extra-cellulaire (MEC) minéralisée, de cellules osseuses ainsi que d'un riche réseau vasculaire [1]. Ce tissu permet d'assurer trois fonctions principales que sont : (1) l'adaptation de la géométrie et de la masse osseuse aux contraintes de la croissance, de la locomotion ainsi que de l'exercice ; (2) la réparation de micro-dommages intra-osseux ainsi que (3) le maintien de l'homéostasie calcique pour laquelle le squelette sert de réservoir [2]. Le tissu osseux est un organe dynamique, puisqu'il est en perpétuel renouvellement.

a) Composition et organisation

Le tissu osseux est composé d'une matrice osseuse. Cette matrice est constituée d'une partie organique (25 %), d'une autre minérale (70 %) et enfin d'eau (5 %).

La matrice organique, aussi appelée ostéoïde avant minéralisation, contient environ 90 % de protéines collagéniques, principalement du collagène de type I [3]. Les 10 % restants représentent la substance fondamentale composée de glycoprotéines non collagéniques ainsi que de protéoglycanes. Les glycoprotéines non collagéniques présentent dans la matrice organique sont l'ostéonectine, l'ostéocalcine et l'ostéopontine [4]. L'ostéonectine, la plus abondante, est liée au collagène et aux sels minéraux. Elle permet de lier les parties minérales et organiques [5]. L'ostéocalcine, dont la synthèse est essentiellement assurée par les ostéoblastes, intervient dans la minéralisation osseuse en favorisant la formation des cristaux d'hydroxyapatite [6]. Enfin, l'ostéopontine relie les cristaux d'hydroxyapatite (phosphate et calcium cristallisés) aux cellules osseuses [7]. La substance fondamentale contient également de l'eau et des électrolytes.

La matrice minérale est composée de minéraux dont les plus abondants sont le calcium, le phosphore, le sodium, le potassium mais aussi le magnésium [8,9]. Le dépôt de phosphate et de calcium cristallisés, formant des cristaux d'hydroxyapatite, sur la matrice organique permet sa

minéralisation. Les cristaux d'hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sont de forme hexagonale allongée de 50 μm d'épaisseur [10].

Le tissu osseux peut être lamellaire ou non lamellaire. La distinction se fait selon la présence ou non d'une orientation des fibres de collagène au niveau de la matrice organique de l'os.

Le tissu osseux non lamellaire, est un tissu immature ou primitif se formant soit à partir du tissu conjonctif, permettant la formation d'un os plat ou court, soit du cartilage, permettant la formation d'un os long. Le tissu osseux non lamellaire est caractérisé par une désorganisation des fibres de collagène de sa matrice [11].

Le tissu osseux lamellaire se caractérise par une matrice osseuse disposée en lamelles superposées ou concentriques. Cette organisation confère à l'os une résistance mécanique importante, du fait que les fibres de collagène sont orientées dans une direction unique, variant d'une lamelle à une autre. Le tissu lamellaire se compose de deux types de tissus osseux : le tissu osseux spongieux (os trabéculaire) ou le tissu osseux compact (os cortical) (Figure 1) [12–14]. Le tissu spongieux aussi appelé os aréolaire est constitué d'un réseau tridimensionnel de trabécules de tissu osseux et de spicules, qui sont des structures ayant une forme de pointe. Cet os est défini comme étant ramifié et anastomosé et délimite des espaces intercommunicants composés par de multiples cavités médullaires, contenant la moëlle osseuse hématopoïétique et des cavités conjonctivo-vasculaires, contenant des vaisseaux. Les lamelles osseuses sont organisées et disposées irrégulièrement autour des cavités [15]. L'os spongieux contient la moëlle osseuse dite rouge, qui est hautement vascularisée et le lieu de l'hématopoïèse où les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les progéniteurs multipotents s'auto-renouvellent et se différencient progressivement en progéniteurs unipotents spécifiques d'une lignée, à l'origine de la production de chaque grande lignée sanguine [16]. Le tissu osseux compact, aussi appelé os compact, est une masse pleine de tissu osseux. Il contient un ensemble de formations cylindriques appelées ostéones ou systèmes de Havers, qui sont disposées parallèlement entre elles en suivant la direction de la diaphyse [17]. Quatre à six lamelles osseuses, disposées autour d'un canal vide, le canal de Havers, composent chaque ostéone (Figure 1). Le canal de Havers est composé de vaisseaux et de nerfs amyéliniques [12]. Entre les ostéones se trouvent des systèmes interstitiels, qui correspondent à des ostéones partiellement résorbés du fait du remodelage osseux. La surface externe de tous les os, sauf au niveau des épiphyses, est recouverte d'un tissu conjonctif appelé le périoste (Figure 1). Celui-ci, contient principalement des vaisseaux sanguins et des ostéoblastes, qui sont activés pendant la formation osseuse [17]. Du tissu conjonctif recouvre aussi les cavités vascularisées des os

telles que le canal de Havers, la cavité médullaire de l'os compact ou les cavités de l'os spongieux. Il s'agit de l'endoste [18]. La cavité médullaire est quant à elle composée de la moëlle osseuse jaune qui est très peu vascularisée et n'a pratiquement aucun rôle dans l'hématopoïèse. Cette moëlle osseuse se compose en grande partie d'adipocytes qui sont anatomiquement et fonctionnellement différents des adipocytes classiques tels que les adipocytes bruns, beiges ou blancs, d'où le nom spécifique donné à cette moëlle osseuse, BMAT (Bone Marrow Adipose Tissue). Récemment, ces adipocytes ont été décrits comme étant des régulateurs essentiels du micro-environnement de la moëlle osseuse ayant un rôle dans le remodelage osseux ou encore dans le métabolisme des os et du corps entier [19,20].

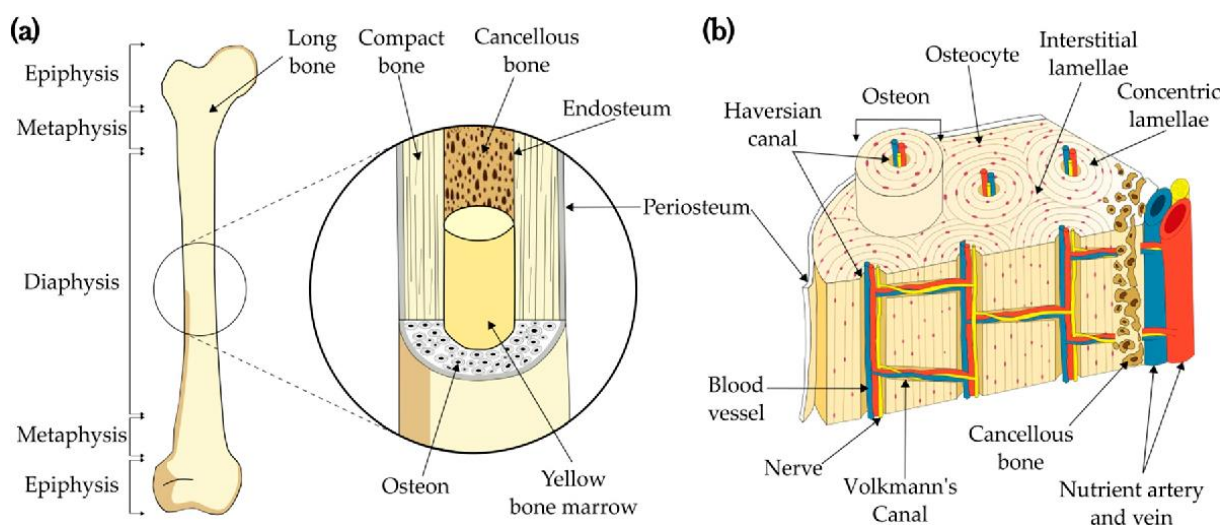


Figure 1 : Schéma de l'organisation du tissu osseux. (a) représentation schématique d'un os long (b) représentation schématique de la microstructure du tissu osseux. (Parametric modeling of biomimetic cortical bone microstructure for additive manufacturing – J.A. Robles-Linares [18])

b) Cellules osseuses

Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdales se situant le long de la surface osseuse [21]. Elles sont à l'origine de la formation osseuse puisque leur rôle principal est la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse. Ces cellules dérivent de cellules souches mésenchymateuses (CSM). La différenciation des CSM en cellules ostéoblastiques nécessite

l'expression de certains facteurs de transcription, tels que Runx2 (Runt-related transcription factor 2), Dlx5 (Distal-less homeobox 5), ATF (Activating Transcription Factor) ou encore OSX (Osterix) [22]. Runx2 est un facteur essentiel de la différenciation des CSM en lignée ostéoprogénitrice car il régule à la hausse les gènes liés aux ostéoblastes tels que CollA1 (Collagen type I Alpha 1 chain), ALP (Alkaline Phosphatase), BSP (Bone SialoProtein), BGLAP (gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) [1,23]. L'expression d'autres gènes spécifiques tels que les protéines BMPs (Bone Morphogenic Protein) ou encore des protéines appartenant à la voie de signalisation Wnt (Wingless integration site) ont également un rôle dans la différenciation ostéoblastiques [24]. Étant donné que ces cellules produisent et sécrètent les composants organiques de la matrice extracellulaire, elles présentent un réticulum endoplasmique rugueux abondant, un appareil de Golgi saillant mais aussi la présence de vésicules sécrétoires [25]. La communication des ostéoblastes entre eux se fait via des jonctions communicantes, appelées « gap junctions ». De petites molécules régulant la formation osseuse telles que le calcium, l'inositol triphosphate ou encore l'adénosine monophosphate diffusent à travers ces jonctions [26,27].

Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes quiescents de forme plate qui tapissent les surfaces osseuses en l'absence de résorption et de formation osseuse [23,28]. La fonction de ces cellules n'est pas totalement comprise, néanmoins elles régulent le remodelage osseux. En effet, elles empêchent l'accès des ostéoclastes à la surface de l'os lorsque la résorption n'est pas nécessaire, ou au contraire, participent à la différenciation des ostéoclastes en produisant et sécrétant de l'OPG (osteoprotegerin) et du RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand) lors de la résorption [29,30]. Ces cellules de revêtement osseux présentent peu d'organites et communiquent entre elles ou avec les ostéocytes par des jonctions communicantes [31].

Les ostéocytes

Les ostéocytes, sont les cellules les plus abondantes du tissu osseux, puisqu'elles représentent 90 à 95 % de l'ensemble des cellules osseuses [23]. Les ostéocytes sont issus des cellules souches mésenchymateuses, puisqu'il s'agit d'une sous-population d'ostéoblastes

devenant des ostéocytes qui s'incorporent dans la matrice osseuse à la fin d'un cycle de formation osseuse. Les ostéocytes sont donc des ostéoblastes différenciés, dont la taille est réduite et la quantité d'organites (appareil de Golgi ou réticulum endoplasmique rugueux) diminuée car la synthèse et la sécrétion des protéines au sein de ces cellules est ralentie [32]. Les ostéocytes sont piégés dans la matrice extra-cellulaire osseuse, dans des logettes appelées ostéoplastes. Ces cellules possèdent de longs prolongements cytoplasmiques qui traversent les canalicules de la matrice osseuse, permettant aux ostéocytes d'établir des jonctions communicantes avec les cellules environnantes (ostéocytes, mais aussi ostéoblastes et cellules bordantes) [33,34]. Ces cellules sont des cellules mécano-sensibles [35], qui orchestrent le remodelage osseux en régulant la différenciation et l'activation des ostéoclastes et des ostéoblastes, et, par conséquent, la résorption et la formation osseuse, qui ont lieu séquentiellement au même endroit [36,37].

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées responsables de la résorption osseuse. Ces cellules sont issues de la prolifération et de la fusion de précurseurs hématopoïétiques (monocytes/macrophages), rendues possible par la stimulation via des cytokines comme le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) sécrété par les cellules mésenchymateuses ostéoprogénitrices et les ostéoblastes ou le RANKL sécrété par les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules stromales [38,39]. A l'inverse, l'OPG se liant au RANKL, empêche l'interaction RANK/RANKL et, ainsi, inhibe la différenciation des ostéoclastes [40]. L'interaction RANK/RANKL permet l'expression d'autres facteurs favorisant l'ostéoclastogenèse tels que NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cell cytoplasmic 1), par l'activation des voies de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). NFATc1 régule l'expression de protéines nécessaires à l'ostéoclastogenèse comme les protéines TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase), cathepsine K, le récepteur de la calcitonine, MMP9 (Matrix MetalloPeptidase 9) [41,42] ou encore DC-STAMP (Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein), cruciale pour la fusion des précurseurs des ostéoclastes [41,43–45].

c) Remodelage osseux

Le tissu osseux est l'un des tissus qui est constamment renouvelé. Le renouvellement osseux, aussi appelé remodelage osseux est un processus dynamique et cellulaire par lequel la matrice osseuse minéralisée est en permanence résorbée et reformée. Ce processus est essentiel afin d'assurer tout au long de la vie les trois fonctions majeures du tissu osseux. Le taux de renouvellement du tissu osseux est d'environ 10 % par an. Ainsi, le remodelage de la totalité du squelette est d'environ 10 ans. Le cycle de renouvellement osseux se déroule sur une période de 120 à 200 jours dans l'os cortical et trabéculaire. Le processus met en jeu différents phénomènes (cellulaire, hormonal, chimique, électrique et mécanique) qui sont indépendants, et se réalise selon cinq étapes coordonnées que sont l'activation, la résorption, l'inversion, la formation et enfin la terminaison (Figure 2) [46,47].

La phase d'activation, aussi appelée phase d'initiation implique la détection d'un signal initiateur du remodelage. Ce signal peut prendre plusieurs formes comme une contrainte mécanique à l'origine de micro-dommages détectés par les ostéocytes ou encore des facteurs ostéorésorbants tels que la PTH (ParaThyroid Hormone), les œstrogènes ou la vitamine D3 [48]. L'apoptose des ostéocytes, si la matrice est endommagée, entraîne la libération de facteurs paracrines qui augmentent l'angiogenèse locale et le recrutement des précurseurs des ostéoclastes [49]. En effet, dans des conditions basales, les ostéocytes sécrètent le TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), qui inhibe l'ostéoclastogénèse. L'apoptose des ostéocytes, diminue alors les niveaux locaux de TGF- β , entraînant l'ostéoclastogénèse (Figure 2) [50]. En réponse à un stress mécanique, les ostéocytes sécrètent également du RANKL qui active les ostéoclastes en se fixant sur le récepteur RANK présents à leur surface (Figure 2). Tout cela se déroule dans le cas d'un remodelage ciblé, qui consiste à éliminer une zone spécifique d'os endommagé ou ancien. Dans le cas d'un remodelage non ciblé, c'est-à-dire au niveau de sites non spécifiques, des facteurs systémiques favorisent le remodelage. L'hormone PTH, par exemple, est un signal de remodelage endocrinien généré pour maintenir l'homéostasie du calcium [49]. La PTH est sécrétée par les glandes parathyroïdes en réponse à une baisse du calcium sérique et agit de manière périphérique sur les reins, les os et indirectement sur l'intestin pour maintenir l'homéostasie du calcium sérique. Dans le microenvironnement osseux, la PTH se fixe sur son récepteur, présent à la surface des cellules ostéoblastiques (Figure 2) [51]. Cette fixation active la protéine kinase A, la protéine kinase C ainsi que les voies de signalisation intracellulaire du calcium et induit une vague de réponses transcriptionnelles qui permet le recrutement de précurseurs ostéoclastiques, induisant leur différenciation et leur activation en ostéoclastes matures (Figure 2) [49,52]. En plus du recrutement des précurseurs ostéoclastiques,

l'expression par les ostéoblastes de protéines clés de l'ostéoclastogenèse, telles que CSF-1 (Colony-Stimulating Factor 1 receptor), RANKL et OPG, est également modulée en réponse à la PTH. L'expression de l'OPG est réduite, et la production de CSF-1 et de RANKL est augmentée pour favoriser la formation des ostéoclastes et leur activité ultérieure (Figure 2) [53]. CSF-1 favorise la prolifération et la survie des précurseurs des ostéoclastes et dirige la propagation, la motilité et l'organisation du cytosquelette dans les cellules matures [54]. RANKL favorise également la prolifération des précurseurs des ostéoclastes, coordonne la différenciation des précurseurs des ostéoclastes en ostéoclastes multinucléés, favorise l'activité de résorption et prolonge la vie des cellules matures [55]. Les ostéoclastes recrutés et activés vont entamer l'étape de résorption. Pour se faire, les cellules bordantes, qui recouvrent la surface de l'os et empêchent sa résorption par les ostéoclastes vont se rétracter et se détacher. La surface de l'os alors exposée est prête à être résorbée.

La phase de résorption consiste à la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes (Figure 2). Le réarrangement du cytosquelette des ostéoclastes entraîne leur adhésion à la matrice osseuse, la formation d'une zone de scellement, offrant un espace fermé et étanche, ainsi que la génération d'une bordure en brosse qui offre une surface de sécrétion considérablement accrue [46]. Les ostéoclastes, fixés sur la matrice osseuse, résorbent la zone sous contrôle des ostéocytes en sécrétant des ions hydrogènes dans le compartiment de résorption via les pompes à protons afin de dissoudre le minéral osseux (fraction organique de la matrice extra-cellulaire) mais aussi en libérant des protéases, telles que de la cathepsine K, et des métalloprotéinases matricielles comme la TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) pour dégrader la matrice osseuse riche en collagène (fraction organique de la matrice osseuse) (Figure 2) [56,57]. La résorption va alors former des lacunes dites de Howship. Des protéines clés appelés facteurs de couplage sont libérées de la matrice, sécrétées, ou même directement produites par les ostéoclastes, influençant leur activité et leur survie. Ces facteurs de couplage régulent également l'activation des ostéoblastes (Figure 2) [47]. En effet, au cours de la résorption, certains facteurs stockés dans la matrice sont libérés. Le TGF- β et l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor 1) favorisent la migration des cellules souches mésenchymateuses vers l'os, tandis que le PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-two B subunits) induit la formation de vaisseaux, également importante pour la migration des progéniteurs. Les ostéoclastes sécrètent aussi directement des facteurs favorisant la transition vers la formation osseuse, comme la S1P (Sphingosine-1-Phosphate), le CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) ou des cytokines comme l'IL-6 (interleukine 6) et l'OSM (oncostatin M). En plus de ces médiateurs connus, les ostéoclastes en cours de maturation sécrètent du RANK contenu

dans des vésicules [58]. Le RANK, après libération de la vésicule, se fixe au RANKL présent à la surface membranaire du précurseur d'ostéoblastes. Cette interaction RANK/RANKL induit la signalisation intracellulaire, activant RUNX2. Cela entraîne la différenciation ostéogénique et la formation osseuse (Figure 2) [58]. Enfin, certains facteurs ne sont présentés qu'à la membrane des ostéoclastes et nécessitent un contact cellulaire, notamment avec les ostéoblastes pour induire efficacement un signal. Par exemple, l'éphrine B2, présent à la surface des cellules ostéoclastiques interagit avec son récepteur, EphB4, présent à la surface des cellules ostéoblastiques, inhibant alors la résorption osseuse et activant la formation osseuse [59]. La forte concentration de calcium libérée par la destruction de la matrice est un autre inhibiteur de l'activité de résorption. La phase de résorption se termine par l'apoptose des ostéoclastes.

La phase de réversion ou d'inversion, correspond au changement de cellules « actives » (Figure 2). L'inversion sépare les principales phases de résorption et de formation où les ostéoclastes laissent place aux ostéoblastes. Cette phase n'est pas encore bien comprise mais il semblerait que deux événements clés se produisent. Le premier consiste à préparer la surface osseuse venant d'être résorbée pour le dépôt de la nouvelle matrice osseuse [46]. Cette préparation est effectuée par des cellules ostéoblastiques, qui remplacent la matrice collagénique non minéralisée par la ligne de ciment, une matrice minéralisée non-collagénique favorisant l'adhésion des ostéoblastes [60]. Les cellules qui synthétisent la ligne de ciment semblent à la fois cibler le signal de couplage émis par les ostéoclastes et le relayer aux ostéoblastes. Le second événement consiste à coupler la résorption à la formation garantissant le fait qu'il n'y a pas de perte osseuse nette. Cela signifie que des ostéoblastes sont recrutés à partir d'un signal de couplage émis par les ostéoclastes. Le signal exact qui couple la résorption osseuse à la formation ultérieure n'est pas encore totalement compris. Cependant, il est probable que les cellules de la phase d'inversion soient impliquées dans l'envoi ou la réception de ces signaux. Les ostéoclastes peuvent être la source du facteur de couplage, par exemple en sécrétant des cytokines telles que l'IL-6 par l'intermédiaire d'un récepteur régulateur à leur surface [46]. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de l'éphrine dont le ligand membranaire est présent sur les ostéoblastes (Figure 2) [61]. D'autres voies de signalisation peuvent inclure des facteurs dérivés de la matrice tels que la BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2), le TGF- β et l'IGF-1. Le TGF- β , par exemple, inhibe la production de RANKL par les ostéoblastes et met fin à la résorption (Figure 2) [59,62].

La phase de formation correspond à la formation du nouvel os (Figure 2). Une stimulation mécanique et un signal endocrinien, dirigés par la PTH, peuvent exercer des signaux de formation osseuse via les ostéocytes. Dans des conditions de repos, les ostéocytes expriment

la sclérostine [63], molécule soluble se liant à la protéine LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein-5/6) et inhibant la signalisation Wnt [64], ayant un rôle dans de la formation osseuse. Une contrainte mécanique et une liaison de la PTH sur ses récepteurs présents à la surface des ostéocytes [65], inhibent l'expression de la sclérostine par les ostéocytes, supprimant ainsi l'inhibition de la signalisation Wnt et permettant la formation osseuse dirigée par Wnt (Figure 2) [66]. La formation osseuse peut être divisée en 2 parties. Premièrement, les ostéoblastes synthétisent et sécrètent une matrice ostéoïde, tissu osseux sans calcium, riche en collagène de type I, en protéines non collagéniques, y compris les protéoglycanes et les protéines glycosylées ainsi qu'en facteurs de croissance. Deuxièmement, les ostéoblastes procèdent ensuite à la régulation de la minéralisation de cette matrice, en déposant des cristaux minéraux d'hydroxyapatite sur le tissu ostéoïde [67]. La minéralisation dite primaire, soit 60 %, s'effectue les premiers jours. Les 40 % restants sont apposés à un taux décroissant sur une durée de 6 mois environ. Cette phase est appelée phase de minéralisation secondaire. Le mécanisme précis de la minéralisation n'a pas encore été entièrement décrit. Néanmoins, la phosphatase alcaline non spécifique des tissus [68], la phosphodiesterase de la pyrophosphatase nucléotidique et l'ANK (progressive ankylosis) semblent être impliquées dans la génération de la concentration extracellulaire optimale de phosphate inorganique permettant la minéralisation [69]. A l'inverse de la résorption, les concentrations en ions phosphate et calcium stimulent la formation osseuse et au fur et à mesure de leur consommation, l'activité diminue. A la fin des cycles, les ostéoblastes sont piégés dans la matrice sous forme d'ostéocytes, deviennent des cellules de revêtement osseux ou disparaissent par apoptose [46].

Une fois que la structure osseuse est complètement formée, la zone est en quiescence jusqu'à ce qu'un nouveau processus de remodelage vienne la remplacer. Cette dernière étape correspond à une phase de repos, également appelée phase de terminaison (Figure 2).

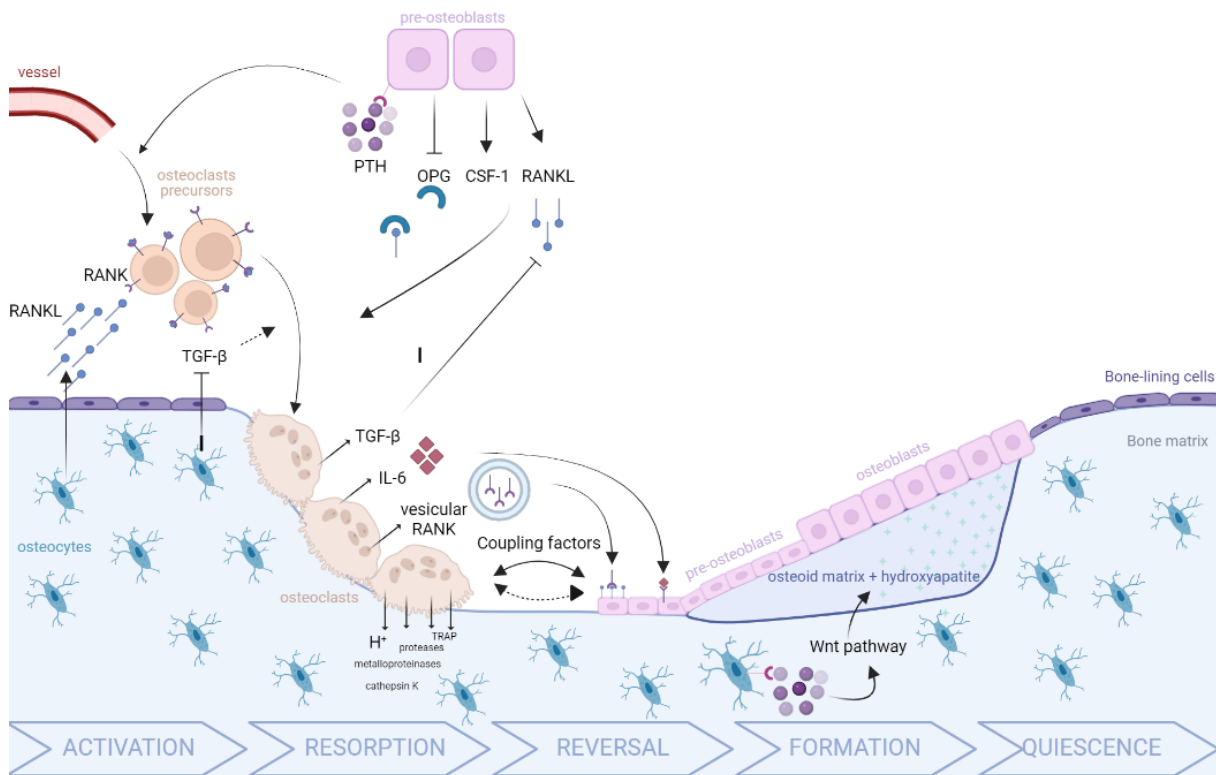


Figure 2 : Schéma du remodelage osseux. Les cinq étapes qui régissent le renouvellement osseux sont : 1) l'activation, initiant le remodelage osseux en recrutant des pré-ostéoclastes ; 2) la résorption, consistant à dégrader la matrice osseuse par les ostéoclastes ; 3) l'inversion, correspondant au changement de cellules « actives » où les ostéoclastes laissent place aux ostéoblastes ; 4) la formation, entraînant la formation de la nouvelle matrice osseuse et 5) la terminaison, correspondant à une phase de repos.

RANK: Receptor Activator of Nuclear κ B; RANKL: Receptor Activator of Nuclear κ B Ligand; TGF- β : Transforming Growth Factor β ; PTH: ParaThyroid Hormone; OPG: OsteoProteGerin; CSF-1: Colony-Stimulating Factor 1 Receptor; IL-6: InterLeukin-6; TRAP: Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; Wnt: Wingless-related integration site

Pour assurer une masse osseuse constante, la formation osseuse doit contrebalancer précisément la résorption, ce qui implique que l'action des ostéoblastes et des ostéoclastes doit s'effectuer en parfaite coordination. Le déséquilibre de la balance fonctionnelle entre les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques peut entraîner le développement de pathologies comme l'ostéoporose, où la résorption osseuse est plus importante que la formation osseuse, ou à l'inverse l'ostéopétrose, où la formation osseuse est plus importante que la résorption de l'os [70]. Ce déséquilibre, faisant suite à un événement oncogénique transformant une cellule normale en cellule cancéreuse, peut également entraîner la formation d'un cancer osseux.

2. L'ostéosarcome

Les sarcomes sont des tumeurs rares représentant moins de 1 % des nouveaux cas de cancers en France. Il existe deux sous-groupes distincts de sarcomes : les sarcomes des tissus mous et les sarcomes touchant les tissus durs ou le tissu osseux. Les sarcomes des tissus mous prennent naissance dans le tissu conjonctif ou le tissu de soutien, tel que le tissu adipeux (liposarcome), les muscles (rhabdomyosarcome), le tissu fibreux comme les tendons ou les ligaments (fibrosarcome), le tissu synovial (le sarcome synovial), les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (angiosarcome) ou encore les nerfs périphériques (tumeur maligne de la gaine nerveuse périphérique). Les sarcomes des tissus durs, quant à eux, se développent à partir des os et du cartilage. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) recense une vingtaine de sarcomes des tissus durs ou du tissu osseux. Les principaux sont l'ostéosarcome se développant à partir de l'os, le chondrosarcome, généralement originaire des cellules cartilagineuses, et le sarcome d'Ewing, se développant généralement dans les os. L'ostéosarcome ainsi que le sarcome d'Ewing ont la capacité d'envahir les tissus mous. L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes, représentant environ 30 % des sarcomes osseux.

a) Origine

Des altérations dans la voie de différenciation des CSM en ostéoblastes matures est un mécanisme possible contribuant au développement de l'ostéosarcome [71]. Il a été décrit, dans un premier temps, que la cellule d'origine de l'ostéosarcome est une cellule souche mésenchymateuse [72]. Cette dernière est une cellule indifférenciée, ayant un potentiel d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation [73]. La cellule souche mésenchymateuse est le précurseur cellulaire des lignées ostéoblastique, chondroblastique mais également adipocytaire [74–76]. Cette première hypothèse suggère que l'ostéosarcome survient après l'apparition de mutations au sein d'une population de cellules qui s'engagent ou sont engagées dans la lignée ostéoblastique. Ainsi, ce phénotype tumoral est déterminé par le nombre et le type de mutations subies par un type de cellules. Cela donne lieu à une variété de sous-types de tumeurs qui dépendent de la constitution génétique individuelle (Figure 3A) [77]. Plus récemment, il a été suggéré que la cellule souche mésenchymateuse peut devenir cancéreuse à n'importe quelle étape de son processus de différenciation [78]. Cela signifie que la cellule à

l'origine de l'ostéosarcome pourrait être une cellule qui est plus ou moins engagée dans le processus de différenciation ostéoblastique [79–81], expliquant l'existence des principaux sous-types histologiques d'ostéosarcome [77]. Dans ce modèle, les différents sous-types de tumeurs résultent alors d'événements oncogéniques ayant lieu dans les différentes populations cellulaires tout au long du parcours de différenciation (Figure 3B) [77].

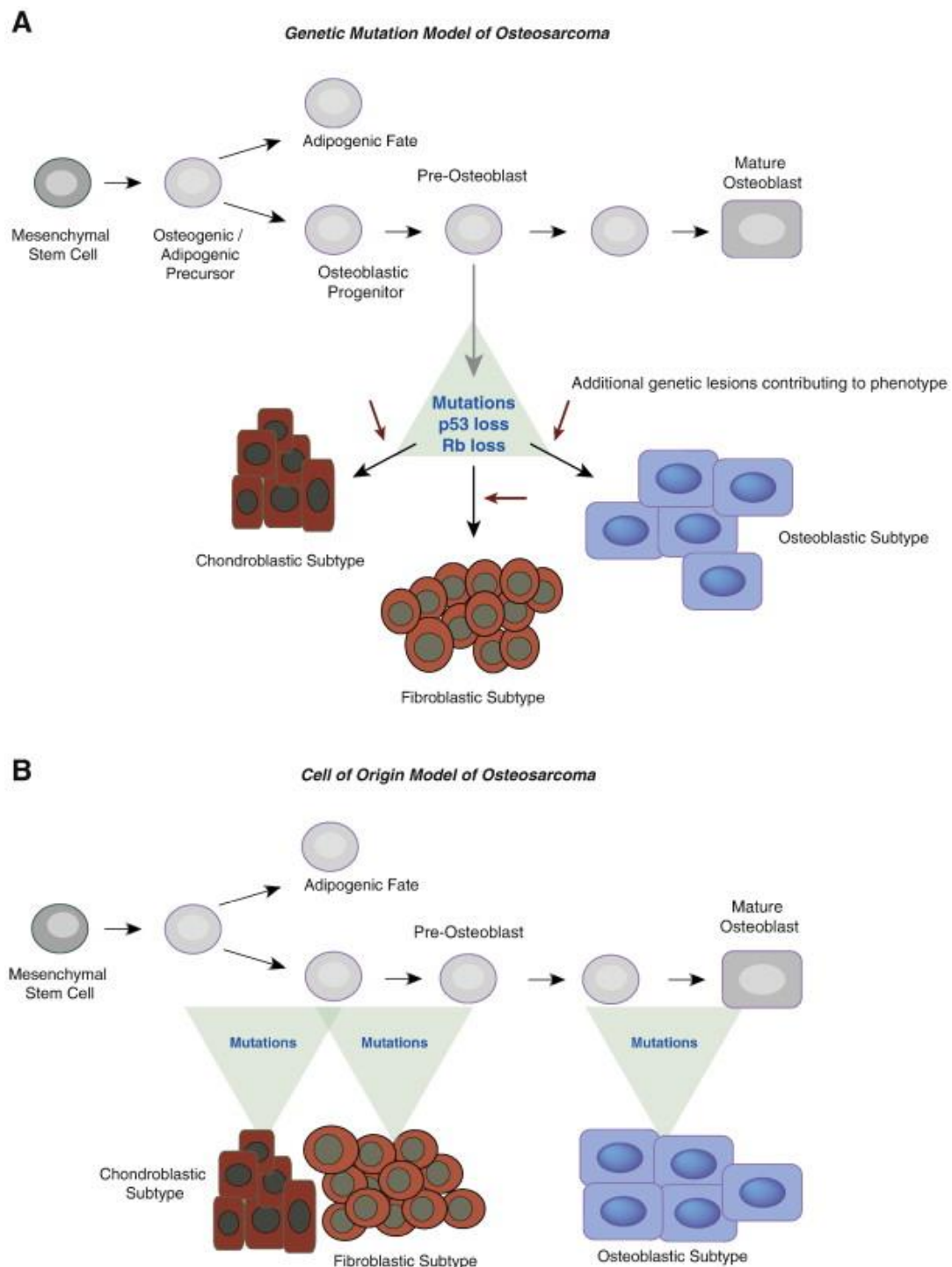


Figure 3 : Origine de l'ostéosarcome. (A) Selon le concept de mutation génétique, différents sous-types d'ostéosarcome peuvent se développer à partir d'un seul type de cellule en fonction de la nature des mutations

accumulées. (B) Selon la théorie de la "cellule d'origine", des cellules distinctes de la voie de différenciation, allant des cellules souches mésenchymateuses aux ostéoblastes, donnent naissance à des sous-types particuliers d'ostéosarcome. (*Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cell or osteoblast committed cells* – Anthony J. Mutsaers)

b) Épidémiologie

Ce cancer affecte principalement les enfants et les jeunes adultes avec un pic d'incidence à 18 ans [82]. Un second pic d'incidence, concernant les personnes âgées de plus de 60 ans, correspond à des ostéosarcomes secondaires à une autre pathologie comme des pathologies osseuses pré-existantes ou des fractures [83]. Ce sarcome représente 3 à 6 % des cancers de l'enfant et 1 % des cancers de l'adulte. Il est à l'origine de 8,9 % des décès liés au cancer chez les enfants [84,85]. Le taux d'incidence mondial de l'ostéosarcome est estimé à 4,7 cas par million et par an [84,86]. En France, l'ostéosarcome touche de 100 à 150 nouveaux patients par an.

c) Étiologie

A l'heure actuelle, la survenue des ostéosarcomes se trouve encore méconnue. L'étiologie de l'ostéosarcome est complexe et mal comprise. La plupart des cas sont sporadiques. Néanmoins le développement des ostéosarcomes peut être lié à certains facteurs de risques comme des facteurs épidémiologiques, des déficiences génétiques et des facteurs environnementaux [87,88].

Le fort remodelage osseux ainsi que la forte croissance osseuse au moment de la puberté [89–92], la taille [93–97], le sexe [83,93,94,98–101] mais également l'origine ethnique [87,102] peuvent être des facteurs de risque. Comme évoqué précédemment, le premier pic d'incidence concerne des enfants et adolescents au moment de la puberté, période où le remodelage osseux ainsi que la croissance osseuse sont importants. Les enfants qui développent un ostéosarcome sont en général plus grands que les enfants de même sexe au même âge. Il a également été observé que les patients ayant une tumeur primaire localisée au fémur sont en moyenne plus grands que les patients atteints d'ostéosarcome se développant au niveau d'autres sites anatomiques [103]. Cela peut ainsi être mis en relation avec la croissance rapide des os.

En ce qui concerne le sexe, il existe une prédominance masculine avec un ratio d'1 fille atteinte pour 1,4 garçon. Cependant, les probabilités sont équivalentes entre les sexes, chez les individus de plus de 60 ans [83,87]. De plus, pour des patients de moins de 20 ans, les populations afro-américaines semblent avoir des incidences plus élevées par rapport aux populations caucasiennes [85,87].

Des facteurs génétiques peuvent augmenter le risque d'ostéosarcome. Les maladies héréditaires rares dues à des mutations génétiques spécifiques peuvent augmenter le risque de développer un ostéosarcome [104,105]. Des études du séquençage du génome entier (Whole-Genome Sequencing) ou des exons (Whole-Exome Sequencing), montrent une prévalence ainsi que l'importance de l'altération des gènes suppresseurs de tumeurs TP53 (Tumor Protein 53) et RB1 (Retinoblastoma 1) sans les événements oncogéniques des ostéosarcomes [106–108]. Les mutations autosomiques dominantes du gène suppresseur de tumeur TP53 sont à l'origine du syndrome de Li-Fraumeni. Or, de nombreux patients atteints d'ostéosarcome, de 10 à 39 %, présentent des mutations de TP53 [109]. Cependant, la présence de ces mutations n'a pas toujours été associée au stade ou au pronostic de la maladie. Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine et est le résultat de la mutation du gène suppresseur de tumeur, RB1. Les altérations de ce gène ont été associées à une prédisposition à développer un ostéosarcome. La perte d'hétérozygotie a été montrée dans 40 à 70 % des cas d'ostéosarcome [88]. De plus, ce sarcome est la deuxième tumeur la plus fréquente chez les patients atteints de rétinoblastome [110]. En effet, 12 % des patients atteints de rétinoblastome développent des ostéosarcomes. Il n'a cependant pas été déterminé si l'altération des gènes TP53 et RB1 sont responsables de l'instabilité à l'origine de l'oncogenèse des ostéosarcomes ou si l'instabilité génétique est à l'origine des altérations de ces deux gènes suppresseurs de tumeurs. L'oncogène MDM2 (Murine Double Minute 2), code pour une protéine qui s'associe à P53, inhibant son activité transcriptionnelle et favorisant sa dégradation. Des altérations, telles qu'une surexpression ou une mutation, de cet oncogène ont été retrouvées dans certains ostéosarcomes [108,111]. D'autres gènes tels que les gènes DLG2 (Discs Large MAGUK Scaffold Protein 2), impliqué dans la division et la migration cellulaire et ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked), impliqué dans le remodelage de la chromatine et l'assemblage du nucléosome ou encore l'APC (Adenomatous Polyposis Coli), gène suppresseur de tumeurs, sont également fréquemment mutés dans l'ostéosarcome [108,111]. D'autres oncogènes sont amplifiés dans l'ostéosarcome, tels que MYC (7 à 10 % des cas), PRIM1 (DNA Primase Subunit 1) (41 % des cas) et VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) (60 % des cas) [111]. Les ostéosarcomes peuvent survenir secondairement à d'autres pathologies comme la maladie de Paget, le

rétinoblastome héréditaire ainsi que d'autres anomalies chromosomiques. La maladie de Paget est une maladie osseuse métabolique assez fréquente, où le remodelage osseux est intense. Cette maladie survient généralement chez des personnes âgées. Environ 1 % des patients atteints de cette maladie développera par la suite un ostéosarcome, ce qui laisse penser que ce sarcome pourrait être étiologiquement associé à un remodelage osseux anormal [112]. Les patients atteints du syndrome de Rothmund-Thomson, une maladie rare, qui développent un cancer, sont majoritairement atteints d'ostéosarcome [113]. Ce cancer est également plus fréquent chez des patients atteints du syndrome de Bloom, dû à des mutations de l'hélicase BLM, que dans la population générale [114]. D'autres maladies génétiques comme l'anémie de Blackfan-diamond (rupture chromosomique, instabilité génétique importante), le syndrome de Werner (mutation du gène codant pour l'hélicase RecQ) ainsi que le syndrome de Rapadilino (mutation du gène d'une hélicase impliqué dans la réparation de l'ADN, RecQL4) peuvent aussi être à l'origine du développement de l'ostéosarcome chez certains patients [111,115,116]. Une étude d'échantillons de biopsies pré-thérapeutiques a permis de mettre en évidence que l'amplification des chromosomes 6p21, 8q24 et 12q14, la perte des chromosomes 9, 10, 13 et 17, la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q21.1 en plus du gain du chromosome 1 sont des modifications communes et des anomalies chromosomiques corrélées à l'ostéosarcome [117]. Il est à noter que toutes ces maladies rares peuvent être à l'origine de cancers, autres que l'ostéosarcome et que la prise en charge thérapeutique de la plupart d'entre eux est la radiothérapie. Or la combinaison de ce traitement avec l'instabilité génétique des patients affectés par ces pathologies favorise la survenue d'ostéosarcome secondaires, ce qui correspond à 3 % des cas d'ostéosarcome [118–120].

Des facteurs environnementaux peuvent aussi augmenter le risque de développement d'ostéosarcome. C'est le cas des radiations ionisantes ainsi que des agents alkylants [121]. En effet, les radiations ionisantes sont impliquées dans près de 3 % des ostéosarcomes. Les patients souffrant de spondylarthrite ankylosante, ayant reçu du radium ont une fréquence d'apparition d'ostéosarcome augmentée. Les enfants présentant une tumeur solide traitée par radiothérapie ont une progression de 5,4 % d'un néoplasme, dont 25 % de sarcomes [122]. Cependant les très faibles doses de radiations, reçues par exemple par des rayons X ou des scanners, ne sont pas associées à un risque plus élevé de développer un ostéosarcome [123]. Les médiateurs alkylants comme les moutardes azotées, l'ifosfamide, le cyclophosphamide, les anthracyclines mais également les agents chimiques contenant du méthylcholanthrène et des sels de chrome, du silicate de zinc et de béryllium, de l'oxyde de béryllium, des colorants d'aniline ainsi que de l'amiante peuvent être impliqués dans la progression de l'ostéosarcome [124].

d) Caractérisation clinique

L'ostéosarcome est caractérisé par la formation d'os immature ou d'un tissu ostéoïde, moins organisé que le tissu osseux physiologique, par les cellules tumorales. Cette formation est associée à des zones d'ostéolyse péri-tumorale, révélatrices d'un important remodelage osseux anarchique.

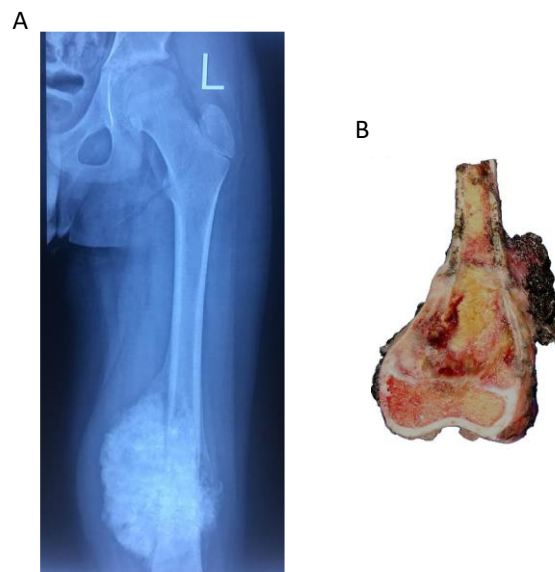


Figure 4 : Fémur atteint d'un ostéosarcome intramédullaire. A) Radiographie d'un ostéosarcome intramédullaire conventionnel de haut-grade avec formation d'os ectopique par les cellules tumorales. B) Masse intramédullaire avec hémorragie et nécrose dans la partie distale du fémur (Osteosarcoma : A comprehensive review of management and treatment strategies – Farzaneh Jafari).

Chez 80 % des patients, les sites anatomiques préférentiels de développement des ostéosarcomes sont les métaphyses des os longs, principalement les zones de croissance osseuse rapide. En effet, 40 % des ostéosarcomes sont localisés au niveau du fémur (extrémité inférieure), 20 % au niveau du tibia (extrémité supérieure), et enfin 10 % à l'humérus (extrémité supérieure) [125,126]. Dans de rares cas (moins de 10 % des cas), la diaphyse et l'épiphyse peuvent être des zones où surviennent les ostéosarcomes. Ce sarcome osseux peut également se développer au sein du squelette axial, comme les côtes, le sternum etc. ainsi que, dans 20 % des cas, au niveau des tissus mous. Des cas d'ostéosarcome ont néanmoins été décrits pour tous les os du squelette [84].

Dans 80 % des cas, l'ostéosarcome se présente sous forme localisée au moment du diagnostic. Pour les patients ne présentant pas de métastases, le taux de survie à 5 ans est d'environ 75 %. Dans 10 à 20 % des cas, des métastases, principalement pulmonaires sont présentes au moment du diagnostic [83,127–130]. Le taux de survie à 5 ans de ces patients chutent drastiquement à 20 %. Dans 85 à 90 % des cas, les métastases se situent aux poumons [131]. Il est cependant important de noter que 30 à 50 % des patients atteints d'ostéosarcome localisé au moment du diagnostic rechutent, dont 80 % avec des tumeurs aux poumons et 9 % au niveau de sites osseux [132]. Cela peut en partie s'expliquer par la présence, dans 60 à 80 % des cas, de micrométastases indétectables au moment du diagnostic [133–136]. Les patients présentant des métastases au diagnostic ont, quant à eux, une fréquence plus élevée de rechute (80 %).

e) Diagnostic

Les ostéosarcomes peuvent ne présenter aucun symptôme pendant une longue période. Les symptômes dépendront de la partie du corps affectée. Néanmoins, le premier symptôme constituant le motif de consultation des patients atteints d'ostéosarcome est une douleur osseuse persistante autour de la zone affectée avec ou sans masse palpable. Une fracture peut parfois survenir. Des symptômes systémiques tels que la perte de poids, la fatigue, la fièvre, etc. peuvent également se déclarer. En raison de la nature complexe des ostéosarcomes, le diagnostic est réalisé par une approche multidisciplinaire [137].

Dans un premier temps, des examens radiologiques permettent de mettre en évidence les atteintes osseuses caractérisées par des lésions ostéocondensantes et/ou ostéolytiques et de déterminer l'étendue de l'ostéosarcome. Environ 25 % des patients atteints d'ostéosarcome présentent des métastases radiographiquement détectables au moment du diagnostic [138]. L'étendue de la tumeur et l'éventuelle présence de métastases peuvent également être mises en évidence par des examens tels que l'IRM (Imagerie par Résonnance Magnétique), la TDM (TomoDensitoMétrie), une scintigraphie osseuse, aussi appelée une TEP-scan (Tomographie à Émission de Protons-scan).

Des analyses sanguines, permettant l'étude de marqueurs biochimiques sériques peuvent également être réalisées à des fins diagnostiques et pronostiques [139,140]. En effet une augmentation de la LDH (lactate dehydrogenase) est associée à des taux de survie plus faibles

chez les patients atteints d'ostéosarcome [141]. Le niveau sérique de la ALP (Alcaline Phosphatase alcaline) augmente, chez 40 à 80 % des patients souffrant d'ostéosarcome. Cette augmentation est liée à l'activité ostéoblastique des cellules tumorales. L'élévation du taux d'ALP apporte des informations supplémentaires quant au pronostic puisqu'elle a été corrélée avec le volume de la tumeur et est associée à un mauvais pronostic [142,143]. De plus, un niveau sérique de cette même enzyme restant élevé après traitement du patient peut être révélateur d'une rechute ou de la présence de métastases [143,144]. En outre, les micro-ARN circulants possèdent un potentiel prometteur en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans l'ostéosarcome. Par exemple, les patients atteints d'ostéosarcome ont des niveaux de miR-194 significativement plus faibles comparés aux patients sains. De plus, une faible expression sérique de miR-194 est fortement corrélée à la présence de métastases, ainsi qu'à une survie plus faible. Ainsi, le miR-194 sérique pourrait être un nouveau biomarqueur pour la détection et le pronostic des ostéosarcomes [145].

Une analyse histologique d'une biopsie peut également être réalisée dans le but de confirmer le diagnostic mais aussi de déterminer le grade et le sous-type histologique de l'ostéosarcome dont il s'agit [146]. La protéine STAB2 (Special AT-rich Binding protein 2), une protéine de liaison à l'ADN et impliquée dans la régulation transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine, est, par exemple, un marqueur immunohistochimique permettant de confirmer le phénotype ostéoblastique des ostéosarcomes. Il est à noter que ce marqueur ne peut en revanche pas confirmer le caractère malin de la tumeur [147]. L'ostéocalcine, la protéine osseuse humaine la plus répandue, est aussi un marqueur du phénotype ostéoblastique et peut être utile pour identifier un ostéosarcome via des marquages immunohistochimiques [148].

f) Caractérisation histologique et classification des ostéosarcomes

Les cliniciens classifient l'ostéosarcome en fonction de sa localisation au niveau du site osseux et de son stade de développement via différents systèmes. Rendre compte de la gravité, de la présence ou de l'absence de métastases, adapter les traitements au type d'ostéosarcome, évaluer l'efficacité du traitement, estimer le pronostic du patient et faciliter la communication entre les experts médicaux sont tous des objectifs de ce classement. Les systèmes de classement utilisés sont le système Musculo-Skeletal Society (MSTS), aussi appelé système Enneking

décrit en 1980 permettant la stadification des tumeurs musculo-squelettiques malignes (Tableau I) et le système de classification de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) permettant la stadification des sarcomes osseux (Tableau II) [149].

Le système d'Enneking évalue et décrit la tumeur en fonction de la localisation au niveau du site osseux et du stade de développement. Les différents stades de développement sont les stades de bas grade (I), de haut grade (II) et métastatique (III). Une distinction est ensuite faite en fonction de l'étendue de la tumeur au niveau des sites intra-corticaux (A), c'est-à-dire si la tumeur est circonscrite à l'os, ou extra-corticaux (B), si elle affecte les structures environnantes. Les métastases peuvent être régionales, c'est-à-dire présentes dans les ganglions lymphatiques proches, ou à distance, lorsqu'elles se situent dans un autre organe. Le grade est caractérisé par le potentiel que possède la tumeur à croître et à se propager (Tableau I) [150].

Tableau I : Système de classification Enneking ou MSTS (Musculo Skeletal Tumor Society). Cette classification est basée sur la localisation au niveau du site osseux et du stade de développement.

Stade		Localisation	Grade	Métastase
I	A	Intra-compartimentale	Bas grade	x
	B	Extra-compartimentale	Bas grade	x
II	A	Intra-compartimentale	Haut grade	x
	B	Extra-compartimentale	Haut grade	x
III		Intra ou Extra-compartimentale	Bas ou Haut grade	Régionales ou à distance

La classification TNM (Tumor Node Metastasis) de l'AJCC distingue les stades avec métastases pulmonaires (IVA) de ceux avec des métastases non pulmonaires (IVB ou IVC) [151]. Le classement de l'AJCC contient donc les stades IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA, IVB et IVC (Tableau II). Dans ce classement, les lettres TNM représentent trois facteurs importants : T, la taille de la tumeur primaire, N, la propagation aux nœuds lymphatiques régionaux et M, la présence ou non de métastases. Un numéro, décrivant l'étendue de la tumeur (T,N,M) ainsi que son aspect histologique (G), est ensuite attribué à chaque lettre. La désignation T1 est donnée à une tumeur qui est délimitée à l'os et dont l'étendue ne dépasse pas 8 cm. En revanche,

les désignations T2 ou T3, définissent une tumeur qui affecte les structures environnantes et dont l'étendue est supérieure ou égale à 8 cm ou est discontinue dans le site osseux primaire, respectivement. La propagation des cellules tumorales aux nœuds lymphatiques est indiquée par le terme N1. En revanche, N0 indique une absence de propagation aux nœuds lymphatiques. M0 signifie qu'il n'y a pas de métastases, tandis que la présence de métastases est désignée par le terme M1. Il existe une distinction entre les métastases pulmonaires (M1a) et les métastases non-pulmonaires (M1b). Les termes G1 et G2 définissent une tumeur correctement ou modérément différenciée de bas grade, qui est moins susceptible de croître rapidement et de métastaser. Les grades G3 et G4 désignent, au contraire, une tumeur peu différenciée ou indifférenciée de haut grade qui a la capacité de se diviser rapidement et de métastaser. Ce système permet ainsi de définir différents stades de développement. Le stade I concerne des lésions de bas-grade bien différenciées, avec peu de mitoses et ne présentant que des atypies cytologiques modérées avec un faible risque de métastases (moins de 25 %). Le stade II implique des lésions de haut grade peu différenciées, avec un taux de mitoses élevé et un rapport cellules/matrice élevé. Ces stades sont subdivisés, selon l'implication du compartiment anatomique, en deux catégories A et B. Le stade III concerne les lésions de bas et haut grade, avec des foyers tumoraux synchrones au niveau de la tumeur primitive dans le même os avec intervalle de tissu sain ou dans un os du même segment de l'autre côté d'une articulation, formant alors des « skip » métastases ou métastases discontinues. Le dernier stade, le stade IV, concerne les lésions qui présentent des métastases (ganglionnaires ou à distance) quels que soit leur taille et leur grade (Tableau II). Une description plus précise de la tumeur peut être réalisée à l'aide de ce système de classement, subdivisant alors ces stades en une trentaine [150].

Tableau II : Système de classification TNM de l'AJCC où chaque stade est défini par la taille de la tumeur (T), le grade (G), l'envahissement des ganglions (N) et la présence ou non de métastases (M).

Stade		Tumeur (T)	Grade (G)	Ganglions (N)	Métastases (M)
I	A	T1	G1, G2	N0	M0
	B	T2			
II	A	T1	G3, G4		
	B	T2			
III		T3	Tout G		Discontinue ou « skip »
IV	A	Tout T	Tout G	N0	M1a

	B			N1	Tout M
	C			Tout N	M1b

Les ostéosarcomes sont classés en deux grandes catégories : les ostéosarcomes primaires et les ostéosarcomes secondaires. Le type le plus commun des ostéosarcomes primaires est le type conventionnel intramédullaire/central de haut grade, puisqu'il représente 80 à 90 % des cas d'ostéosarcome. Ce type d'ostéosarcome se développe dans la cavité médullaire des os longs tels que le fémur. L'ostéosarcome conventionnel comprend des variantes histologiques. En effet ce type d'ostéosarcome peut être, dans 50 % des cas ostéoblastique, dans 25 % des cas chondroblastique ou fibroblastique pour le dernier quart (Figure 5). La matrice sécrétée par les cellules tumorales est alors osseuse, cartilagineuse ou collagénique, respectivement. Globalement, ce type d'ostéosarcome constitue la forme la plus agressive, qui progresse le plus rapidement et qui est la plus destructrice. Tous les ostéosarcomes appartenant à ce type sont considérés comme micrométastatiques au moment du diagnostic [152]. L'ostéosarcome télangiectasique, un autre type d'ostéosarcome primaire, ne concernant que 4 % des ostéosarcomes, est, dans la plupart des cas, épiphysaire et de haute malignité [128]. Ce type d'ostéosarcome est très vascularisé caractérisé par la présence de cystes remplis de sang et de cellules géantes multinuclées. Parmi les ostéosarcomes primaires, l'ostéosarcome à petites cellules représente seulement 1 à 2 % des ostéosarcomes [128,153]. Les ostéosarcomes centraux de bas grade sont, quant à eux, caractérisés par la présence de cellules morphologiquement proches des fibroblastes et sont organisés en faisceaux. Ce type d'ostéosarcome représente moins de 2 % des ostéosarcomes et possède le meilleur pronostic comparé aux types précédemment décrits [128]. Les ostéosarcomes de surface, représentant 10 à 15 % des ostéosarcomes, se développent sur la surface externe des os ou sur le périoste, qui est la couche dense de tissu conjonctif qui recouvre les os. Ils se composent de l'ostéosarcome parostéal, de l'ostéosarcome périosté ainsi que de l'ostéosarcome de surface de haut grade [151]. L'ostéosarcome parostéal, représentant 4 à 6 % des ostéosarcomes, est un sous-type de bas grade. Il est caractérisé par une élaboration d'une matrice fibroblastique avec, dans environ 50 % des cas, une production de cartilage, limitée à la surface de l'os. Néanmoins, ce sous-type peut progressivement se développer et impliquer des structures plus profondes. L'ostéosarcome périosté est le seul sous-type de grade intermédiaire. Il se développe au niveau de la phase interne du périoste et est chondroblastique. L'ostéosarcome de surface de haut grade, plus rare puisqu'il représente 10 % des ostéosarcomes de surface, est de haute malignité [88]. Les ostéosarcomes extrasquelettiques forment un autre groupe d'ostéosarcome primaire. Ils sont

cependant extrêmement rares, puisqu'ils représentent moins de 5 % des ostéosarcomes. Ils se développent dans les tissus mous et ne sont pas attachés à l'os. Ces ostéosarcomes se développent souvent à l'endroit d'une radiothérapie antérieure. Enfin, il existe d'autres formes d'ostéosarcome telles que l'ostéosarcome ostéoblastique de type sclérosant, les ostéosarcomes ressemblants aux ostéoblastomes, les ostéosarcomes du type fibrome chondromyxoïde, les ostéosarcomes de type chondroblastomes, les ostéosarcomes à cellules claires, les ostéosarcomes de type histiocytome fibreux malin, les ostéosarcomes riches en cellules géantes et les ostéosarcomes épithélioïdes. Ces formes sont considérées comme des types d'ostéosarcome classiques car leur comportement biologique est similaire.

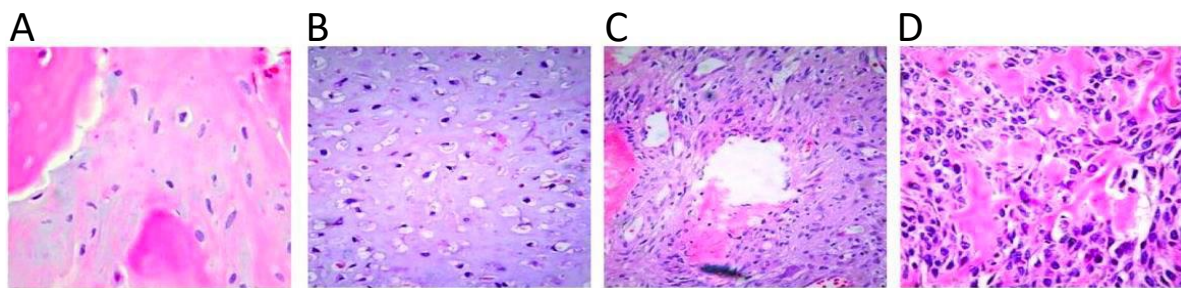


Figure 5 : Sous-types histologiques des ostéosarcomes humains de type conventionnel. Coloration à l'hématoxyline-éosine montrant : (A) Os normal (B) l'ostéosarcome de type chondroblastique, (C) l'ostéosarcome de type ostéoblastique et (D) l'ostéosarcome de type fibroblastiques. (Alpha-CaMKII Plays a Critical Role in Determining the Aggressive Behavior of Human Osteosarcoma - Paul G) [154] .

g) Prise en charge thérapeutique de l'ostéosarcome

Jusqu'aux années 1970, la seule prise en charge thérapeutique de l'ostéosarcome était la chirurgie, consistant à enlever la tumeur ou à amputer, mais avec un taux de mortalité avoisinant les 80 %. En effet, la résection tumorale n'a entraîné qu'un taux de survie d'environ 20 % à 5 ans [155]. Depuis lors, l'introduction d'agents de chimiothérapie a augmenté le taux de survie des patients atteints d'ostéosarcome et a réduit les amputations. En effet, le taux de sauvetage de membres des patients a été considérablement amélioré, puisque 85 % des patients ayant subi une résection de la tumeur depuis les années 2000 ont pu conserver leurs membres, alors que ce même taux n'était que de 45 % en 1970 [156,157]. Dans certains cas, comme après une chirurgie qui n'a pas permis la résection totale de la tumeur ou si la tumeur ne peut pas être enlevée, la radiothérapie est utilisée. Il est néanmoins important de noter que les ostéosarcomes

sont relativement résistants à ce traitement [158,159]. Les premiers protocoles de chimiothérapie ont été établis par le Dr Rosen et ont utilisés de fortes doses de méthotrexate, du cyclophosphamide, de la bléomycine et de la vincristine. Ces agents ont été administrés en chimiothérapie pré-chirurgicale et post-chirurgicale avec de la doxorubicine (Adriamycine). Actuellement, le traitement consiste en une polychimiothérapie néo-adjuvante, suivie d'une exérèse de la tumeur et enfin une chimiothérapie adjuvante. Les protocoles de polychimiothérapie sont adaptés selon l'âge du patients, les informations histologiques fournies par la biopsie, le grade de la tumeur mais également selon les centres de soins et les pays. Les molécules utilisées dans les protocoles de chimiothérapie néo-adjuvante traitant les ostéosarcomes sont une combinaison de méthotrexate à haute dose (chez l'enfant), de doxorubicine, de cisplatine, ainsi que d'ifosfamide [160,161]. Dans de nombreux pays, la combinaison du méthotrexate à haute dose, de la doxorubicine et du cisplatine est courante [162]. Néanmoins, les protocoles de chimiothérapie restent adaptables afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique [163]. En effet, l'association du méthotrexate à haute dose, de l'ifosfamide et de l'étoposide utilisée en France a aussi montré son efficacité chez de jeunes patients avec des taux survie comparables à ceux obtenus avec le traitement MAP (méthotrexate à forte dose + doxorubicine + cisplatine) [164]. Les agents de chimiothérapie ont différents mécanismes d'action. Ainsi, leur combinaison permet de cibler les cellules tumorales à plusieurs niveaux. Le méthotrexate inhibe la prolifération des cellules à division rapide en inhibant la réduction de l'acide folique. La doxorubicine est un antibiotique cytotoxique capable d'inhiber la topoisomérase II, de s'insérer avec des polymérase d'ADN et d'ARN, d'induire la formation de radicaux libres mais également de se lier aux membranes. Tous ces mécanismes d'action sont responsables d'un effet cytotoxique. La cisplatine est un antinéoplasique cytostatique capable de se lier à l'ADN et d'inhiber sa synthèse, empêchant la réplication de l'ADN et, par conséquent, la division cellulaire. L'ifosfamide est métabolisé en mafosfamide par le foie. Ce composé se lie à l'ADN pour bloquer sa synthèse, empêchant ainsi la cellule de se diviser [137,165,166]. Un des objectifs de la chimiothérapie néoadjuvante est d'endommager les cellules tumorales au niveau du site primaire afin de réduire la taille de la tumeur avant son exérèse. Cela permet également l'éradication des micrométastases mais aussi l'évaluation de la réponse histologique de la tumeur à la chimiothérapie. Cette réponse est évaluée selon le taux de nécrose présent au sein de la tumeur. Celui-ci est utilisé comme facteur pronostique puisque les mauvais répondeurs ont un taux de survie à 5 ans plus faible (45 à 55 %) que les bons répondeurs à la chimiothérapie néo-adjuvante (75 à 80 %). Les patients sont classés comme bons ou mauvais répondeurs selon le score de Huvos, composé de 4 grades, évaluant le

pourcentage de cellules tumorales viables au sein de la tumeur réséquée. Le premier grade du score de Huvos, grade I, correspond à un taux de nécrose de 0 % à 49 %. Dans ce cas, l'étude histologique montre peu ou pas d'effet apparent de la chimiothérapie. Le grade II correspond à un taux de nécrose allant de 50 % à 89 %. L'étude histologique montre la présence de quelques zones de tumeur histologiquement viable, mais aussi des zones d'ostéoïde tumorale acellulaire ainsi que de tissus nécrotique et/ou fibrotique. Le grade III, correspond à un taux de nécrose étant entre 90 % et 99 %. L'étude histologique montre des zones prédominantes de changement attribuables à la chimiothérapie, avec la présence de quelques foyers de tumeur histologiquement viable. Le dernier grade du score de Huvos, le grade IV, correspond à un taux de nécrose de 100 %. Dans ce cas, l'étude histologique n'apporte aucune preuve de la présence d'une tumeur viable (Tableau III). Si la tumeur présente un taux de nécrose inférieur à 90 % (grades I et II du score de Huvos), le patient est considéré comme mauvais répondeur. En revanche, un taux de nécrose supérieur ou égal à 90 % est révélateur d'une bonne réponse du patient à la chimiothérapie (Tableau III) [167]. Les protocoles de chimiothérapie peuvent être modifiés au cours de la prise en charge thérapeutique des patients. En fonction du taux de nécrose observé après résection de la tumeur, la chimiothérapie adjuvante, seconde phase de chimiothérapie, peut être adaptée. Les bons répondeurs reçoivent, dans la plupart des cas, les mêmes agents de chimiothérapie que ceux utilisés lors de la chimiothérapie néo-adjuvante, alors que les patients considérés comme mauvais répondeurs ou en rechute vont recevoir des combinaisons de chimiothérapies différentes de la première phase comme l'association de la doxorubicine et de l'ifosfamide [168], ou de la gemcitabine avec du docetaxel [169]. L'intérêt de cette seconde phase de chimiothérapie est de prévenir et limiter les rechutes ainsi que l'apparition de micrométastases pouvant se développer à la suite de l'exérèse de la tumeur.

Tableau III : Score de Huvos, évaluant le pourcentage de cellules tumorales viables après chimiothérapie néo-adjuvante et résection tumorale et permettant de classer les patients en bons ou mauvais répondeurs. Tableau adapté de l'article de Michelle B. Mintz – An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma [170].

Réponse du patient	Grade	% de nécrose	Description
mauvais répondeur	I	0 à 49	peu ou pas d'effets de la chimiothérapie

mauvais répondeur	II	50 à 89	zones de nécrose dues à la chimiothérapie avec des zones de tumeur viable
bon répondeur	III	90 à 99	seulement des foyers dispersés de cellules tumorales viables
bon répondeur	IV	100	pas de preuve histologique d'une tumeur viable

Même si le taux de survie à long terme est maintenant de 75 % pour les patients atteints d'une maladie non métastatique, soit 80% des patients, par rapport à 20 % avant les années 1970 [127,171], les patients traités par des agents de chimiothérapie souffrent malheureusement d'effets secondaires néfastes. En effet, les combinaisons d'agents de chimiothérapie peuvent entraîner une diminution de la production de cellules myéloïdes pouvant conduire à une anaplasie, des réactions gastro-intestinales, des mucites ou une alopécie. Les traitements actuels possèdent donc des limites, y compris une efficacité insuffisante puisque le taux de survie à long terme est encore faible pour les patients avec une maladie métastatique. En effet, les patients présentant des métastases, principalement pulmonaires, au moment du diagnostic (20 % des patients), possède un taux de survie à 5 ans qui diminue de façon spectaculaire pour atteindre seulement 20 %. De plus, depuis les années 1970 où la chimiothérapie a été introduite dans la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome, le taux de survie a cessé d'évoluer.

Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la maladie et de ceux permettant son développement est donc nécessaire. L'ostéosarcome et d'autres tumeurs métastasant à l'os comme le cancer du sein ou encore de la prostate détournent le remodelage osseux dans le but de se développer [172,173].

h) Cercle Vicieux

Les cellules tumorales détournent le microenvironnement osseux afin qu'il devienne bénéfique pour leur développement (Figure 5) [174]. Pour cela, les cellules tumorales produisent et sécrètent différents facteurs pro-ostéoclastiques tels que des facteurs de croissance : la PTHrP (ParaThyroid Hormone related Protein), l'IGF (Insulin Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ces différents facteurs vont participer à l'activation des ostéoblastes, qui en augmentant la sécrétion du RANKL et en limitant la production d'OPG, promeuvent la différenciation ainsi que

l'activité de résorption des ostéoclastes [174–176]. Les cellules tumorales peuvent également activer les ostéoclastes via la production de d'IL-6 (interleukine-6), d'IL-11(interleukine-11) ou l'IL-1 β (interleukine-1 β). L'activation exagérée des ostéoclastes entraîne une ostéolyse péri-tumorale [177]. La résorption de la matrice osseuse libère d'autres facteurs, tels que la BMP (Bone Morphogenetic Protein), le TGF- β (Tumor Growth Factor β), le PDGF (platelet-Derived Growth Factor), l'IGF-1 et le FGF stimulant la croissance tumorale [177]. Il s'établit alors un cercle vicieux entre la résorption osseuse impliquant les ostéoblastes, et les ostéoclastes et la prolifération des cellules tumorales. Tout cela permet un développement rapide la tumeur.

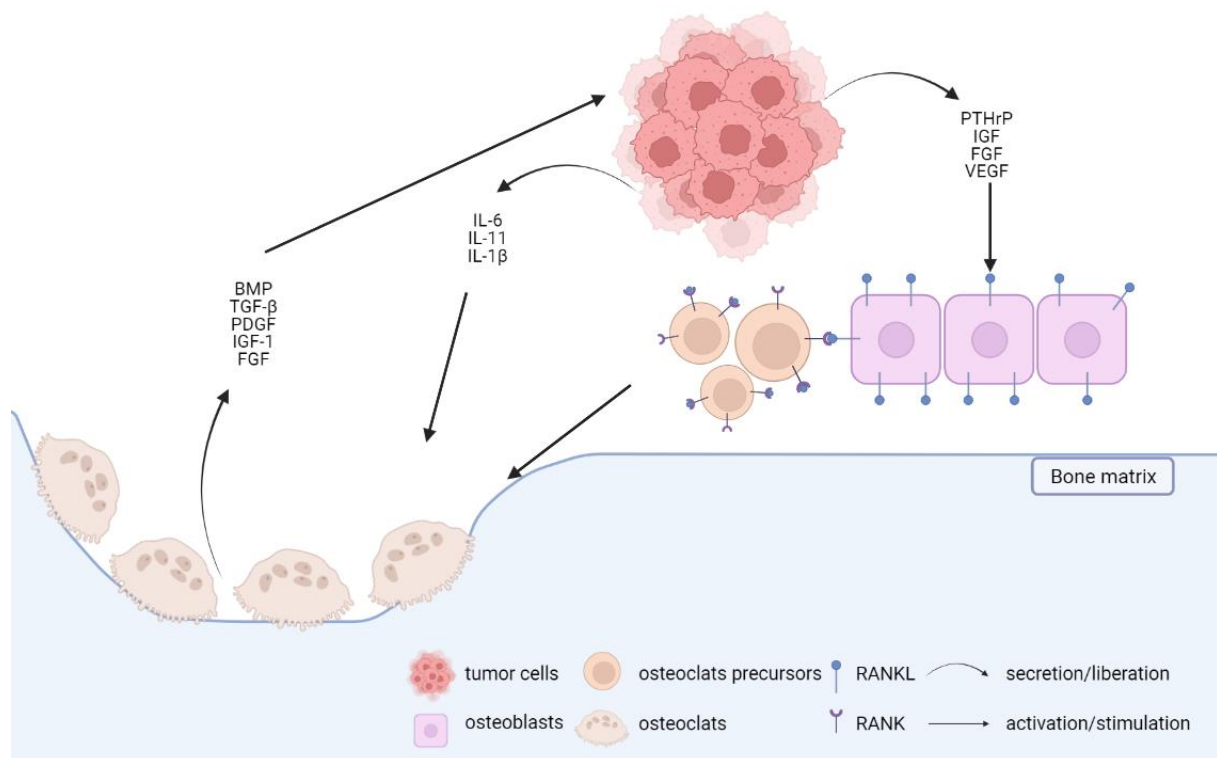


Figure 6 : Schéma du cercle vicieux de l'ostéosarcome. Les cellules tumorales produisent et sécrètent des facteurs solubles qui activent les ostéoblastes. Ces derniers sécrètent du RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand), qui participe à la différenciation des ostéoclastes. Ces cellules peuvent aussi être directement activées via la production de différentes cytokines par les cellules tumorales. Enfin, la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes libère des facteurs de croissance qui vont être capable de stimuler la croissance tumorale. PTHrP: ParaThyroid Hormone related Protein; IGF: Insulin-like Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; RANK: Receptor Activator of Nuclear κ B; RANKL: Receptor Activator of Nuclear κ B Ligand; IL-6: InterLeukin-6; IL-11: InterLeukin-11; IL-1 β : InterLeukin-1 β ; BMP: Bone Morphogenic Protein; TGF- β : Transforming Growth Factor β ; PDGF: Platelet-Derived Growth factor.

i) Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome

Immunothérapie :

L'immunothérapie est une des nouvelles approches thérapeutiques à l'étude dans l'ostéosarcome. Deux types d'immunothérapie sont utilisées dans le traitement des cancers : l'immunothérapie active et l'immunothérapie adoptive. L'immunothérapie active consiste à induire des réponses immunitaires contre les cellules cancéreuses. Tandis que l'immunothérapie adoptive, aussi appelée immunothérapie passive, repose sur l'administration *ex vivo* de cellules immunitaires cytotoxiques spécifique de la tumeur, notamment des lymphocytes T [178,179]. Ainsi, la thérapie cellulaire adoptive nécessite de prélever des cellules immunitaires autologues, telles que les TIL (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) ou les cellules NK (Natural Killer), d'expander ces cellules via des cultures *ex vivo* modifiées avec des récepteurs de cellules T (TCR) ou des récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) spécifiques des cellules tumorales, et de les réinjecter chez le patient [180,181].

L'une des stratégies d'immunothérapie consiste à activer les cellules de l'immunité telles que les cellules NK ou encore les macrophages en ciblant des antigènes spécifiques présents à la surface des cellules tumorales via des anticorps monoclonaux [182]. Plusieurs anticorps monoclonaux ont alors été développés et testés en clinique, notamment chez des patients atteints d'ostéosarcome.

La protéine HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2), jouant un rôle dans la croissance cellulaire, a pu être ciblée par un anticorps monoclonal. Les cellules cancéreuses peuvent présenter des anomalies génétiques du gène codant pour la protéine HER2. En effet, le gène HER2 peut être amplifié ou encore muté. Cela entraîne alors sa surexpression ou son activation fonctionnelle, favorisant la carcinogenèse [183]. L'efficacité du trastuzumab, un anticorps monoclonal ciblant HER2, a dans un premier temps été évaluée en monothérapie chez des patients atteints d'ostéosarcome métastatique. Cet essai clinique de phase II n'a pas montré d'effet bénéfique du trastuzumab chez les patients malgré une bonne tolérance du traitement. En effet, l'activité anti-tumorale entre les patients HER2-positifs et HER2-négatifs n'était significativement pas différente [184]. Depuis février 2021, la combinaison de ce même anticorps monoclonal, le trastuzumab, avec un médicament chimiothérapeutique inhibant la topoisomérase 3, le deruxtecan, est à l'étude dans un essai clinique de phase II incluant des

patients atteints d'ostéosarcome HER2-positifs nouvellement diagnostiqués ou récurrents (NCT04616560).

Deux autres anticorps monoclonaux, le R1507 (NCT00642941) [185] et le cixutumumab [186,187], ciblant cette fois-ci l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), ayant un rôle dans la croissance cellulaire et surexprimé dans de nombreux cancers [188], ont aussi été testés chez des patients atteints d'ostéosarcome. Ces deux essais cliniques n'ont cependant montré qu'une efficacité limitée de ces deux anticorps monoclonaux.

Un anticorps monoclonal radiomarqué, l'Omburtamab (anticorps 8H9) est utilisé dans le but de cibler la protéine B7-H3 (B7 Homologue 3 protein), également connu sous le nom de CD276, ayant pour rôle principal d'inhiber l'immunité adaptative en supprimant l'activation et la prolifération des cellules T [189]. L'évaluation clinique de cet anticorps est en cours dans un essai de phase I incluant des patients atteints de sarcomes et d'autres cancers (NCT00089245).

D'autres conjugués associant des anticorps monoclonaux avec des médicaments sont développés et leur efficacité est testée en clinique. Ces conjugués sont, par exemple, utilisés pour cibler la protéine B7-H3, citée précédemment. Des patients atteints de tumeurs malignes solides avancées sont actuellement inclus dans un essai clinique multicentrique de phase I/II ayant pour but d'évaluer l'effet du DS-7300a, un nouveau conjugué anticorps-médicament dont l'anticorps cible B7-H3 et le médicament est un inhibiteur de l'ADN topoisomérase I, le DXd (NCT04145622).

Ces conjugués anticorps-médicaments sont également utilisés pour cibler la protéine stomale LRRC15 (Leucine Rich Repeat Containing 15). Cette protéine membranaire, jouant un rôle dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, est fortement exprimée à la surface des cellules des fibroblastes stromaux dans de nombreuses tumeurs solides, y compris les ostéosarcomes. Son ciblage via des conjugués anticorps-médicament a montré son efficacité dans des modèles murins de xénogreffes d'ostéosarcome [190–192]. En clinique, un essai de phase I, a révélé que l'un de ces conjugué anticorps monoclonal-médicament, le samrotamab-vedotin (ABBV-085) était sûr et bien toléré et possédait une activité anti-tumorale prometteuse chez les patients ayant un ostéosarcome (NCT02565758) [193].

Les vaccins anti-cancéreux sont l'une des immunothérapies actives spécifiques qui potentialisent la réponse immunitaire contre les tumeurs par le développement direct d'anticorps monoclonaux contre les molécules de surface des antigènes spécifiques de la tumeur ou associés à la tumeur [178].

De jeunes patients atteints d'ostéosarcome (71 %) ont été sensibles au vaccin anti-idiotypique humain 105AD7, contenant un anticorps monoclonal humain imitant la protéine régulatrice du complément CD55, sans toxicité cliniquement significative [194]. De plus, plusieurs essais cliniques ont révélé que les vaccins à base de peptides peuvent également être utilisés comme traitement immunothérapeutique de l'ostéosarcome et d'autres tumeurs malignes en raison du partage des antigènes associés aux tumeurs ainsi qu'à leur expression élevée [195,196]. Les vaccins à base de cellules dendritique, cellules présentatrices d'antigènes activant la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques, sont les approches vaccinales les plus courantes dans les sarcomes pédiatriques. Les patients qui ont été traités avec ces vaccins ont présenté une survie à 5 ans prolongée, de 31 % à 43 %, par rapport aux patients du groupe témoin [197]. Même si ces vaccins anti-tumoraux ont renforcé la réponse immunitaire des cellules T, et ce même après une chimiothérapie, ils n'ont eu qu'un succès limité dans le traitement des tumeurs solides comme l'ostéosarcome [198]. Dans un essai de phase I, incluant des patients atteints de neuroblastome et de sarcome, la combinaison de la decitabine à un vaccin à base de cellules dendritiques a entraîné une réponse complète chez seulement 1 patient sur 10, tandis que le cancer a progressé chez 60 % des patients [199]. Le micro-environnement tumoral pourrait jouer un rôle dans le manque d'efficacité de ces vaccins anti-tumoraux [178].

L'immunomodulation, c'est-à-dire la modification du système immunitaire ou de la réponse immunitaire, peut s'effectuer par l'activation des cellules immunitaires, telles que les macrophages, via des molécules synthétiques ou des cytokines. De plus, la réponse immunitaire peut être amplifiée par le blocage des points de contrôle.

L'augmentation de l'activité anti-tumorale des cellules infiltrées peut être induite par des molécules synthétiques telles que le mifamurtide (muramyl tripeptide). Ce composé induit la sécrétion d'IL-6 (interleukine-6) ou de TNF (Tumor Necrosis Factor), activant à leur tour les cellules immunitaires comme les monocytes et les macrophages ayant un rôle anti-tumoral [200].

L'utilisation du mifamurtide en monothérapie, dans une étude randomisée de phase III incluant des patients atteints d'ostéosarcome, n'a pas montré de bénéfice [201]. En revanche, lorsque cette molécule synthétique est associée à la chimiothérapie, les patients souffrant d'un ostéosarcome possèdent une durée de vie sans événement ainsi qu'une survie globale augmentées [202]. La combinaison de la chimiothérapie avec le mifamurtide n'a néanmoins pas montré de différence significative entre les patients non métastatiques et métastatiques [203]. Suite aux résultats obtenus en clinique, l'utilisation du mifamurtide a été approuvée par

l'agence européenne du médicament, pour le traitement des patients atteints d'ostéosarcome âgés de 2 à 30 ans [204].

Les cytokines, libérées par les macrophages et les mastocytes, régulent les réponses immunitaires en stimulant les cellules immunitaires et en initiant des réponses inflammatoires lors de l'invasion d'antigènes étrangers [178]. Les cytokines immunosuppressives et pro-inflammatoires, telles que l'IL-8 et le TNF- α , sont corrélées à la progression de l'ostéosarcome [205]. Le rôle des cytokines, notamment dans l'activation des cellules T ou la modulation de la présentation des antigènes associés aux tumeurs, est largement utilisé en immunothérapie [179,206].

La cytokine de type interleukine, IL-2, induit l'activation et la différenciation des lymphocytes en LAK (Lymphokine-Activated Killer cell). Ces cellules reconnaissent et éliminent diverses cellules tumorales [207]. Une étude clinique réalisée chez des enfants atteints d'ostéosarcome métastatique a montré l'intérêt d'utiliser l'IL-2 et les LAK comme traitement d'immunothérapie. En effet, chez ces patients, la combinaison de la chirurgie, du traitement standard, de fortes doses d'IL-2 et de la ré-infusion de LAK, a permis d'obtenir un taux de survie à 3 ans de 34 % ainsi qu'un taux de survie globale de 45 % [208]. Même si l'utilisation de fortes doses d'IL-2 a permis à 2 des 4 patients atteints d'ostéosarcome de présenter une réponse complète, des effets secondaires sévères sont apparus suite à l'administration de ce traitement. En effet, tous les patients ayant reçu de l'IL-2 étaient fiévreux et présentaient des symptômes grippaux. Chez certains d'entre eux, une augmentation des globules blancs, de la créatinine, de la gamma-glutamyltransférase, de la protéine C-réactive, du glucose et du poids corporel ainsi qu'une diminution des globules rouges, des plaquettes, de l'albumine et de la cholinestérase ont été observées [209–211].

Suite à une infection virale, les cellules immunitaires produisent des cytokines de type interférons (IFN). Ces glycoprotéines ont montré une certaine efficacité dans les cancers [212]. Ainsi l'efficacité de certains interférons, comme l'IFN- α 2b (Interféron pégylé humain recombinant a), a été évaluée en clinique chez des patients souffrant d'ostéosarcome. Cependant, la combinaison de la chimiothérapie (MAP) et de l'IFN- α 2b pégylé n'a pas permis d'améliorer le taux de survie global des patients [162].

Les réponses immunitaires trop agressives, telles que la mort des cellules tumorales due aux cellules T sont limitées par les points de contrôle. L'inhibition de ces points de contrôle permet alors aux lymphocytes T de tuer les cellules tumorales [213]. Des anticorps monoclonaux dirigés contre les points de contrôle immunitaires tels que le CTLA-4 (Cytotoxic

T-Lymphocyte-Associated protein 4), le PD-1 (Programmed cell Death-protein 1) et son ligand, le PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) ont été mis au point et sont étudiés dans l'ostéosarcome [214]. Cependant, d'après les résultats des essais cliniques actuels, la plupart de ces inhibiteurs sont peu efficaces dans le traitement des tumeurs solides, y compris dans l'ostéosarcome [198,215].

CTLA-4, aussi connu sous le nom de CD152 (Cluster of Differentiation 152), est une glycoprotéine transmembranaire de type I. Ce récepteur est exprimé sur les cellules T activées, les Tregs (Lymphocytes T régulateurs) et les cellules T mémoires, et peut se lier et entrer en compétition avec B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) présents sur les cellules dendritiques, entraînant ainsi une inhibition fonctionnelle [216]. Le CTLA-4 est surexprimée chez les patients atteints d'ostéosarcome [217]. L'ipilimumab, un anticorps monoclonal IgG4 humain dirigé contre le CTLA-4 a été approuvé par la FDA, en 2011, comme inhibiteur de points de contrôle dans le traitement du mélanome [218]. Dans un essai clinique de phase I incluant des enfants atteints de tumeurs solides en rechute, y compris d'ostéosarcome, l'ipilimumab n'a pas montré de réponse anti-tumorale malgré une augmentation des niveaux et de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques [219]. PD-1 aussi connu sous le nom de CD279 (Cluster of Differentiation 279), est une protéine transmembranaire de type I appartenant à la famille des immunoglobulines et exprimée sur les cellules T CD8⁺ cytotoxiques activées, les cellules NK (Natural Killer) et les cellules B [220]. PD-L1, également connu sous les noms B7-H1 et CD274 (Cluster of Differentiation 274), est exprimé sur les cellules cancéreuses et les TIL (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) [221,222]. PD-L1 se lie au PD-1 entraînant l'inactivation des cellules T [223]. Dans l'ostéosarcome, les patients présentant une expression élevée de PD-L1 possèdent une faible survie sans événement à 5 ans par rapport aux patients ayant une faible expression de PD-L1 [224,225]. De plus, PD-L1 est plus fortement exprimé dans les tissus pédiatriques d'ostéosarcome métastatique que dans les échantillons primaires [226]. L'inhibition de l'interaction PD-1/PD-L1 a démontré un bénéfice clinique dans de multiples cancers [227,228]. L'effet du pembrolizumab, un inhibiteur de PD1/PD-L1, a été évalué dans des essais cliniques incluant des patients atteints d'ostéosarcome métastatique et avancé. Cette étude a montré une faible réponse au pembrolizumab [229–231]. L'efficacité d'un anticorps anti-PD-L1, l'avelumab, a été évaluée dans un essai clinique de phase II chez des patients présentant un ostéosarcome mais n'a pas montré d'activité anti-tumorale (NCT03006848) [232]. L'efficacité du nivolumab, un inhibiteur de PD-1, associé au regorafenib, un inhibiteur de récepteur tyrosine kinase, est actuellement évaluée dans un essai clinique de phase II, SARC038, incluant des patients atteints d'ostéosarcome réfractaire ou récidivant (NCT04803877).

Une des approches d'immunothérapie passive, évoquée précédemment, est basée sur la perfusion d'effecteurs immunitaires antitumoraux. Des études récentes ont rapporté que les CIK (Cytokine-induced killer), un mélange expansé ex vivo de lymphocytes T et de cellules de phénotype T-NK, possèdent une efficacité thérapeutique dans le traitement des sarcomes même dans les sCSC (sarcoma Cancer Stem Cell) chimiorésistantes [233]. Les CIK fournissent une alternative thérapeutique en clinique, comme le montre l'essai clinique de phase 1, CRX100, étudiant l'effet de la combinaison des CIK avec un virus oncolytique chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires, y compris des patients atteints d'ostéosarcome (NCT04282044).

La thérapie cellulaire CAR-T (Chimeric Antigenic Receptor-T), une autre forme d'immunothérapie adoptive, consiste à prélever des cellules immunitaires de patients, notamment des lymphocytes T, de les modifier génétiquement et de la réinjecter chez les patients [234]. La modification génétique des lymphocytes a pour but de produire un récepteur artificiel à la surface des lymphocytes T destiné à reconnaître des antigènes associés à la tumeur de manière indépendante du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) [235]. Les cellules CAR-T vont alors reconnaître et se fixer aux cellules cancéreuses exprimant un antigène cible spécifique. Cette fixation entraîne l'activation des cellules CAR-T et l'attaque des cellules cancéreuses.

L'efficacité des cellules CAR-T exprimant le récepteur de l'antigène chimérique spécifique de HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) a été étudiée dans un essai clinique de phase I/II comprenant des patients atteints d'ostéosarcome récurrent ou réfractaire exprimant HER2. La perfusion de cellules CAR-T a été bien tolérée et 3 des 14 patients ont montré une maladie stable [236]. Bien que la sécurité des cellules CAR-T ciblant HER2 ait été démontrée, un autre rapport a montré le décès d'un patient dû à une concentration trop élevée de cytokines sécrétées suite au traitement avec des cellules CAR-T ciblant HER2 [237]. Des cellules CAR-T dirigée contre l'antigène GD2 (DisialoGanglioside), surexprimé à la surface de la plupart des cellules d'ostéosarcome [238–240], font l'objet de différentes études cliniques. En effet, à ce jour plusieurs essais cliniques recrutent des patients atteints d'ostéosarcome récurrent ou réfractaire (NCT04539366, NCT03635632, NCT03373097).

De nouvelles stratégies thérapeutiques consistent à cibler les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), qui sont, dans environ 30 % des cancers, mutés ou surexprimés, notamment dans les ostéosarcomes [241]. Le dysfonctionnement des RTK est généralement lié à la néovascularisation, l'invasion, les métastases et la résistance à la chimiothérapie des tumeurs [242–253]. Cela peut s'expliquer par le fait que ces récepteurs transmembranaires sont composés d'un domaine extracellulaire, permettant la liaison du ligand, ainsi que d'un domaine intracellulaire à activité kinase, à l'origine de l'activation des voies de signalisation telles que la voie des PI3K (PhosphoInositide 3-Kinases) ou la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Les RTK sont classés en 20 sous-familles. Les familles des récepteurs EGFR/ErbB (Epidermal Growth Factor Receptor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) ou encore IGF (Insulin-like Growth Factor) sont celles qui sont particulièrement associées au cancer [254].

Plusieurs approches thérapeutiques ciblant les membres de ces différentes sous-familles de RTK ont donc été développées tels que le bevacizumab, l'oncolar, le robotumumab ou encore l'apatinib. L'inhibition du récepteur au VEGF par le bevacizumab en combinaison avec la chimiothérapie (MAP), n'a pas apporté d'effet bénéfique que ce soit au niveau de la réponse histologique au traitement ou au niveau du devenir des patients (NCT00667342) [255]. L'oncolar, un analogue de la somatostatine qui inhibe la production d'IGF-1, testé dans un essai clinique de phase I incluant des patients atteints d'ostéosarcome métastatique ou récurrent n'a pas non plus montré de réponse clinique satisfaisante [256]. Le robatumumab, un inhibiteur de l'IGF-1R a été testé dans un essai clinique de phase II et n'a pas montré d'effet chez les patients atteints d'ostéosarcome métastatique [257]. L'apatinib, un inhibiteur du VEGFR2 a été testé chez des patients atteints d'ostéosarcome avancé dans un essai clinique de phase II et a montré un taux de progression sans maladie à 4 mois de 57 % [258].

Globalement, l'utilisation d'inhibiteurs de RTK s'est révélée relativement inefficace de par l'émergence rapide de mécanismes compensatoires due à l'imbrication de différentes voies de signalisation en aval des RTK. Ces mécanismes entraînent donc une annulation des effets des molécules inhibitrices ciblant un nombre limité de RTK. D'autres approches ont alors été développées dans le but de contourner les mécanismes de résistance. Ces nouvelles thérapies

privilégient le ciblage simultané de plusieurs RTK ou de voies d'activation constitutives de ces récepteurs [259].

L'imatinib (STI571), un inhibiteur de RTK qui cible plusieurs récepteurs (PDGFR α et β , KIT, AXL, EGFR, IGF1R, etc.), le dasatinib, un inhibiteur des récepteurs KIT, EphA2 et PDGFR β n'ont pas montré d'activité anticancéreuse efficace dans les essais cliniques de phase II menés chez des patients atteints d'ostéosarcome [260–262]. En effet, dans l'ostéosarcome, le dasatinib a montré des effets anti-métastatiques, mais n'a pas réussi à inhiber la croissance de la tumeur primaire [263,264]. Deux études utilisant le dasatinib seul ou en association avec d'autres molécules sont en cours (NCT00464620, NCT00788125).

De plus, des molécules inhibitrices de multi-tyrosine kinase (mTKi), ont émergé et se sont distinguées par leurs effets majeurs chez les patients atteints d'ostéosarcome. De fait, le cediranib, inhibiteur des familles du VEGFR et du PDGFR a réduit de 34 % la taille des métastases présentes chez les patients souffrant d'ostéosarcome réfractaire [265].

De plus, l'effet de d'autres mTKi, comme le regorafenib, le sorafenib ou le cabozantinib a pu être testé chez des patients souffrant d'ostéosarcome avancé ou métastatique après échec d'un traitement antérieur. Le regorafenib, inhibiteur ciblant le VEGFR, le PDGFR, le KIT, le FGFR et RET, a montré une survie sans progression de 62 % à 12 semaines et une rémission partielle de 8 % lors des deux essais cliniques REGOBONE et SARCO24 (NCT02048371 et NCT02389244) [266,267]. Un essai clinique de phase II a permis d'évaluer l'efficacité du sorafenib, un inhibiteur de VEGFR, PDGFR, RET et c-Kit, et a montré une inhibition de la progression tumorale à 6 mois chez la moitié des patients [268]. Enfin, l'effet du cabozantinib, un inhibiteur des RTK VEGFR, KIT, RET, AXL et PDGFR, a été étudié dans le cadre d'un essai clinique multicentrique de phase II (NCT02243605). 12 % des patients traités avec cet inhibiteur ont développé une réponse partielle. De plus, la survie sans progression à 6 mois a été de 33,3%. Il s'agit du meilleur résultat obtenu par un mTKi dans le traitement de l'ostéosarcome à ce jour [269].

D'autres inhibiteurs ont été étudiés dans le cadre d'essais cliniques incluant des patients en rechute. Une étude de phase II a évalué l'efficacité du sorafenib (inhibiteur précédemment évoqué) chez ces patients et a montré des résultats encourageants (NCT00889057). En effet, parmi les 35 patients, 46 % ont présenté une survie sans progression à 4 mois et 9 % une rémission partielle. Cependant, le traitement a été réduit ou brièvement interrompu chez 46 % des patients en raison de sa toxicité [270]. L'utilisation du lenvatinib (ciblant VEGFR, PDGFR, KIT, FGFR et RET) est actuellement étudiée dans un essai clinique de phase I/II (NCT02432274). Les premiers résultats publiés ont montré une survie sans progression à 4

mois de 29 % [271]. Enfin, le pazopanib, un mTKi de seconde génération ciblant le VEGFR, le PDGFR et KIT a montré des effets positifs chez 3 patients en rechute pour la seconde fois, semblant stabiliser la progression de la maladie et donc prolonger la survie des patients [272].

Ciblage des voies de signalisation intracellulaire :

L'inhibition des RTK est prometteuse et activement étudiée, mais d'autres approches visent à inhiber la signalisation intracellulaire ayant une importance dans les processus cellulaires et dans le développement des cancers, y compris l'ostéosarcome, en aval de ces récepteurs.

De nombreux inhibiteurs ciblant les membres de ces voies ont été développés, tels que des inhibiteurs de kinases de la famille des src. Ces co-activateurs sont des protéines qui intègrent et régulent la signalisation de nombreux RTK (EGFR, PDGFR, IGF1R, VEGFR, HER2, etc.).

Le saracatinib (AZD0530), un inhibiteur sélectif de la kinase Src surexprimée dans l'ostéosarcome [273], a été testé chez des patients atteints d'ostéosarcome récurrent localisé aux poumons. L'étude a démontré une augmentation de la survie sans progression de 8,6 mois dans le groupe traité et de 19,4 mois dans le groupe placebo [274].

mTOR est une sérine/thréonine kinase, appartenant à la voie de signalisation PI3K/Akt dérégulée dans la plupart des cancers [275,276]. Cette protéine, impliquée dans la synthèse des protéines, le cycle ou encore la survie cellulaire et est surexprimé dans les ostéosarcomes [107,277]. Ainsi des inhibiteurs de mTOR, tels que le sirolimus, le ridaforolimus ou encore le CC-115 ont été développés et testés en clinique. La progression tumorale des patients atteints de sarcome osseux métastatique, a été faiblement mais tout de même significativement inhibée suite au traitement avec un analogue de la rapamycine, le ridaforolimus [278,279].

L'inhibition de mTOR et de la DNA-PK (DNA-dependant protein kinase), impliquée dans la réparation de l'ADN, par le CC-115, un analogue de la thalidomide [280], est actuellement à l'essai dans un essai clinique de phase I incluant des patients atteints de différentes tumeurs, dont l'ostéosarcome (NCT01353625).

Ciblage du cercle vicieux et inhibition du remodelage osseux :

Certaines stratégies thérapeutiques consistent à cibler le remodelage osseux, qui est exacerbé dans le cancer ainsi que le cercle vicieux de l'ostéosarcome. L'inhibition des acteurs majeurs du remodelage osseux, RANK/RANKL/OPG, a, montré des effets thérapeutiques bénéfiques dans l'ostéosarcome [82,174,281–284].

L'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant RANKL, le denosumab, est testée dans une étude clinique de phase II incluant des patients atteints d'ostéosarcome résistant aux thérapies conventionnelles ou en rechute (NCT02470091). La résorption osseuse peut également être ciblée par l'utilisation de biphosphonates tels que le pamidronate ou encore le zolédronate. Ce dernier, un analogue du pyrophosphate, se lie aux cristaux d'hydroxyapatite qui constituent la matrice osseuse et induit l'apoptose des ostéoclastes [285]. Un essai clinique de phase III (OS2006, NCT00470223) étudiant la combinaison du zoledronate avec la chimiothérapie n'a cependant pas montré d'amélioration de la survie des patients atteints d'ostéosarcome [286]. Une autre étude clinique de phase I combinant le zoledronate avec le méthotrexate, le cyclophosphamide et un inhibiteur de mTOR, le sirolimus, est en cours chez des patients atteints d'ostéosarcome (METZOLIMOS, NCT02517918).

Malgré de nombreux essais cliniques menés afin d'évaluer de nouvelles thérapies permettant la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome et notamment les patients présentant des métastases, la survie à long terme des patients reste inchangée. Une des causes de ce phénomène peut être l'apparition de mécanismes de résistance aux traitements chez certains patients.

Tableau IV : Nouvelles approches thérapeutiques de l'ostéosarcome testées en clinique. Tableau adapté de la revue « Origin and therapies of osteosarcoma » de Brice Moukengue et al [182].

Mécanisme		Cellule cible/gène/protéine	Agent utilisé	Référence clinique
Immunothérapie	Anticorps monoclonaux	HER2	Trastuzumab	184
		HER2 + topoisomérase 3	Trastuzumab + Deruxtecan	NCT04616560
		IGF-1	R1507	185 NCT00642941
			Cixutumab	186 - 187
		LRRC15	ABBV-085	186 NCT02565758
		B7H3	Omburtamab	NCT0089245
		B7H3 + topoisomérase 1	DS-7300a + Dxd	NCT04145622
	Vaccins	Complément CD55	105AD7	193
		Lymphocytes T cytotoxiques	DC	196 - 197
		Lymphocytes T cytotoxiques	DC + decitabine	199

		+ méthyltransférase de l'ADN		
	Immunomodulation	Monocytes/Macrophages	Mifamurtide	201
		Monocytes/Macrophages/Cellules tumorales	Mifamurtide + chimiothérapie	202- 203
		LAK + cellules tumorales	IL-2 + chimiothérapie	208 - 209 – 210 - 211
		Système immunitaire +/- cellules tumorales	IFN- α 2b +/- chimiothérapie	162
	Inhibition des points de contrôle	CTLA-4	Ipilimumab	219
		PD-1/PD-L1	Pembrolizumab	229 -230 - 231
		PD-L1	Avelumab	232 NCT03006848
		PD-1 + TKR	Nivolumab + regorafenib	SARCO38 / NCT04803877
	Perfusion d'effecteurs immunitaires anti-tumoraux	Système immunitaire	CIK + virus oncolytique	CRX100 / NCT04282044
		HER2	Cellules CAR-T	236 - 237
		GD2	Cellules CAR-T	NCT04539366 NCT03635632 NCT03373097
Ciblage des Récepteurs à Tyrosine Kinase		VEGFR + cellules tumorales	Bevacizumab + chimiothérapie	249 NCT00607342
		IGF-1	Oncolar	250
		IGF-1R	Robatumumab	251
		VEGFR2	Imatinib (STI571)	254
		PDGFR α/β + KIT + AXL + EGFR + IGF1R	Dasatinib	256 – 257 – 258 NCT00464620 NCT0088125
		KIT + Epha2 + PDGFR β	Sorafenib	259 – 260 NCT00889057
		VEGFR + PDGFR + RET + C-kit	Regorafenib	261 -262 NCT02048371 NCT02389244
		VEGFR + PDGFR + KIT + FGFR + RET	Cabozantinib	263 NCT02243605
		VEGFR + KIT + RET + AXL + PDGFR	Lenvatinib	264 NCT02432274
		VEGFR + PDGFR + KIT + EGFR + RET	Apatinib	252
		VEGFR + PDGFR	Cediranib	265
		VEGFR + PDGFR + KIT	Pazopanib	266
Ciblage des voies intracellulaires		Kinase src	Saracatinib (AZD0530)	268
		mTOR	ridaforolimus	272 - 273
		mTOR + DNA-PK	CC-115	NCT01353625
Ciblage du remodelage osseux et du cercle vicieux		RANKL	Denosumab	NCT02470091
		Hydroxyapatite + Cellules tumorales	Zolédronate + chimiothérapie	OS2006 – NCT00470223
		Hydroxyapatite + Cellules tumorales + mTOR	Zolédronate + méthotrexate + cyclophosphamide + sirolimus	METZOLIMOS – NCT02517918

3. Les mécanismes de résistance des ostéosarcomes aux thérapies conventionnelles

Certains patients atteints d'ostéosarcome développent des mécanismes de résistance à la chimiothérapie, expliquant dans certains cas les rechutes et la progression tumorale. En effet, environ 25 % des patients classés comme bons répondeurs à la chimiothérapie rechuteront. En outre, les mauvais répondeurs peuvent rapidement développer des métastases entraînant la mort. Ainsi, la résistance à la chimiothérapie est l'un des processus biologiques à l'origine de l'échec thérapeutique. Il est donc indispensable de mieux comprendre et de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à la chimiothérapie conventionnelle afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'adapter les traitements aux patients, améliorant ainsi le taux de survie. Bien que le taux de survie sans rechute se soit considérablement amélioré avec l'avènement de la chimiothérapie, seulement 50 à 60 % des tumeurs sont chimio-sensibles [287].

Durant ma thèse, j'ai effectué des recherches bibliographiques concernant les mécanismes pouvant être à l'origine de la résistance dans l'ostéosarcome. Ces recherches ont mené à la rédaction d'une revue intitulée « Mechanisms of Resistance to Conventional Therapies for Osteosarcoma » et publiée dans le journal « cancers » en 2021. Dans cette revue, les mécanismes responsables de la résistance des ostéosarcomes aux traitements anti-cancéreux tels que la diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues anti-cancéreuses, leur inactivation, l'amélioration de la réparation de l'ADN, la modulation des voies de signalisation, l'implication de l'autophagie, des dérèglements de l'expression des gènes liés au cycle cellulaire ou encore l'implication du micro-environnement tumoral ont été décrits.

Review

Mechanisms of Resistance to Conventional Therapies for Osteosarcoma

Louise Marchandet ¹, Morgane Lallier ¹, Céline Charrier ¹ , Marc Baud'huin ^{1,2}, Benjamin Ory ¹  and François Lamoureux ^{1,*}

¹ UMR1238, Phy-OS, Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés, INSERM, Université de Nantes, 44035 Nantes, France; louise.marchandet@univ-nantes.fr (L.M.); morgane.lallier@univ-nantes.fr (M.L.); celine.charrier@univ-nantes.fr (C.C.); marc.baudhuin@univ-nantes.fr (M.B.); Benjamin.Ory@univ-nantes.fr (B.O.)

² CHU de Nantes, 44035 Nantes, France

* Correspondence: francois.lamoureux@univ-nantes.fr

Simple Summary: Osteosarcoma (OS), the most common primary bone tumor, mainly affects children and adolescents. Unfortunately, in some cases, the absence of response to chemotherapy agents is observed, leading to metastases development and death of the patient. Resistance is one of the biological processes at the origin of therapeutic failure. In order to improve the therapeutic management of patients, it is necessary to identify and better understand the mechanisms underlying resistance. Here, we summarize molecular mechanisms of OS resistance to conventional chemotherapy and list some strategies that overcome resistance.

Abstract: Osteosarcoma (OS) is the most common primary bone tumor, mainly occurring in children and adolescents. Current standard therapy includes tumor resection associated with multidrug chemotherapy. However, patient survival has not evolved for the past decades. Since the 1970s, the 5-year survival rate is around 75% for patients with localized OS but dramatically drops to 20% for bad responders to chemotherapy or patients with metastases. Resistance is one of the biological processes at the origin of therapeutic failure. Therefore, it is necessary to better understand and decipher molecular mechanisms of resistance to conventional chemotherapy in order to develop new strategies and to adapt treatments for patients, thus improving the survival rate. This review will describe most of the molecular mechanisms involved in OS chemoresistance, such as a decrease in intracellular accumulation of drugs, inactivation of drugs, improved DNA repair, modulations of signaling pathways, resistance linked to autophagy, disruption in genes expression linked to the cell cycle, or even implication of the micro-environment. We will also give an overview of potential therapeutic strategies to circumvent resistance development.

Keywords: Osteosarcoma; chemotherapy resistance; chemotherapy circumvent



Citation: Marchandet, L.; Lallier, M.; Charrier, C.; Baud'huin, M.; Ory, B.; Lamoureux, F. Mechanisms of Resistance to Conventional Therapies for Osteosarcoma. *Cancers* **2021**, *13*, 683. <https://doi.org/10.3390/cancers13040683>

Academic Editor: Aykut Uren

Received: 30 December 2020

Accepted: 3 February 2021

Published: 8 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Osteosarcoma (OS) is the most common primary bone tumor representing approximately 30% of bone sarcomas, and mainly affecting children and adolescents with an 18-years incidence peak [1]. The OS worldwide incidence rate is estimated to 4 cases per million per year [2]. Genetic factors may increase the risk of OS. A small percentage of patients with genetic changes or mutations are at higher risk for OS. Rare hereditary conditions due to specific genetic mutations, such as Li-Fraumeni syndrome, can also increase the risk of OS [3,4]. OS is characterized by formation of immature bone or osteoid tissue by tumor cells associated with areas of peri-tumor osteolysis. In 80% of patients, preferred anatomical sites of tumor development are metaphysis of long bones and, mainly, in areas of rapid bone growth. Indeed, 40% of OS are located at the femur, 20% at the tibia, and finally 10% at the humerus [5,6]. This tumor can also occur in the axial skeleton and

soft tissue in 20% of cases. It is well described that OS originates from mesenchymal stem cells (MSCs) or osteoblasts and can be divided into different subtypes that are osteoblastic, chondroblastic, and fibroblastic [7–9]. At the time of diagnosis, there is a 5-year survival rate of around 75% for localized forms of OS (80% of patients). However, for patients with metastases, mainly pulmonary, on diagnosis (20% of patients), the 5-year survival rates dramatically decrease to 20%.

Until the 1970s, the only therapeutic management of OS was surgical and sometimes radiotherapy. It is important to note that OS are quite resistant to radiotherapy [10,11]. Surgery alone, which consisted of amputating or removing the tumor, did not reduce mortality below 80% [12]. Indeed, tumor excision only leads to a survival rate of around 20% at 5 years [13]. Since then, the use of chemotherapy agents has increased the survival rate of patients with OS and reduced amputations, and thus improved limb salvage. Indeed, the long-term survival rate is now 75% for patients with non-metastatic disease compared to 20% before the 1970s [14,15]. However, the long-term survival rate is still low for patients with metastatic or recurrent disease. Furthermore, nearly 85% of patients undergoing resection since the year 2000 have been able to keep their limbs [16]. The first chemotherapy protocols were established by Dr. Rosen and included high-doses of methotrexate, cyclophosphamide, bleomycin, and vincristine preoperatively and post-surgical chemotherapy with doxorubicin [17]. Treatments consisted of neo-adjuvant chemotherapy following by surgical resection and adjuvant chemotherapy. The objectives of neoadjuvant chemotherapy are firstly to damage tumor cells at the primary site in order to reduce tumor size before surgery. It also allows the eradication of micrometastases but also the assessment of the histological response of the tumor to chemotherapy. This response is evaluated according to the necrosis rate present within the tumor, used as a prognostic factor. If the tumor has a necrosis rate greater than or equal to 90%, the patient is a good responder. However, if this rate is less than 90%, the patient is a bad responder [18]. Adjuvant chemotherapy may be adapted according to the observed necrosis rate. Most of the used molecules in chemotherapy protocols are a combination of cisplatin (CDP), doxorubicin (DOX), methotrexate (MTX), and ifosfamide (IFO).

Chemotherapy agents have different mechanisms of action. The combination of their modes of action, therefore, makes it possible to target tumor cells at several levels. MTX inhibits the proliferation of rapidly dividing cells by inhibiting the reduction of folic acid. DOX is a cytotoxic antibiotic, which is able to inhibit topoisomerase II, interpose with DNA and RNA polymerases, induce the formation of free radicals, and to bind to membranes. CDP is a cytostatic antineoplastic capable of binding and inhibiting DNA synthesis, which prevents DNA replication and, therefore, cell division. IFO is metabolized to mafosfamide, binding to DNA to block its replication, thereby preventing cell division [19–21]. However, current treatments have limits including insufficient efficacy for high-risk patients and low survival rates for patients with metastases at diagnosis. Moreover, some patients developed chemotherapy resistance, explaining in some cases relapses and tumor progression. Indeed, around 25% of patients classified as good responders to chemotherapy will still relapse. In addition, poor responders can quickly develop metastases leading to death. Two types of resistance should be distinguished: Intrinsic resistance and acquired resistance [22]. Intrinsic resistance is already pre-existing since resistant cells are already present within the tumor before any treatment [23]. At the time of chemotherapy administration, sensitive cells will be eliminated due to the toxic effects of drugs. However, tumor resistant cells exhibiting pre-existing genetic mutations or activation of different signaling pathways would be able to proliferate despite the presence of chemotherapy agents. Conversely, acquired resistance is induced by drugs and is emerged after therapies. During treatment, there is a gradual reduction of anticancer efficacy of drugs. Indeed, tumor cells will develop mechanisms such as activation of proto-oncogene, mutations, or altered expression levels of transport proteins or drug targets, and changes in the tumor microenvironment (TME) [24]. These adaptations subsequently allow tumor cells to resist chemotherapy. Resistance, therefore, results from genomic instability where

resistant clones will be selected after chemotherapy treatment. Both types of resistance are the result of specific molecules or molecular signaling pathways present in OS cells [25]. Resistance is one of the biological processes at the origin of therapeutic failure. To overcome it, more effective treatments are urgently needed. Therefore, it is necessary to better understand and decipher molecular mechanisms of resistance to conventional chemotherapy in order to elaborate new strategies and to adapt treatments for patients, thus improving the survival rate. Although the disease-free survival rate has dramatically improved with the advent of chemotherapy, only 50% to 60% of tumors are chemosensitive [26].

This review will describe most of the molecular mechanisms involved in OS chemoresistance and will give an overview of potential therapeutic strategies to circumvent resistance development and to sensitize tumor cells to conventional chemotherapies. The phenomenon of chemoresistance can be due to a decrease in intracellular accumulation of drugs, inactivation of drugs, improved DNA repair, modulations of signaling pathways, resistance linked to autophagy, turbulence in gene expression linked to the cell cycle, or even an implication of the micro-environment [2,27].

2. Decrease the Intracellular Accumulation of Drugs

One of the first mechanisms used by tumor cells to deal with cytotoxic effects of chemotherapy agents is to decrease drug accumulation. For that, tumor cells can (1) establish inefficient transport by reducing the number of carriers on their surface [28], (2) initiate drug elimination by increasing drug efflux [29], (3) induce alterations in structure or expression of target enzyme [30] (Figure 1).

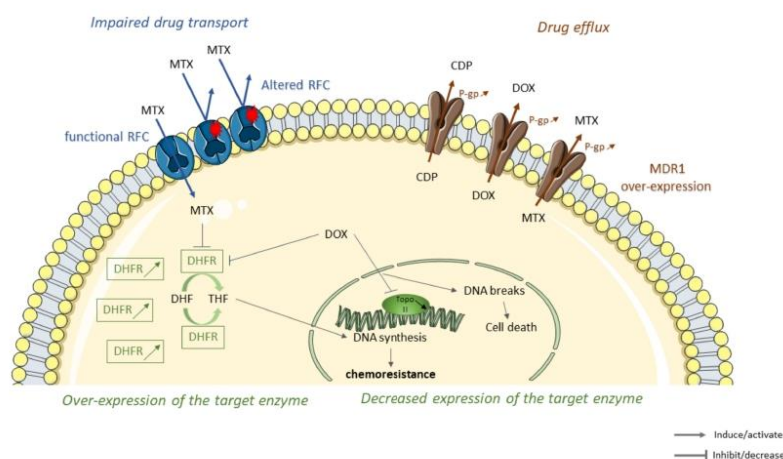


Figure 1. Some molecular mechanisms leading to the decrease of intracellular drug accumulation in osteosarcoma (OS) resistant tumor cells to conventional therapies. Sequence alterations of reduced folate carriers (RFC) lead to an impaired methotrexate (MTX) transport through the membrane cell, thereby reducing the accumulation of MTX inside the cell (in blue). Overexpression of members of ATP-binding cassette (ABC) family such as multidrug resistance protein 1 (MDR1) increases cisplatin (CDP), doxorubicin (DOX), and methotrexate (MTX) efflux and elimination leading to chemoresistance (in brown). Overexpression or decrease expression of MTX/DOX-target enzymes lead to OS resistance. Chemotherapeutic agents, such as MTX or DOX, interact and inhibit target enzymes such as dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR inhibition limits conversion of dihydrofolate (DHF) to tetrahydrofolate (THF), leading to a decrease in DNA synthesis and cell growth. DHFR overexpression in OS-resistant cells decreases MTX and DOX cytotoxicity leading to the emergence of resistance. Topoisomerase II (TopoII), an enzyme responsible for the topological state of DNA and, therefore, cell viability. DOX stabilize topoisomeraseII/DNA complex leading to cell death. Decrease expression of topoisomerase II decreases cytotoxicity of DOX and promotes the emergence of resistance (in green).

2.1. Impaired Drug Transport

One of the described resistance mechanisms to chemotherapy in OS is impaired drug transport, in particular, due to a decrease in transporters present on the surface of tumor cells. MTX is an antifolate drug entering into cells via three different ways: Folate receptors, proton-coupled folate transporter, and reduced folate carrier (RFC). MTX accumulates in cells and is then polyglutamylated. This form is preferably retained in cells. Then, MTX interacts and inhibits the dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme that converts dihydrofolate (DHF) to tetrahydrofolate (THF), which is a one-carbon donor for de novo purine and thymidine biosynthesis [31]. DHFR, therefore, plays a key role in intracellular folate metabolism and is essential for the synthesis of de novo DNA. Thus, the interaction between MTX and DHFR will prevent DNA synthesis and cell growth [32–35].

Some studies described RFC involvement in resistance to chemotherapy agents in OS. MTX intracellular concentration is lower in MTX resistant OS cells than in sensitive cells. Moreover, resistant cells present a lower RFC expression compared to sensitive cells [36]. The decrease in RFC expression in the tumor is associated with resistance to MTX in OS [37]. Samples with poor histological responses to preoperative chemotherapy, including high doses of MTX, show a higher decrease in RFC expression. A study showed a correlation between RFC protein level and histological response to chemotherapy [38]. In fact, tumors with a poor response to MTX have a significantly lower level of RFC expression at the time of diagnosis compared to good responders who have a higher-level expression of this protein. However, the protein level of RFC was significantly higher in recurrent tumor specimens than primary OS biopsy samples at diagnosis. This means that after chemotherapy, tumor progression is associated with higher expression of RFC protein, which should make cells more sensitive to MTX [39]. Some sequence alterations have been shown to change the functionality of RFC protein. As an example, Ser46Asn, Ser4Pro, or Gly259Trp alterations confer a certain resistance to MTX. Indeed, these altered RFC proteins have a reduced MTX transport rate. MTX enters into cells with Ser46Asn, Ser4Pro, or Gly259Trp alterations but in a lower amount than sensitive cells, which results in only partial resistance. Samples presenting genetic alterations are also those which have a higher frequency of poor histological response to chemotherapy meaning that alterations in RFC gene could be a prognostic factor. Alterations in RFC could contribute to the lack of responses to MTX, and to varying degrees depending on alterations [40]. Analysis of RFC gene copy number did not show any difference between parental cell lines and MTX resistant cells, meaning that reduction in expression of the gene encoding RFC is not due to gene deletion [41]. Reduction in RFC expression may also be due to promoter methylation and polymorphism in 3'UTR of RFC. Indeed, RFC expression is weaker in samples with more than 10% of methylation. In addition, samples with heterozygous polymorphism of 2582 T/G or 2617 C/T in the 3'UTR show a decrease in RFC expression [42].

In order to overcome resistance, an MTX-like drug, which does not require RFC for transport, has been developed. Trimetrexate was tested in a phase II clinical study including patients with relapsed or refractory OS. Five out of 38 patients (13%) treated with trimetrexate had a good response [43]. A combination of trimetrexate with high dose MTX is being tested in a phase I clinical study including patients with recurrent OS [44]. Other drugs with a higher affinity for RFC, such as antifolate pralatrexate, have been developed to compensate low expression of these carriers [45]. Pralatrexate has been evaluated in clinical trials and has been approved for the treatment of patients with refractory or recurrent peripheral T cell lymphoma [46]. Studies in patients with the bone disease may, therefore, be of interest.

Drug formulation techniques improve drug delivery efficacy. Liposomal encapsulation of DOX has been shown to be an effective mode of delivery. Its activity in relapsed sarcomas suggests that this technique may be able to overcome resistance [47]. An aerosolized formulation of CDP is investigated in a phase Ib/IIa clinical study, including OS patients with relapses limited to the lungs (sustain release lipid inhalation targeting [SLITTM] Cisplatin; Transave, Inc., Monmouth Junction, NJ, USA) [48].

A decrease in RFC expression reduces MTX transport within cells [36]. However, these changes ultimately confer a fairly low level of MTX resistance and cannot be responsible for the full observed resistance *in vivo*. In other words, *in vivo* intrinsic resistance is a combination of different molecular mechanisms among which this inefficient transport could be one of the contributing factors.

2.2. Drug Elimination

Increased drug efflux has been reported as partly responsible for OS resistance [49]. This phenomenon has been described for CDP, MTX, and DOX. Cancer cells exposed to one chemotherapy agent can develop resistance to many other anticancer drugs, called multidrug resistance (MDR) [50]. This acquired resistance is mainly due to overexpression of members ATP-binding cassette (ABC) family of efflux transporters [51]. There are efflux pumps such as multidrug resistance-associated proteins (MRP), noted ABCC1 and breast cancer resistance proteins, renamed ABCG2 and mitoxantrone resistance proteins (BCRP, MXR) [52]. The most typical transporter is the multidrug resistance protein 1 (MDR1), also named Glycoprotein (G-gp) [53,54]. These proteins are encoded by ABC subfamily B member 1 (ABCB1) [55]. Under physiological conditions, ABC transporters regulate cellular levels of hormones, lipids, ions, xenobiotics, and other molecules but also play a role in intracellular regulation of organelles such as mitochondrion, lysosome, endoplasmic reticulum, or Golgi apparatus [55]. The presence of these transporters on cancer cells membrane allows efflux of anticancer drugs outside of cells and thus leads to resistance [56].

OS cell lines exhibit a high level of expression of ABC transporters such as MDR1 [39]. Expression of 170 kDa plasma membrane glycoprotein of hamster, mouse, and human is increased in tumor cell lines. This protein has the same molecular size and some immunogenic homology as MDR1 and also confers MDR [57]. In human OS cells resistant to DOX, the association between MDR1 overexpression and reduced DOX accumulation within cells has been described [58]. MDR1 expression level is correlated with kinetic parameters of radiotracers mimicking DOX, meaning that the DOX chemosensitivity of OS cells depends on MDR1 expression [59]. Furthermore, MDR1 mRNA expression level increases gradually according to DOX concentration [60].

Indeed, some studies have found a correlation between high expression of ABC transporters and poor response to chemotherapy, poor outcome, and poor survival rate of patients [61]. Tumor expressing P-gp seems to be associated with an increase of metastases development and death risk [62]. Conversely, patients with better relapse-free, improved survival rate, and better long term outcomes do not overexpress P-gp [63,64]. In patients treated only with DOX and surgery, ABC transporters expression in tumor cells is significantly associated with a higher incidence of relapse and a worse outcome [65]. Serra et al. have shown that an increase of P-gp expression consorted with a tumor volume greater than 150 mL and a patient aged over 12 years at the time of diagnosis is associated with a high risk of recurrence [66]. It has also been found that polymorphisms in ABC members correlate with response to chemotherapy. OS treatment efficacy can be affected by certain polymorphism of ABC transporter genes, such as RS4148416 for ABCC3 and RS4148737, RS1128503, and RS10276036 for ABCB1. Clinical outcomes in the treatment of OS could be predicted by these different genetic polymorphisms [67].

Moreover, the implication of p53 in the correlation between ABC expression and poor outcomes have been shown. A study realized on 52 tumor specimens has shown that co-expression of P53 and P-gp may be an indicator of a short survival [68]. Conversely, a non-association between P-gp expression, p53 status, and the clinical outcome has been shown, but only an increase of P-gp in the tumor is significantly associated with a poor outcome [69]. However, Sorensen et al. showed that survival or treatment response cannot be predicted by P-gp expression and p53 status [70]. Furthermore, some studies have failed to couple P-gp expression with histological response, survival outcome, or event-free survival [71–75].

P-gp has been shown to be associated with a cytoskeleton linker named ezrin. This complex is located in plasma membrane lipid rafts. MDR observed in OS cell lines could also be due to this cytoskeleton linker. Indeed, ezrin inhibition increases drug sensitivity of tumor cells [76], and ezrin expression is associated with poor outcomes in OS patients [77].

ABC transporters can be targeted in order to overcome resistance. OS cell lines resistant to paclitaxel have a higher P-gp level and have also shown cross-resistance to other P-gp substrates such as DOX, docetaxel, and vincristine. However, in the presence of an inhibitor of P-gp, NSC23925, cells become sensitive to paclitaxel [78]. Tetrandrine (CBT-1), an alkaloid anti-inflammatory compound, prevents paclitaxel-induced MDR in OS cells [79]. P-gp may be upregulated by the growth factor pleiotrophin promoting DOX resistance. Chemosensitivity in OS cell lines was enhanced by pleiotrophin knockdown [80]. In two MDR OS cell lines (KHOSR2 and U-2OSR2), ABCB1 knock-out restored sensitivity to DOX but not to CDP [81]. Targeting ABCB1/ABCC1 by tetrandrine also restored DOX sensitivity in resistant OS cell lines, which could be an interesting alternative in treating refractory or recurrent OS [82]. In addition, MDR1 transcriptional activation may be inhibited by trabectedin, an alkaloid antineoplastic agent [83], which could be of interest in the treatment of resistant OS. Thus, targeting and altering transporters expression in combination with conventional treatments may be a potential therapeutic option to treat resistant OS.

2.3. Alterations in the Structure or Expression of the Target Enzyme

The resistance of some chemotherapeutic agents can also be explained by an increased level of target enzymes or a decrease of drug affinity due to mutations in these enzymes [25]. These variations have been observed in resistance to MTX and DOX. MTX resistant OS cell lines exhibit high expression of DHFR. Indeed, a relationship between high expression of DHFR in xenografts and emergence of resistance has been shown [84,85]. High expression of DHFR is rare in initial biopsy samples (10% of samples) but is very frequently observed in metastases (62% of samples), suggesting that this resistance mechanism appears during treatment. A correlation between retinoblastoma protein (pRb), playing a key role in the cell cycle, and the expression level but also enzymatic activity of DHFR has been shown. Indeed, cells with defective pRb have a higher DHFR mRNA level as well as a higher enzymatic activity than those with a functional protein. Cells with absent or abnormal pRb, therefore, tend to be resistant to MTX [86]. E2F transcription factors are reported to control Rb gene expression. In OS patients samples, a relationship has been shown between E2F transcription factors mRNA expression and DHFR mRNA expression [87]. In OS, gene duplication is not responsible for overexpression of the DHFR enzyme. In contrast, dysfunctional DHFR may be due to retinoblastoma (Rb) signaling aberrations. However, Serra and colleagues showed that the MTX-resistant OS cell line (U2-OS) overexpresses the DHFR gene due to an amplification of it [37,88]. Additionally, this increased level of DHFR expression may be linked to cells presenting an intact Rb gene pathway. Indeed, DHFR expression is negatively regulated by the Rb gene via E2F. Therefore, Rb can influence cell sensitivity to MTX targeting DHFR [41]. MiR-215 reduces DHFR expression but does not reduce resistance to MTX but conversely increases it. This can be explained because miR-215 overexpression led to a p53-dependent growth inhibition, and low-proliferating tumors are more resistant to MTX, an S-phase specific cytotoxic drug [89]. Thus, DHFR alterations would be associated with p53 status in OS and targeting DHFR may be a way to overcome the chemoresistance of OS.

DNA topoisomerases are nuclear enzymes, which regulate DNA topology. Topoisomerase II, the primary target of effective antitumor drugs such as DOX, alters the topological state of DNA. This mechanism is essential for cell replication and viability. A covalent complex between topoisomerase II and DNA is a necessary intermediate in DNA topoisomerization catalysis. Stabilization of this complex by DOX interferes with vital functions, such as DNA replication leading to cell death. There are two isoforms of topoisomerase II: Topoisomerase II α and topoisomerase II β [90,91]. OS cell lines (143B,

MG63, and HOS) showed a reduction of topoisomerase II expression in DOX-resistant cells compared to sensitive cells [85,92,93], suggesting that a decrease of DOX target is one of the mechanisms of drug resistance.

3. Drug Detoxification/Inactivation

Certain drugs, such as DOX or CDP, induce the formation and accumulation of reactive oxygen species (ROS) [94]. ROS can also be produced by normal cellular metabolism, generating energy in the biological system. Low levels of ROS are relatively well tolerated by cells, while a high concentration of ROS induces oxidative stress leading to cellular damage [95]. To limit this, cells have protective and detoxification mechanisms, including antioxidants such as glutathione (GSH) and glutathione-S-transferase (GST). Once DOX or CDP enters cells, they are activated through a series of spontaneous aquation reactions. Activated CDP and DOX are able to interact with DNA and produce DNA damage [96,97]. Drugs can then be inactivated by detoxification enzymes: GSH and GSTs. The main member of the GST family is GSTP1-1 enzyme [98,99].

High levels of GSTs are shown in a large number of cancers such as ovarian, colon, breast cancers [100]. Moreover, the role of GSTP1 in resistance to chemotherapy agents, in particular, CDP and DOX, has been shown in many studies [101] in various cancers such as ovarian cancer [102], colon cancer [103], breast cancer [104], lung cancer [105], and in OS [106,107]. OS cells treated with DOX or CDP exhibit an up-regulation of GSTP1 expression [106,107]. Moreover, GSTP1 expression is inducible by chemotherapeutic agents leading to resistance of tumor cells to chemotherapeutic agents. Conversely, more apoptosis and DNA damage were observed by suppressing GSTP1 expression [108]. Indeed, cell sensitivity to CDP increased following depletion of GSTP1 activity and, the degree of resistance seems to be proportional to the level of intrinsic glutathione content [109]. Patients with high levels of GSTP1 expression present a high relapse rate, suggesting that overexpression of this enzyme could be linked to a poor prognosis [107].

Studies carried out on samples from dogs suffering from spontaneous OS have also highlighted a correlation between the increase in GST activity in resistant cells and shorter median-remission and survival times [110], as well as a relationship between high levels of GSTP1 expression and remission or survival rate [111]. In human OS xenografts, higher levels of GST transcripts are correlated with cell resistance to chemotherapy [112]. At the time of the biopsy, before preoperative chemotherapy, 60 samples of human OS did not overexpress GST. However, at the time of surgery, GST was overexpressed, suggesting that overexpression of GST was associated with failure of preoperative chemotherapy [113].

Some genetic polymorphisms may have a role in response to chemotherapy and in prognosis in OS patients. The relationship between genetic polymorphisms of patients who received conventional chemotherapy treatment and histological response as well as the survival rate was described. Indeed, a poor histological response was increased in patients with GSTP1 c.313A > G p.I105V variants [114]. Patients with the GSTP1 Val/Val genotype would seem to have a lower survival rate compared with patients exhibiting the Ile/Ile genotype [115]. However, Yang et al. found that individuals with GSTP1 Val/Val genotype have a significantly higher rate of response to chemotherapy than those with the Ile/Ile or Ile/Val genotype [116]. A meta-analysis did not show any evidence of association of GSTP1 (Ile/Ile versus Val/Val) polymorphisms with prognosis in patients with OS [117]. OS Patients with poor response to chemotherapy, poor event-free survival, and poor overall survival have more GSTP1 rs1695 GG genotype and G allele [118]. Polymorphisms of other members of the GST family, such as GSTM1, GSTT1, GSTM3, were also described to play a role in treatment response and OS progression. GSTM1 with a null genotype have a poor clinical outcome compared with the GSTM1 genotype having at least one allele, which is associated with a good response to treatment and, therefore, a better survival rate. A better survival rate is observed when the patient has GSTT1 null genotype. Finally, the presence of metastases at diagnosis can be associated with the GSTM3*B allele [117,119]. Furthermore, GSTP1 may protect against cytotoxic effects of chemotherapy agents on OS cells. This can

be mediated by GSTP1 overexpression (described above) but also by regulation of signaling pathways such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) or c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways. GSTP1 protects OS cells from CDP- or DOX-induced oxidative stress and, therefore, cell death by inhibiting JNK phosphorylation or by activating phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 MAPK [120–122]. Indeed, GSTP1 inhibition in OS cells reduced activation of ERK 1/2, leading to apoptosis and DNA damage [108]. Without oxidative stress conditions, JNK is sequestered in a protein–protein complex with the enzyme GST and, JNK cannot be phosphorylated, therefore, inhibiting apoptosis. In the case of oxidative stress following chemotherapy treatment, the JNK/GST complex is dissociated, inducing JNK phosphorylation and, therefore, apoptosis activation. In resistant cells, GST is overexpressed thus, JNK/GST complexes will be plentiful.

To overcome resistance due to GSTP1, 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol (NBDHEX), a GSTP1 inhibitor was tested in vitro in OS cell lines that were resistant to CDP, DOX, and MTX. NBDHEX is effective in cells with higher GSTP1 levels and enzymatic activity [106]. However, NBDHEX is associated with cytostatic effects, but a positive effect on metastases development was observed [123]. A proteomic investigation showed that NBDHEX dissociated the GSTP1-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 complex, thus activating JNK and p38 and leading to DNA damage and apoptosis [124].

4. DNA Repair Improvement

Under physiological conditions, DNA can be damaged by endogenous or exogenous agents or by DNA polymerase, which can introduce errors during replication. Nevertheless, cells have mechanisms that allow them to reduce the deleterious effects of this damage. Damage tolerance, cell cycle checkpoints, DNA repair, and cell death are some of these mechanisms. Despite the presence of all these mechanisms, DNA damage may persist, leading to genomic instability of cells, which will then be eliminated via programmed cell death. After DNA damage, the cell makes cell cycle arrest in order to recruit proteins involved in the main DNA repair mechanisms such as direct reversal repair, base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), mismatch repair (MMR), homologous recombination (HR), and non-homologous end-joining (NHEJ) [125].

Chemotherapeutic agents are known to cause DNA damage, leading to cell death. However, tumor cells can sometimes resist treatment by improving the DNA repair pathway. Resistance to CDP frequently leads to cross-resistance to other DNA damaging agents used in OS protocols, such as CDP, DOX, or IFO. That is why the most studied drug in the case of resistance due to increased DNA repair is CDP [96,126].

The resistance of OS to some chemotherapy agents may be due to an improvement in the BER mechanism, and in particular, by the over-regulation of one of the key enzymes, the apurinic endonuclease APE-1 [27]. Indeed, APE-1 has been associated with MDR and prognosis in many cancers [127]. It has been shown that over 70% of samples of OS patients have a high expression of APE-1. A correlation between the high expression of APE-1 and the decrease in survival rate has been shown [128]. A more recent study also showed overexpression of APE-1 in 65% of samples from OS patients, as well as an amplification of the APE1 gene. In addition, overexpression of APE1 has been linked to local OS recurrence and/or metastasis [129].

The efficacy of inhibitors of APE1, such as lucanthone, 7-nitroindole-2-carboxylic acid, resveratrol, and arylstibonic acids, has been evaluated in vitro and to sensitize cells to treatment [130–133]. However, the efficacy of these inhibitors is quite low or nonspecific [127]. In OS cells, miR-513a-5p suppresses APE1 expression, making tumor cells radiosensitive [134]. MiR-765 downregulates APE1 and sensitizes OS cells and tumor xenografts to CDP [135]. The use of small interfering RNA (siRNA) targeting Ape1, pSilenceApe1, sensitizes OS cells and tumor xenografts to the antiangiogenic andostatin [136]. Thus, targeting APE1 with miRNA or siRNAs can be a treatment option for resistant OS.

Another important protein of the BER pathway, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), may be involved in OS chemotherapy resistance. In fact, high expression of

PARP1 in OS is correlated with shorter survival [137]. The use of olaparib, a PARP1 inhibitor, or siRNA targeting PARP1 sensitizes OS cell lines to DOX. In addition, inhibition of proliferation and induction of apoptosis are more significant with co-treatment of olaparib and DOX [137]. A phase II clinical trial is in progress in order to evaluate the effect of olaparib alone in the treatment of refractory disease [138]. The effect of a combination of olaparib with ceralasertib, the ataxia telangiectasia, and rad3 related (ATR) kinase inhibitor is currently being studied in another phase II clinical trial including patients with unresponsive or recurrent OS [139].

The DNA repair pathway most often implicated in chemoresistance is NER [140]. Some members of the NER pathway have been studied, including DNA excision repair proteins, excision repair cross-complementing protein (ERCC). High levels of ERCC proteins are related to cisplatin resistance. Hattinguer et al. showed ERCC 1 positivity in 26% of OS patients, which was significantly associated with worse event-free survival and overall survival [141]. Low expression of ERCC4 was correlated with a poor histological response to chemotherapy [142]. Li et al. showed that the expression of ERCC4 and ERCC2 in OS cells was greater in patients with high tumor necrosis compared to patients with low tumor necrosis [143]. The study of polymorphisms of NER genes has shown the existence of a significant positive association between polymorphism ERCC2 gene, Lys751Gln but also ERCC1, Asn118Asn with the improved CDP response. In addition, these gene polymorphisms are associated with an increase in event-free survival rate [144,145]. ERCC1 rs11615CC alleles were linked with a better clinical outcome [146]. ERCC1 C8092A genotypes and event-free survival are positively correlated. Indeed, patients with the C allele (CC and CA) have significantly longer event-free survival rates than those carrying the AA genotype [147].

ERCCs can be targeted in order to increase the sensitivity of OS cells to chemotherapy agents. Sensitivity to CPD increases in the resistant U2-OS/CDDP300 and U2-OS/CDDP1 cells by silencing ERCC1, ERCC2, ERCC3, and ERCC4 genes [126]. NER gene inhibitors may also increase CDP sensitization *in vivo*. Indeed, NSC130813 and triptolide have improved the efficacy of CDP in resistant and sensitive cell lines [126] and deserve a clinical evaluation.

5. Cell Cycle and Apoptosis Disruptions

Chemotherapy causes DNA damage leading to cell death through apoptosis. Cell cycle stops allow cells to repair DNA damage. Cells, therefore, escape apoptosis and continue their cell cycle. Alterations of cell cycle signaling or apoptosis are partly responsible for chemotherapy resistance in tumor cells. In fact, modulation of chemotherapeutic cytotoxicity is due to cell cycle and apoptosis-related gene expression dysregulation. In resistant OS cells, apoptosis pathways are disturbed [148].

TP53 gene has an important role in cell cycle arrest as well as in apoptosis in case of DNA damage. This gene has been demonstrated to be involved in the modulation of anticancer drug cytotoxicity [149]. Deletions or mutations of TP53 promote the malignant characteristics of many cancers [150]. OS has a high level of P53 mutations [151]. However, the role of P53 in resistance to therapies in OS is controversial. Wild-type or mutant p53 genes were associated with the chemoresistance in OS cells [150]. P53-null Saos-2 cells were rendered resistant to DOX and MTX following transfection of a p53 mutant (TP53-R273H). In addition, these cells exhibited downregulation of apoptotic enzymes, such as pro-caspase 3, suggesting that resistance to P53-dependent apoptosis is the cause of loss of chemosensitivity [152]. When Murine Double Minute 2 (Mdm2) expression, a downstream mediator of p53, is enhanced, the p53-mediated apoptosis is inhibited, endowing cells with resistance to DNA-damaging agents [153]. Asada and his colleagues showed that a CDP-resistant OS cell line had a low level of P53 WT protein compared to the parental cell line [154]. Transfection of P53 WT into OS cells not expressing p53 increased their sensitivity to CDP [155].

The role of P53 in resistance to chemotherapy may vary depending on the extracellular conditions and soluble factors present. Under normal Fetal Bovine Serum (FBS) conditions (10%), P53 induction in Saos-2 cells resulted in a decrease in CDP sensitivity, while P53 induction under low FBS conditions (1%) resulted in an increase in CDP sensitivity [156]. In addition, over-expression of miR-140 is associated with chemosensitivity in OS xenografts, induced expression of P53, as well as cell cycle arrest in G1/G2 in OS cell lines with p53 WT. This observation is lower in cell lines with P53 mutated [157]. Contradictions are also present in clinical studies: One study, performed on 24 patient samples, showed loss of heterozygosity at the P53 locus in 54% of cases. In addition, in this group, only 15% of patients were sensitive to neoadjuvant chemotherapy compared to 64% of patients in the other group (where 46% do not present any changes at the P53 locus), suggesting that TP53 deletion was associated with decreased sensitivity and drug resistance [158]. Conversely, positive P53 expression was correlated with resistance or survival of OS patients. In fact, patients with low post-recurrence survival were those with P53 positive expression in lung metastasis samples [159,160]. A meta-analysis done on 499 patients showed that P53-positive patients tended to have poor 2-year survival rates. However, these results were not significant. P53 alteration was associated with a decreased survival, but P53 status was not correlated with the response to chemotherapy. Nevertheless, chemotherapy response was independent of the status of P53 [161]. No evidence that mutated p53 can predict the development of metastases, chemotherapy response, and clinical outcome in patients with high-grade OS was shown [162]. The p53-reactivating small-molecule RITA is able to sensitize certain tumor cells to chemotherapy, with a positive effect observed in patients with p53 mutations, while patients with a p53 deletion do not respond to this treatment [43]. The efficacy of RITA is currently being evaluated in OS as monotherapy or in combination with other therapy [43].

Cell death signaling is regulated by proteins belonging to the Bcl-2 family. This family of proteins contains anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-XL, and pro-apoptotic proteins, including Bax [163,164]. Bcl-2 and Bax affect drug-induced apoptosis and regulate chemotherapy resistance in various cancers. Chemosensitivity of OS cells to DOX and CDP could significantly be enhanced by inhibiting Bcl-2/Bcl-XL [165]. Conversely, pro-apoptotic protein's up-regulation can thwart chemoresistance. Indeed, Bax up-regulation increases apoptosis and drug sensitivity of OS cells after etoposide treatment, while its downregulation reduces the chemosensitivity [166–168]. OS patients with high expression of Bcl-2 have a lower long-term survival rate compared to patients with low expression [169]. Patients presenting lung metastases had a higher frequency of Bcl-2 staining in primary tumor samples compared to patients without metastases. However, Bcl-2 high expression did not correlate with chemosensitivity or survival rate in OS patients [159,170,171]. Similarly, Bax expression does not predict overall or disease-free survival rate. However, patients with a high Bax/Bcl-2 ratio showed a decrease in 4-year disease-free and overall survival [171]. Targeting Bcl-2 family members sensitizes OS cells to chemotherapy agents. Indeed, a Bcl-xL inhibitor, navitoclax, inhibits proliferation in two canine OS cell lines [172] and deserves to be evaluated in human OS.

6. Involvement of Signaling and Signal Transduction Pathways

Cell-surface receptors, like receptor tyrosine or serine/threonine kinase (RTK) have an important role in key biological processes such as differentiation, proliferation, and cell cycle control in normal and cancer cells [173]. These receptors are often disturbed and have a potential role in the emergence of chemotherapy resistance in OS. Indeed, it has been shown that resistant OS cells exhibit higher expression of several kinases compared with parental cell lines [126]. Over-expression of cell-surface receptors increases activation of signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK), which is highly activated in OS cell lines [174] (Figure 2).

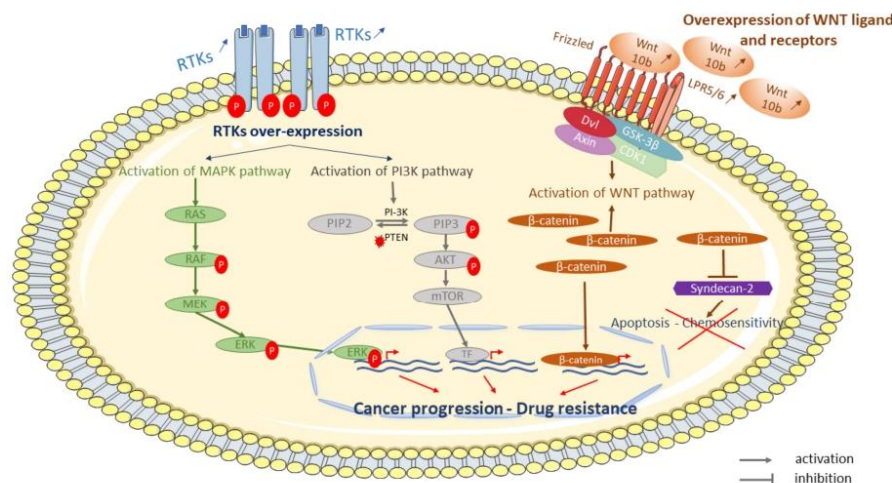


Figure 2. Some examples of signaling pathways involved in OS resistant tumor cells to conventional treatment. Cell surface-receptors, such as tyrosine kinase receptors (RTKs), are disturbed in resistant cells to chemotherapy. Over-expression and phosphorylation of RTKs activate signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) or phosphoinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase signaling pathway. Activation of MAPK and/or PI3K leads to proliferation and survival, respectively. Several WNT ligands (WNT 10b) and receptors (lipoprotein receptor-related protein 5—LRP5) and β -catenin are over-expressed and activate the WNT/ β -catenin pathway leading to β -catenin overexpression. β -catenin is able to repress syndecan-2 leading to inhibition of apoptosis and chemosensitivity.

6.1. Cell-Surface Receptors: Her2, VEGF and IGF-1R

The ErbB/HER family is one of the protein tyrosine kinases involved in chemotherapy resistance in OS. Indeed, immunohistochemistry and quantitative PCR analyzes showed overexpression of human epithelial growth factor receptor 2 (HER2) gene and Her2 protein in OS tumors [71,175], which is correlated with poor histological response and a poor survival [71]. High expression of VEGFR is also associated with worse disease-free and overall survival in OS [176,177]. A phase II clinical trial investigated the effect of trastuzumab, a HER2-targeted agent, in combination with cytotoxic chemotherapy in metastatic patients but did not show a difference between patients with HER2 overexpression and those without HER2 overexpression [178]. AZD2171, a VEGFR inhibitor, showed antitumor activity in OS xenografts and could, therefore, be in combination with conventional chemotherapeutic agents, a way of counteracting chemoresistance [179]. Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) has been linked to OS pathogenesis and enhanced tumorigenesis in human and canine OS cell lines [180]. IGF-1R overexpression has been described in OS [181] and has been correlated with metastatic disease and poor overall survival [182], indicating that IGF-1R is a therapeutic target of interest in OS. Various studies have shown that IGF-1R inhibition using Tyrphostin (AG1024) combined with DOX or by targeting IGF-1R using shRNA enhances the effect of chemotherapy in OS cell lines [183,184]. A phase II clinical trial investigated the effect of a human neutralizing anti-IGF-1R antibody, Robatumumab, in patients with relapsed OS. None of the patients with unresectable metastases showed a response, and 3 of 31 patients with resectable metastases had a complete or partial response [185]. It would be interesting to know if the combination of this antibody with chemotherapy could be more effective.

6.2. PI3K and MAPK Pathways

Phosphoinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B signaling pathway, which leads to cell survival and Ras, Raf, and ERK/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which leads proliferation and tumor growth are activated by cell-surface receptors phosphorylation, such as IGF-1R [186]. These two pathways have also been demonstrated to be activated in OS cell lines [187]. Genome, exome, and RNA sequencing of 59 tumors showed mutations within the genes belonging to the PI3K/Akt/mTOR pathway, such as PTEN, TSC2, PI3KCA, PDK1, AKT1, and EIF4B [188]. PI3K and MAPK pathways could be targeted in order to counteract the resistance of OS to chemotherapy agents. Akt inhibition with the allosteric Akt inhibitor MK-2206 was able to abrogate proliferation in U-2 OS and HOS cell lines [189]. The mTOR pathway presents molecular alterations in various cancers [190]. mTOR, a serine/threonine protein kinase, and its downstream target have been shown to be active in OS cell lines from dogs [191]. In human OS cell lines, rapamycin downregulated activity of mTOR and inhibited cell growth [192]. mTOR inhibition not only decreases survival but also plays a role in metastases development. Indeed, inhibition of the mTOR pathway using rapamycin or cell cycle inhibitor-779, a rapamycin analog, in the OS model significantly inhibits lung metastases development [193]. However, only dual inhibition of PI3K and mTOR induces apoptosis compared to the targeting of either PI3K or mTOR alone in OS cells [188]. A phase I clinical trial analyzing rapamycin effect on pediatric tumor panels, including OS, showed an anti-tumor activity [194], suggesting that the mTOR pathway can be targeted and could be combined with conventional chemotherapy to reduce or prevent the emergence of resistance. Targeting the MAPK pathway inhibits proliferation, invasion, metastasis development, and drug resistance in bone sarcomas [195]. PD-98059, an inhibitor of ERK1/2 phosphorylation, increases expression of proapoptotic proteins such as Bax and induces cell death in OS cell lines. ERK1/2 inhibition increases DOX sensitivity in OS cells, delays tumor growth, and prolongs survival by inducing proapoptotic proteins. The combination of DOX and PD-98059 prolongs the survival of mice with OS [195]. A clinical trial showed clinical benefits following MAPK/ERK inhibition combined with chemotherapy in patients with unresectable or metastatic OS [195].

6.3. WNT Pathway

The Wnt/ β -catenin pathway plays a major role in many cellular processes such as proliferation, migration, polarization, and differentiation. The Wnt signaling pathway deregulation or mutations are involved in tumor development, resistance, and relapse. An increase in signaling activity Wnt/ β -catenin pathway was observed in OS [196,197]. Wnt aberrant activation is implicated in the development and metastatic progression of OS [198–200] and is also involved in resistance development to therapies in OS [201]. Overexpression of several Wnt ligands, such as Wnt10b, and receptors, such as lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) in OS tissues and cell lines, leads to increased pathway activation [188]. Furthermore, β -catenin, an intracellular wnt component, is highly expressing in OS tissues compared to healthy tissues. High expression of β -catenin is associated with poor prognosis and lung metastases formation [202]. DOX treatment of OS cells leads to syndecan-2, a proteoglycan capable of influencing apoptosis and chemosensitivity, overexpression. Syndecan-2 upregulation can be repressed by β -catenin activation reducing sensitivity to DOX in OS cells [203]. Aberrant signaling of the Wnt pathway could be due to a possible interaction between TRIM37 and β -catenin [204]. Samples of OS tumors showed over-expression of TRIM37 at mRNA and protein levels. TRIM37 overexpression in OS cells following treatment with CDP, DOX, MTX, or IFO induced drug resistance, while TRIM37 knockdown restored chemosensitivity. However, TRIM37-induced chemoresistance has been partially dependent on the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [205]. Wnt/ β -catenin pathway activation is also associated with the presence of cancer stem cells (CSCs) population, leading to recurrence of OS tumors, but also with cell transition to a cancer stem-like phenotype in OS cells following treatment with chemotherapy.

The wnt/ β -catenin pathway could be used as a potential therapeutic target to increase drug sensitivity in OS. Small molecule inhibitor of Wnt/ β -catenin, such as PRI-724, which suppresses Wnt/ β -catenin-mediated transcription, was able to inhibit OS cell proliferation. Decreasing protein levels of the target Wnt, Cyclin D1, suppresses Wnt signaling [206]. Moreover, several Wnt-signaling drugs are being investigated in phase I clinical trials and showed promising outcomes [207,208].

7. Autophagy Involvement

Autophagy is a process of protecting and recycling cellular materials where cellular organelles and damaged proteins are degraded by autophagosomes. Autophagy thus makes it possible to maintain cellular biosynthesis. Autophagy allows cells to survive under cellular stress by removing organelles and proteins in order to provide energy [209]. Tumor cells often exploit the autophagy pathway in order to promote chemotherapy resistance and survival [210].

Indeed inhibition of autophagy using 3-methyladenine (3-MA) increased cell death induced by paclitaxel in OS cells [211], suggesting that a therapeutic combination of autophagy inhibitors with chemotherapy could be therapeutic alternatives in OS treatment. Zhang et al. have shown that downregulation of autophagy via 3-MA in MG-63 cells increased chemotherapeutic sensitivity of tumor cells treated with CDP [212]. Another study also showed that autophagy protects OS cells against cell death induced by therapies such as photodynamic therapy [213], meaning that autophagy can have a protective role in OS cells. High Mobility Group Box1 (HMGB1), a chromatin-binding nuclear protein, could facilitate autophagy after administration of cytotoxic agents in order to promote tumor cell survival [214]. HMGB1 mRNA overexpression has been detected in OS cells treated with DOX, CDP, and MTX. Furthermore, HMGB1 overexpression increases autophagy and chemoresistance in vitro [215]. Indeed, HMGB1 knock-down restores sensitivity to chemotherapy of OS cells and increases apoptosis. HMGB1 is also overexpressed in tumor xenografts allowing tumor cells to resist apoptosis in the presence of chemotherapies [216]. Moreover, HMGB5 overexpression leads to over-regulation of autophagy and to chemotherapy resistance, while HMGB5 knock-down downregulates autophagy and sensitizes cells to chemotherapy agents [217]. HSP90AA1 expression was also found to increase drug resistance in OS by inducing autophagy and inhibiting apoptosis. Expression of HSP90AA1 is up-regulated after treatment with chemotherapy agents, such as CPD, DOX, and MTX. Indeed, suppression of HSP90AA1 restored sensitivity to chemotherapy both in vivo and in vitro [218]. Autophagy is a resistance mechanism that can be targeted in order to develop new therapies. Chloroquine could be a new therapeutic strategy in OS treatment by increasing apoptosis and promoting tumor cell death in various cancer, such as lymphoma or colon cancer, through autophagy inhibition [219,220]. Chloroquine blocks the autophagic process in cisplatin-resistant OS cells [221]. Rapamycin combined with chloroquine increase the antitumor efficacy in OS cells [222].

8. Cancer Stem Cells and Microenvironment

The efficacy of anticancer therapy, such as chemotherapy, can be influenced by the tumor microenvironment [223]. Indeed, the presence of CSCs but also an acidic tumor microenvironment can cause MDR in the tumor.

CSCs or tumor-initiating cells are a small population of tumor cells, which could drive cancer initiation, propagation, metastasis, and relapse of cancers. These cells share common properties with normal stem cells (SCs). CSCs can self-renew while producing differentiated daughter cells, and their quiescent nature has been shown to be involved in mechanisms of MDR [224]. CSCs are found in a specific microenvironment comparable to a niche of traditional stem cells. This niche may affect the ability of CSCs to grow, renew themselves, invade, metastasize, and hypoxic stability, providing additional protection against anticancer therapy for CSCs [225]. Different hypotheses have been expressed regarding the role of CSCs in the therapeutic resistance of OS. Indeed, populations of stem-like cells are

present in OS cell lines and in OS biopsies. In addition, these cells expressed mesenchymal stem cell markers such as CD133, CD117, CD105, and CD44 [226–228]. These subpopulations are resistant to chemotherapy agents. A study showed that CSCs cell line, 3AB-OS, selected from human OS MG-63 cells by long-term treatment with 3-aminobenzamide (3AB), were positive for a pluripotent stem cell marker, CD133 and exhibited higher expression of the ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) transporter gene involved in drug efflux, as well as higher expression of anti-apoptotic genes, including Bcl-2, leading to resistance [229]. An increased expression of drug efflux transporters P-gp and BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)/ABCG2 in a population of OS CSCs derived from the HOS-MNNG cell line has been shown, suggesting that stem cells play a role in chemotherapy resistance of tumors [230]. Some OS cell lines, such as MG-63, are capable of forming spheroids. These spheroids resemble CSCs due to their ability to self-renew and expression of stem cell-related genes and DNA repair enzymes [231]. CSCs and spheroids showed a strong chemoresistance to DOX and CDP due to increased expression of DNA repair enzyme genes. Resistance could be overcome by administering a DNA repair enzyme inhibitor, caffeine [231]. MG-63 spheroids also exhibited increased mRNA levels of ALDH1, a protein involved in enhancing drug detoxification, which is correlated to drug-resistant [232]. Inhibition of some resistance mechanisms described in this review, such as inhibition of drug efflux systems, alteration of enhanced DNA repair pathways, inhibition of detoxification, promoting factors pro-apoptotic, and the inhibition of anti-apoptotic factors, could be considered to target OS CSCs.

OS cells overexpress S-Phase kinase-associated protein2 (skp2), known to positively regulate CSC populations and self-renewal ability [233]. In MTX-resistant OS cells, overexpression of skp2 was found to promote epithelial–mesenchymal transition (EMT) and enhance invasive, migratory, and attachment abilities. Skp2 inhibition using shRNA increased the sensitivity of tumor cells to MTX [234]. Compound 25, an inhibitor of Skp2, has antitumor activities and cooperates with conventional chemotherapy to suppress cancer cell survival [233]. Nitidine chloride represses the expression of EMT markers and, therefore, inhibits proliferative, migratory, and invasive abilities of OS cell lines (U2-OS) [235]. These two compounds may have a potential interest in the treatment of OS.

The acidity of the OS microenvironment could be partly responsible for drug resistance. Sensitivity to DOX can be reduced by lowering extracellular pH in p-gp negative OS. Indeed, DOX combined with a proton pump inhibitor, omeprazole, reduces tumor volume in the OS xenograft model. Reversing the pH gradient contributes to the sensitization of cells to DOX but also to CDP and MTX [235]. This means that the reduction in acidity in the tumor microenvironment could, in part, overcome resistance in OS.

Different drugs have been tested as monotherapy to treat OS. Trabectedin, a chemotherapeutic agent that binds to DNA and causes damage and apoptosis, showed no effect when used as monotherapy, while the use of Trabectedin combined with conventional chemotherapy agents could be beneficial and suppress resistance-associated genes [236]. Indeed, Trabectedin reduces tumor growth and metastases development in the OS model [237]. In addition, Trabectedin promotes binding of Runx-2 transcription factor leading to osteogenic differentiation. The mOS69 mouse model (the most aggressive model) does not normally exhibit extensive T cell infiltration. However, Trabectedin allows the recruitment of CD8+ and CD4+ T cells and, combined with anti-PD-1 antibody, significantly inhibits tumor growth in the mOS69 model [237]. This finding could be adapted and evaluated as new treatment options in patients with refractory or recurrent OS.

9. Conclusions

A better knowledge of resistance mechanisms responsible for treatment failure in some patients allows identifying new strategies or therapeutic targets in order to adapt therapies to patients. Personalized medicine, including targeted therapies as well as immunotherapy, offers new possibilities to counteract resistance to conventional treatments for patients with cancer. In addition, an innovative approach, the Antibody-Drug Conjugate (ADC)

strategy, is also under investigation. This technology consists of grafting a cytotoxic agent onto a monoclonal antibody, which is able to bind an antigen on the surface of cancer cells. After internalization of ADC, the cytotoxic drug damages the cancer cell. These ADCs have the advantage of targeting and killing tumor cells while sparing healthy cells, thus limiting side effects and improving patients' quality of life. ABBV-085, an antibody-drug conjugate targeting LRRRC15, has shown promising results in sarcomas. Glematimumab vedotin (also known as CDX-011) targeting GPNMB (GlycoProtein Non-metastatic Melanoma protein B) was also evaluated in a pivotal phase II clinical trial (NCT02487979) in OS and was shown to have an effective antitumor activity. New personalized therapeutic approaches are now being studied and deserve to be evaluated to limit or avoid the emergence of resistance and improve the therapeutic management of patients with OS.

Author Contributions: L.M. was responsible for the literature review, the draft of the manuscript, and reviewed edits. M.L., C.C., B.O., M.B. reviewed edits and F.L. provided mentorship for the manuscript project and reviewed the final edits. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The study did not report any data.

Acknowledgments: The authors thank the guest editors (Frédéric Lézot, Bénédicte Brounais-Le Royer, and Dominique Heymann) for their invitation in the special issue "Research Advances and Therapeutic Strategies of Human Osteosarcoma".

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

References

1. Lamoureux, F.; Trichet, V.; Chipoy, C.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Redini, F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2007**, *7*, 169–181. [\[CrossRef\]](#)
2. He, J.-P.; Hao, Y.; Wang, X.-L.; Yang, X.-J.; Shao, J.-F.; Guo, F.-J.; Feng, J.-X. Review of the Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 5967–5976. [\[CrossRef\]](#)
3. Marina, N.; Gebhardt, M.; Teot, L.; Gorlick, R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *Oncologist* **2004**, *9*, 422–441. [\[CrossRef\]](#)
4. Sandberg, A.; Bridge, J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2003**, *145*, 1–30. [\[CrossRef\]](#)
5. Klein, M.J.; Siegal, G.P. Osteosarcoma: Anatomic and histologic variants. *Am. J. Clin. Pathol.* **2006**, *125*, 555–581. [\[CrossRef\]](#)
6. Isakoff, M.S.; Bielack, S.S.; Meltzer, P.S.; Gorlick, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3029–3035. [\[CrossRef\]](#)
7. Rejniak, K.A.; Lloyd, M.C.; Reed, D.; Bui, M.M. Diagnostic assessment of osteosarcoma chemoresistance based on Virtual Clinical Trials. *Med. Hypotheses* **2015**, *85*, 348–354. [\[CrossRef\]](#)
8. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2014**, *25* (Suppl. 3), iii113–iii123. [\[CrossRef\]](#)
9. Chen, Y.; Cao, J.; Zhang, N.; Yang, B.; He, Q.; Ying, M.; Ying, M. Advances in differentiation therapy for osteosarcoma. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 497–504. [\[CrossRef\]](#)
10. Anderson, P.M. Effectiveness of Radiotherapy for Osteosarcoma that Responds to Chemotherapy. *Mayo Clin. Proc.* **2003**, *78*, 145–146. [\[CrossRef\]](#)
11. Schwarz, R.; Bruland Øyvind, S.; Cassoni, A.; Schomberg, P.; Bielack, S. The Role of Radiotherapy in Osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **2009**, *152*, 147–164. [\[CrossRef\]](#)
12. Majó, J.; Cubedo, R.; Pardo, N. Treatment of Osteosarcoma. A Review. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* **2010**, *54*, 329–336.
13. Saraf, A.J.; Fenger, J.M.; Roberts, R.D. Osteosarcoma: Accelerating Progress Makes for a Hopeful Future. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 4. [\[CrossRef\]](#)
14. Ferrari, S.; Palmerini, E. Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, *19*, 341–346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Mialou, V.; Philip, T.; Kalifa, C.; Perol, D.; Gentet, J.-C.; Marec-Berard, P.; Pacquement, H.; Chastagner, P.; Defaschelles, A.; Hartmann, O. Metastatic osteosarcoma at diagnosis: Prognostic factors and long-term outcome—The French pediatric experience. *Cancer* **2005**, *104*, 1100–1109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Ottaviani, G.; Robert, R.S.; Huh, W.W.; Jaffe, N.; Ottaviani, G. Functional, Psychosocial and Professional Outcomes in Long-Term Survivors of Lower-Extremity Osteosarcomas: Amputation Versus Limb Salvage. *Cancer Treat. Res.* **2009**, *152*, 421–436. [\[CrossRef\]](#)

17. Rosen, G.; Tan, C.; Sanmaneechai, A.; Beattie, E.J.; Marcove, R.; Murphy, M.L. The rationale for multiple drug chemotherapy in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* **1975**, *35*, 936–945. [\[CrossRef\]](#)
18. Goorin, A.M.; Schwartzentruber, D.J.; Devidas, M.; Gebhardt, M.C.; Ayala, A.G.; Harris, M.B.; Helman, L.J.; Grier, H.E.; Link, M.P. Presurgical Chemotherapy Compared with Immediate Surgery and Adjuvant Chemotherapy for Nonmetastatic Osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1574–1580. [\[CrossRef\]](#)
19. Wittig, J.C.; Bickels, J.; Priebe, D.; Jelinek, J.; Kellar-Graney, K.; Shmookler, B.; Malawer, M.M. Osteosarcoma: A multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **2002**, *65*, 1123–1132.
20. Ando, K.; Heymann, M.-F.; Stresing, V.; Mori, K.; Redini, F.; Heymann, D. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers* **2013**, *5*, 591–616. [\[CrossRef\]](#)
21. Bielack, S.S.; Carrle, R.; Hards, J.; Schuck, A.; Paulussen, M. Bone Tumors in Adolescents and Young Adults. *Curr. Treat. Opt. Oncol.* **2008**, *9*, 67–80. [\[CrossRef\]](#)
22. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lippert, T.H.; Ruoff, H.-J.; Volm, M. Intrinsic and Acquired Drug Resistance in Malignant Tumors. The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung* **2008**, *58*, 261–264. [\[CrossRef\]](#)
24. Wang, X. Drug Resistance and Combating Drug Resistance in Cancer. Available online: <https://cdrijournal.com/article/view/3039> (accessed on 7 May 2020).
25. Chou, A.J.; Gorlick, R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: Current challenges and future directions. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1075–1085. [\[CrossRef\]](#)
26. Lewis, I.J.; Nooij, M.A.; Whelan, J.; Sydes, M.R.; Grimer, R.; Hogendoorn, P.C.W.; Memon, M.A.; Weeden, S.; Uscinska, B.M.; Van Glabbeke, M.; et al. Improvement in Histologic Response But Not Survival in Osteosarcoma Patients Treated With Intensified Chemotherapy: A Randomized Phase III Trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 112–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Postuma de Boer, J.; Royen, B.J.; Helder, M. Mechanisms of therapy resistance in osteosarcoma: A review. *Oncol. Discov.* **2013**, *1*, 8. [\[CrossRef\]](#)
28. Fotoohi, A.K.; Albertioni, F. Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **2008**, *49*, 410–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. He, H.; Ni, J.; Huang, J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1352–1362. [\[CrossRef\]](#)
30. Takemura, Y.; Kobayashi, H.; Miyachi, H. Cellular and molecular mechanisms of resistance to antifolate drugs: New analogues and approaches to overcome the resistance. *Int. J. Hematol.* **1997**, *66*, 459–477. [\[CrossRef\]](#)
31. Jensen, D.E.; Black, A.R.; Swick, A.G.; Azizkhan, J.C. Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. *J. Cell. Biochem.* **1997**, *67*, 24–31. [\[CrossRef\]](#)
32. Goldman, I.; Matherly, L.H. The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther.* **1985**, *28*, 77–102. [\[CrossRef\]](#)
33. Bertino, J.R.; Göker, E.; Gorlick, R.; Li, W.W.; Banerjee, D. Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1996**, *1*, 223–226. [\[CrossRef\]](#)
34. Moscow, J.A. Methotrexate transport and resistance. *Leuk. Lymphoma* **1998**, *30*, 215–224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Bertino, J.R. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 5–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wang, J.; Li, G. Relationship between RFC gene expression and intracellular drug concentration in methotrexate-resistant osteosarcoma cells. *Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 5313–5321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Hattinger, C.M.; Reverter-Branchat, G.; Remondini, D.; Castellani, G.C.; Benini, S.; Pasello, M.; Manara, M.C.; Scotlandi, K.; Picci, P.; Serra, M. Genomic imbalances associated with methotrexate resistance in human osteosarcoma cell lines detected by comparative genomic hybridization-based techniques. *Eur. J. Cell Biol.* **2003**, *82*, 483–493. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Flintoff, W.F.; Sadlish, H.; Gorlick, R.; Yang, R.; Williams, F.M. Functional analysis of altered reduced folate carrier sequence changes identified in osteosarcomas. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2004**, *1690*, 110–117. [\[CrossRef\]](#)
39. Ifergan, I.; Meller, I.; Issakov, J.; Assaraf, Y.G. Reduced folate carrier protein expression in osteosarcoma. *Cancer* **2003**, *98*, 1958–1966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Yang, R.; Sowers, R.; Mazza, B.; Healey, J.H.; Huvos, A.; Grier, H.; Bernstein, M.; Beardsley, G.P.; Krailo, M.; Devidas, M.; et al. Sequence alterations in the reduced folate carrier are observed in osteosarcoma tumor samples. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 837–844. [\[PubMed\]](#)
41. Serra, M.; Reverter-Branchat, G.; Maurici, D.; Benini, S.; Shen, J.-N.; Chano, T.; Hattinger, C.-M.; Manara, M.-C.; Pasello, M.; Scotlandi, K.; et al. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 151–160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Yang, R.; Qin, J.; Hoang, B.H.; Healey, J.H.; Gorlick, R. Polymorphisms and Methylation of the Reduced Folate Carrier in Osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2046–2051. [\[CrossRef\]](#)
43. Lilienthal, I.; Herold, N. Targeting Molecular Mechanisms Underlying Treatment Efficacy and Resistance in Osteosarcoma: A Review of Current and Future Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6885. [\[CrossRef\]](#)

44. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Phase I Study of High Dose Methotrexate with Simultaneous Trimetrexate and Leucovorin in Patients with Recurrent Osteosarcoma. Report No.: NCT00119301. 2013. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00119301> (accessed on 15 December 2020).
45. Sirotinak, F.M.; DeGraw, J.I.; Moccio, D.M.; Samuels, L.L.; Goutas, L.J. New folate analogs of the 10-deaza-aminopterin series Basis for structural design and biochemical and pharmacologic properties. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1984**, *12*, 18–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. O'Connor, O.A.; Pro, B.; Pinter-Brown, L.; Bartlett, N.; Popplewell, L.; Coiffier, B.; Lechowicz, M.J.; Savage, K.J.; Shustov, A.R.; Gisselbrecht, C.; et al. Pralatrexate in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma: Results From the Pivotal PROPEL Study. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1182–1189. [\[CrossRef\]](#)
47. Alberts, D.S.; Muggia, F.; Carmichael, J.; Winer, E.P.; Jahanzeb, M.; Venook, A.P.; Skubitz, K.M.; Rivera, E.; Sparano, J.A.; DiBella, N.J.; et al. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in Phase I/II clinical trials. *Semin. Oncol.* **2004**, *31*, 53–90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. O'Day, K.; Gorlick, R. Novel therapeutic agents for osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2009**, *9*, 511–523. [\[CrossRef\]](#)
49. Krishna, R.; Mayer, L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265–283. [\[CrossRef\]](#)
50. Choi, C.-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* **2005**, *5*, 30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Chen, Z.; Shi, T.; Zhang, L.; Zhu, P.; Deng, M.; Huang, C.; Hu, T.; Jiang, L.; Li, J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 153–164. [\[CrossRef\]](#)
52. Amawi, H.; Sim, H.-M.; Tiwari, A.K.; Ambudkar, S.V.; Shukla, S. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1141*, 549–580. [\[CrossRef\]](#)
53. Riordan, J.R.; Ling, V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12701–12705. [\[CrossRef\]](#)
54. Li, S.; Sun, W.; Wang, H.; Liao, Y.; Hua, Y.; Cai, Z. Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 1329–1338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 452–464. [\[CrossRef\]](#)
56. Schinkel, A.H.; Jonker, J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 3–29. [\[CrossRef\]](#)
57. Kartner, N.; Riordan, J.R.; Ling, V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* **1983**, *221*, 1285–1288. [\[CrossRef\]](#)
58. Scotlandi, K.; Serra, M.; Manara, M.C.; Lollini, P.-L.; Maurici, D.; Del Bufalo, D.; Baldini, N. Pre-Treatment of human osteosarcoma cells with N-methylformamide enhances P-glycoprotein expression and resistance to doxorubicin. *Int. J. Cancer* **1994**, *58*, 95–101. [\[CrossRef\]](#)
59. Gomes, C.; Van Paassen, H.; Romeo, S.; Welling, M.M.; Feitsma, R.; Abrunhosa, A.; Botelho, M.F.; Hogendoorn, P.C.; Pauwels, E.; Cleton-Jansen, A.M. Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33*, 831–840. [\[CrossRef\]](#)
60. Oda, Y.; Matsumoto, Y.; Harimaya, K.; Iwamoto, Y.; Tsuneyoshi, M. Establishment of new multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Oncol. Rep.* **2000**, *7*, 859–925. [\[CrossRef\]](#)
61. Serra, M.; Pasello, M.; Manara, M.C.; Scotlandi, K.; Ferrari, S.; Bertoni, F.; Mercuri, M.; Alvegard, T.A.; Picci, P.; Bacci, G.; et al. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int. J. Oncol.* **2006**, *29*, 1459–1468. [\[CrossRef\]](#)
62. Hornicek, F.J.; Gebhardt, M.C.; Wolfe, M.W.; Kharrazi, F.D.; Takeshita, H.; Parekh, S.G.; Zurakowski, D.; Mankin, H.J. P-Glycoprotein Levels Predict Poor Outcome in Patients With Osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2000**, *373*, 11–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Chan, H.S.L.; Haddad, G.; DeBoer, G.; Ling, V.; Grogan, T.M. P-glycoprotein Expression: Critical Determinant in the Response to Osteosarcoma Chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1706–1715. [\[CrossRef\]](#)
64. Baldini, N.; Scotlandi, K.; Barbanti-Bròdano, G.; Manara, M.C.; Maurici, D.; Bacci, G.; Bertoni, F.; Picci, P.; Sottili, S.; Campanacci, M.; et al. Expression of P-Glycoprotein in High-Grade Osteosarcomas in Relation to Clinical Outcome. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1380–1385. [\[CrossRef\]](#)
65. Baldini, N.; Scotlandi, K.; Serra, M.; Picci, P.; Bacci, G.; Sottili, S.; Campanacci, M. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: A basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J. Orthop. Res.* **1999**, *17*, 629–632. [\[CrossRef\]](#)
66. Serra, M.; Scotlandi, K.; Reverter-Branchat, G.; Ferrari, S.; Manara, M.C.; Benini, S.; Incaprerà, M.; Bertoni, F.; Mercuri, M.; Briccoli, A.; et al. Value of P-Glycoprotein and Clinicopathologic Factors as the Basis for New Treatment Strategies in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 536–542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Caronia, D.; Patiño-García, A.; Pérez-Martínez, A.; Pita, G.; Moreno, L.T.; Zalacain-Díez, M.; Molina, B.; Colmenero, I.; Sierrasesumaga, L.; Benítez, J.F.; et al. Effect of ABCB1 and ABCC3 Polymorphisms on Osteosarcoma Survival after Chemotherapy: A Pharmacogenetic Study. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26091. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

68. Park, Y.; Kim, H.; Oh, J.; Lee, S. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *Int. Orthop.* **2001**, *24*, 307–310. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Serra, M.; Maurici, D.; Scotlandi, K.; Barbanti-Brodano, G.; Manara, M.C.; Benini, S.; Picci, P.; Bertoni, F.; Bacci, G.; Sottili, S.; et al. Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high-grade osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 301–307. [\[CrossRef\]](#)
70. Sørensen, F.B.; Jensen, K.; Vaeth, M.; Hager, H.; Funder, A.M.D.; Safwat, A.; Keller, J.; Christensen, M. Immunohistochemical Estimates of Angiogenesis, Proliferative Activity, p53 Expression, and Multiple Drug Resistance Have No Prognostic Impact in Osteosarcoma: A Comparative Clinicopathological Investigation. *Sarcoma* **2008**, *2008*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
71. Gorlick, R.; Huvos, A.G.; Heller, G.; Aledo, A.; Beardsley, G.P.; Healey, J.H.; Meyers, P.A. Expression of HER2/erbB-2 Correlates With Survival in Osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2781. [\[CrossRef\]](#)
72. Kumta, S.M.; Zhu, Q.S.; Lee, K.M.; Griffith, J.; Chow, L.T.; Leung, P.C. Clinical significance of P-glycoprotein immunohistochemistry and doxorubicin binding assay in patients with osteosarcoma. *Int. Orthop.* **2001**, *25*, 279–282. [\[CrossRef\]](#)
73. Pakos, E.E.; Ioannidis, J.P.A. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer* **2003**, *98*, 581–589. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Zhao, G.-Z. Association between P-Glycoprotein expression and response to chemotherapy in patients with osteosarcoma: A systematic and meta-analysis. *J. Cancer Res. Ther.* **2014**, *10*, 206–209.
75. Schwartz, C.L.; Gorlick, R.; Teot, L.; Krailo, M.; Chen, Z.; Goorin, A.; Grier, H.E.; Bernstein, M.L.; Meyers, P. Multiple Drug Resistance in Osteogenic Sarcoma: INT0133 from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2057–2062. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Brambilla, D.; Zamboni, S.; Federici, C.; Lugini, L.; Lozupone, F.; De Milito, A.; Cecchetti, S.; Cianfriglia, M.; Fais, S. P-glycoprotein binds to ezrin at amino acid residues 149–242 in the FERM domain and plays a key role in the multidrug resistance of human osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2011**, *130*, 2824–2834. [\[CrossRef\]](#)
77. Khanna, C.; Wan, X.; Bose, S.M.; Cassaday, R.D.; Olomu, O.; Mendoza, A.; Yeung, C.; Gorlick, R.; Hewitt, S.M.; Helman, L.J. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 182–186. [\[CrossRef\]](#)
78. Yang, X.; Yang, P.; Shen, J.; Osaka, E.; Choy, E.; Cote, G.; Harmon, D.; Zhang, Z.; Mankin, H.; Hornicek, F.J.; et al. Prevention of multidrug resistance (MDR) in osteosarcoma by NSC23925. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 2896–2904. [\[CrossRef\]](#)
79. Lu, Y.; Li, F.; Xu, T.; Sun, J. Tetrandrine prevents multidrug resistance in the osteosarcoma cell line, U-2OS, by preventing Pgp overexpression through the inhibition of NF- κ B signaling. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 993–1000. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Wu, D.; Liu, L.; Chunyan, W.; Wang, C.; Wang, Y.; Han, K.; Lin, S.; Gan, Z.; Min, D. Pleiotrophin promotes chemoresistance to doxorubicin in osteosarcoma by upregulating P-glycoprotein. *Oncotarget* **2017**, *8*, 63857–63870. [\[CrossRef\]](#)
81. Liu, T.; Li, Z.; Zhang, Q.; Bernstein, K.D.A.; Lozano-Calderon, S.; Choy, E.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* **2016**, *7*, 83502–83513. [\[CrossRef\]](#)
82. Fanelli, M.; Hattinger, C.M.; Vella, S.; Tavanti, E.; Michelacci, F.; Gudeman, B.; Barnett, D.; Picci, P.; Serra, M. Targeting ABCB1 and ABCC1 with their Specific Inhibitor CBT-1[®] can Overcome Drug Resistance in Osteosarcoma. *Curr. Cancer Drug Targets* **2016**, *16*, 261–274. [\[CrossRef\]](#)
83. Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K.W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6775–6779. [\[CrossRef\]](#)
84. Lee, Y.-H.; Yang, H.-W.; Yang, L.-C.; Lu, M.-Y.; Tsai, L.-L.; Yang, S.-F.; Huang, Y.-F.; Chou, M.-Y.; Yu, C.-C.; Hu, F.-W. DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 171–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Marques da Costa, M.E.; Marchais, A.; Gomez-Brouchet, A.; Job, B.; Assoun, N.; Daudigeos-Dubus, E.; Fromig  , O.; Santos, C.; Georger, B.; Gaspar, N. In-Vitro and In-Vivo Establishment and Characterization of Bioluminescent Orthotopic Chemotherapy-Resistant Human Osteosarcoma Models in NSG Mice. *Cancers* **2019**, *11*, 997. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Li, W.; Fan, J.; Hochhauser, D.; Banerjee, D.; Zieliński, Z.; Almasan, A.; Yin, Y.; Kelly, R.; Wahl, G.M.; Bertino, J.R. Lack of functional retinoblastoma protein mediates increased resistance to antimetabolites in human sarcoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10436–10440. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Sowers, R.; Toguchida, J.; Qin, J.; Meyers, P.A.; Healey, J.H.; Huvos, A.; Banerjee, D.; Bertino, J.R.; Gorlick, R. mRNA expression levels of E2F transcription factors correlate with dihydrofolate reductase, reduced folate carrier, and thymidylate synthase mRNA expression in osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 535–541.
88. Hattinger, C.M.; Stoico, G.; Michelacci, F.; Pasello, M.; Scionti, I.; Remondini, D.; Castellani, G.C.; Fanelli, M.; Scotlandi, K.; Picci, P.; et al. Mechanisms of gene amplification and evidence of coamplification in drug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Genes Chromosom. Cancer* **2008**, *48*, 289–309. [\[CrossRef\]](#)
89. Song, B.; Wang, Y.A.; Titmus, M.; Botchkina, G.; Formentini, A.; Kormann, M.; Ju, J. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 96. [\[CrossRef\]](#)
90. Bodley, A.; Liu, L.F.; Israel, M.; Seshadri, R.; Koseki, Y.; Giuliani, F.C.; Kirschenbaum, S.; Silber, R.; Potmesil, M. DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5969–5978. [\[PubMed\]](#)

91. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185–229. [\[CrossRef\]](#)
92. Rajkumar, T.; Yamuna, M. Multiple pathways are involved in drug resistance to doxorubicin in an osteosarcoma cell line. *Anti Cancer Drugs* **2008**, *19*, 257–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Yang, J.-Z.; Ma, S.-R.; Rong, X.-L.; Zhu, M.-J.; Ji, Q.-Y.; Meng, L.-J.; Gao, Y.-Y.; Yang, Y.-D.; Wang, Y. Characterization of multidrug-resistant osteosarcoma sublines and the molecular mechanisms of resistance. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 3269–3276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Conklin, K.A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 294–300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Townsend, D.M.; Tew, K.D.; Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 145–155. [\[CrossRef\]](#)
96. Siddik, Z.H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279. [\[CrossRef\]](#)
97. Kelland, L.R. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* **2000**, *59* (Suppl. 4), 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Goto, Y.; Yue, L.; Yokoi, A.; Nishimura, R.; Uehara, T.; Koizumi, S.; Saikawa, Y. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1952–1956.
99. Tew, K.D.; Monks, A.; Barone, L.; Rosser, D.; Akerman, G.; Montali, J.A.; Wheatley, J.B.; Schmidt, D.E. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 149–159. [\[PubMed\]](#)
100. Tew, K.D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4313–4320. [\[CrossRef\]](#)
101. Townsend, D.M.; Tew, K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7369–7375. [\[CrossRef\]](#)
102. Masanek, U.; Stammler, G.; Volm, M. Messenger RNA expression of resistance proteins and related factors in human ovarian carcinoma cell lines resistant to doxorubicin, taxol and cisplatin. *Anti Cancer Drugs* **1997**, *8*, 189–198. [\[CrossRef\]](#)
103. Ban, N.; Takahashi, Y.; Takayama, T.; Kura, T.; Katahira, T.; Sakamaki, S.; Niitsu, Y. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3577–3582.
104. Batist, G.; Tulpule, A.; Sinha, B.K.; Katki, A.G.; Myers, C.; Cowan, K.H. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15544–15549. [\[CrossRef\]](#)
105. Bai, F.; Nakanishi, Y.; Kawasaki, M.; Takayama, K.; Yatsunami, J.; Pei, X.H.; Tsuruta, N.; Wakamatsu, K.; Hara, N. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **1996**, *78*, 416–421. [\[CrossRef\]](#)
106. Pasello, M.; Michelacci, F.; Scionti, I.; Hattinger, C.M.; Zuntini, M.; Caccuri, A.M.; Scotlandi, K.; Picci, P.; Serra, M. Overcoming Glutathione S-Transferase P1-Related Cisplatin Resistance in Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6661–6668. [\[CrossRef\]](#)
107. Wei, L.; Song, X.; Wang, X.-W.; Li, M.; Uo, W.-S.Z. Expression of MDR1 and GST-pi in osteosarcoma and soft tissue sarcoma and their correlation with chemotherapy resistance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi Chin. J. Oncol.* **2006**, *28*, 445–448.
108. Huang, G.; Mills, L.; Worth, L.L. Expression of human glutathione S-transferase P1 mediates the chemosensitivity of osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1610–1619. [\[CrossRef\]](#)
109. Komiya, S.; Gobhardt, M.C.; Mangham, D.C.; Inoue, A. Role of glutathione in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines. *J. Orthop. Res.* **1998**, *16*, 15–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Shoieb, A.M.; Hahn, K.A.; Van Laack, R.L.; Barnhill, M.A. In vitro reversal of glutathione-S-transferase-mediated resistance in canine osteosarcoma (COS31) cells. *In Vivo* **1998**, *12*, 455–462. [\[PubMed\]](#)
111. Shoieb, A.; Hahn, K. Detection and significance of glutathione-S-transferase pi in osteogenic tumors of dogs. *Int. J. Oncol.* **1997**, *10*, 635–639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Bruheim, S.; Bruland, O.S.; Breistol, K.; Maelandsmo, G.M.; Øystein, F. Human osteosarcoma xenografts and their sensitivity to chemotherapy. *Pathol. Oncol. Res.* **2004**, *10*, 133–141. [\[CrossRef\]](#)
113. Uozaki, H.; Horiuchi, H.; Ishida, T.; Iijima, T.; Imamura, T.; Machinami, R. Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis. *Cancer* **1997**, *79*, 2336–2344. [\[CrossRef\]](#)
114. Windsor, R.E.; Strauss, S.J.; Kallis, C.; Wood, N.E.; Whelan, J.S. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma. *Cancer* **2011**, *118*, 1856–1867. [\[CrossRef\]](#)
115. Zhang, S.-L.; Mao, N.-F.; Sun, J.-Y.; Shi, Z.-C.; Wang, B.; Sun, Y.-J. Predictive Potential of Glutathione S-Transferase Polymorphisms for Prognosis of Osteosarcoma Patients on Chemotherapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 2705–2709. [\[CrossRef\]](#)
116. Yang, L.-M.; Li, X.-H.; Bao, C.-F. Glutathione S-transferase P1 and DNA polymorphisms influence response to chemotherapy and prognosis of bone tumors. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 5883–5886. [\[CrossRef\]](#)
117. Wang, Z.; Xu, H.; He, M.; Wu, H.; Zhu, Y.; Su, Z. The association of glutathione S-transferase polymorphisms in patients with osteosarcoma: Evidence from a meta-analysis. *Eur. J. Cancer Care* **2014**, *24*, 417–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Liu, S.; Yi, Z.; Ling, M.; Shi, J.; Qiu, Y.; Yang, S. Predictive potential of ABCB1, ABCC3, and GSTP1 gene polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 9897–9904. [\[CrossRef\]](#)

119. Salinas-Souza, C.; Petrilli, A.S.; De Toledo, S.R. Glutathione S-transferase polymorphisms in osteosarcoma patients. *Pharmacogenet. Genom.* **2010**, *20*, 507–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Yin, Z.; Ivanov, V.N.; Habelhah, H.; Tew, K.; Ronai, Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4053–4057. [\[PubMed\]](#)
121. Adler, V.; Yin, Z.; Fuchs, S.Y.; Benezra, M.; Rosario, L.; Tew, K.D.; Pincus, M.R.; Sardana, M.; Henderson, C.J.; Wolf, C.; et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1321–1334. [\[CrossRef\]](#)
122. Lu, M.; Xia, L.; Luo, D.; Waxman, S.; Jing, Y. Dual effects of glutathione-S-transferase pi on As2O₃ action in prostate cancer cells: Enhancement of growth inhibition and inhibition of apoptosis. *Oncogene* **2004**, *23*, 3945–3952. [\[CrossRef\]](#)
123. Pasello, M.; Manara, M.C.; Michelacci, F.; Fanelli, M.; Hattinger, C.M.; Nicoletti, G.; Landuzzi, L.; Lollini, P.L.; Caccuri, A.; Picci, P.; et al. Targeting glutathione-S transferase enzymes in musculoskeletal sarcomas: A promising therapeutic strategy. *Anal. Cell. Pathol.* **2011**, *34*, 131–145. [\[CrossRef\]](#)
124. Sau, A.; Filomeni, G.; Pezzola, S.; D'Aguanno, S.; Tregno, F.P.; Urbani, A.; Pasello, M.; Serra, M.; Picci, P.; Federici, G.; et al. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 994–1006. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Chatterjee, N.; Walker, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235–263. [\[CrossRef\]](#)
126. Fanelli, M.; Tavanti, E.; Patrizio, M.P.; Vella, S.; Fernandez-Ramos, A.; Magagnoli, F.; Luppi, S.; Hattinger, C.M.; Serra, M. Cisplatin Resistance in Osteosarcoma: In vitro Validation of Candidate DNA Repair-Related Therapeutic Targets and Drugs for Tailored Treatments. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 331. [\[CrossRef\]](#)
127. Fishel, M.L.; Kelley, M.R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol. Asp. Med.* **2007**, *28*, 375–395. [\[CrossRef\]](#)
128. Wang, N.; Luo, M.; Kelley, M.R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: Enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 679–686. [\[PubMed\]](#)
129. Yang, J.; Yang, D.; Cogdell, D.; Du, X.; Li, H.; Pang, Y.; Sun, Y.; Hu, L.; Sun, B.; Trent, J.; et al. APEX1 Gene Amplification and Its Protein Overexpression in Osteosarcoma: Correlation with Recurrence, Metastasis, and Survival. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2010**, *9*, 161–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
130. Yang, S.; Irani, K.; Heffron, S.E.; Jumak, F.; Meyskens, F.L. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1923–1935. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
131. Luo, M.; Kelley, M.R. Inhibition of the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2127–2134. [\[PubMed\]](#)
132. Madhusudan, S.; Smart, F.; Shrimpton, P.; Parsons, J.L.; Gardiner, L.; Houlbrook, S.; Talbot, D.C.; Hammonds, T.; Freemont, P.A.; Sternberg, M.J.E.; et al. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4711–4724. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Seiple, L.A.; Cardellina, J.H.; Akee, R.; Stivers, J.T. Potent Inhibition of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 by Aryltibonic Acids. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *73*, 669–677. [\[CrossRef\]](#)
134. Dai, N.; Qing, Y.; Cun, Y.; Zhong, Z.; Li, C.; Zhang, S.; Shan, J.; Yang, X.; Dai, X.; Cheng, Y.; et al. miR-513a-5p regulates radiosensitivity of osteosarcoma by targeting human apurinic/aprimidinic endonuclease. *Oncotarget* **2016**, *9*, 25414–25426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. Liang, W.; Li, C.; Li, M.; Wang, D.; Zhong, Z. MicroRNA-765 sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via downregulating APE1 expression. *OncoTargets Ther.* **2019**, *12*, 7203–7214. [\[CrossRef\]](#)
136. Wang, D.; Zhong, Z.-Y.; Li, M.-X.; Xiang, D.-B.; Li, Z.-P. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin in vivo. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 1993–2001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Park, H.J.; Bae, J.S.; Kim, K.M.; Moon, Y.J.; Park, S.-H.; Ha, S.H.; Hussein, U.K.; Zhang, Z.; Park, H.S.; Park, B.-H.; et al. The PARP inhibitor olaparib potentiates the effect of the DNA damaging agent doxorubicin in osteosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 107. [\[CrossRef\]](#)
138. National Cancer Institute (NCI). NCI-COG Pediatric MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice)-Phase 2 Subprotocol of Olaparib in Patients With Tumors Harboring Defects in DNA Damage Repair Genes. Report No.: NCT03233204. 2020. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03233204> (accessed on 20 December 2020).
139. Janeway, K. Phase II Trial of Olaparib in Combination with Ceralasertib in Patients with Recurrent Osteosarcoma. Report No.: NCT04417062. 2020. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04417062> (accessed on 20 December 2020).
140. Schärer, O.D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012609. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
141. Hattinger, C.M.; Michelacci, F.; Sella, F.; Magagnoli, G.; Benini, S.; Gambarotti, M.; Palmerini, E.; Picci, P.; Serra, M.; Ferrari, S. Excision repair cross-complementation group 1 protein expression predicts survival in patients with high-grade, non-metastatic osteosarcoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Histopathology* **2015**, *67*, 338–347. [\[CrossRef\]](#)
142. Nathrath, M.; Kremer, M.; Letzel, H.; Remberger, K.; Höfler, H.; Ullé, T. Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy in osteosarcoma patients. *Klin. Padiatr.* **2002**, *214*, 230–235. [\[CrossRef\]](#)

143. Li, X.; Guo, W.; Shen, D.-H.; Yang, R.-L.; Liu, J.; Zhao, H. Expressions of ERCC2 and ERCC4 genes in osteosarcoma and peripheral blood lymphocytes and their clinical significance. *Beijing Da Xue Xue Bao* **2007**, *39*, 467–471.
144. Caronia, D.; Patinogarcia, A.; Milne, R.L.; Zalacaindiez, M.; Pita, G.; Alonso, M.R.; Moreno, L.T.; Sierrasesumaga-Ariznabarreta, L.; Benitez, J.; Gonzalezneira, A. Common variations in ERCC2 are associated with response to cisplatin chemotherapy and clinical outcome in osteosarcoma patients. *Pharmacogenom. J.* **2009**, *9*, 347–353. [\[CrossRef\]](#)
145. Hao, T.; Feng, W.; Zhang, J.; Sun, Y.-J.; Wang, G. Association of four ERCC1 and ERCC2 SNPs with survival of bone tumour patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 3821–3824. [\[CrossRef\]](#)
146. Liu, X.; Zhang, Z.; Deng, C.; Tian, Y.; Ma, X. Meta-analysis showing that ERCC1 polymorphism is predictive of osteosarcoma prognosis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 62769–62779. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Obiedat, H.; Alrabadi, N.; Sultan, I.; Al Shatti, M.; Zihlif, M. The effect of ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms on response to cisplatin based therapy in osteosarcoma patients. *BMC Med. Genet.* **2018**, *19*, 1–9. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6035436/> (accessed on 21 October 2020). [\[CrossRef\]](#)
148. DeChant, M.J.; Ewerbeck, V.; Mau, H. Identification of drug-regulated genes in osteosarcoma cells. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 636–643. [\[CrossRef\]](#)
149. Liebermann, D.A.; Hoffman, B.; Steinman, R.A. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* **1995**, *11*, 199–210.
150. Muller, P.A.J.; Vousden, K.H. p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 2–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
151. Overholtzer, M.; Rao, P.H.; Favis, R.; Lu, X.-Y.; Elowitz, M.B.; Barany, E.; Ladanyi, M.; Gorlick, R.; Levine, A.J. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11547–11552. [\[CrossRef\]](#)
152. Wong, R.P.C.; Tsang, W.P.; Chau, P.Y.; Na Co, N.; Tsang, T.Y.; Kwok, T.T. p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1054–1061. [\[CrossRef\]](#)
153. Sato, N.; Mizumoto, K.; Maehara, N.; Kusumoto, M.; Nishio, S.; Urashima, T.; Ogawa, T.; Tanaka, M. Enhancement of drug-induced apoptosis by antisense oligodeoxynucleotides targeted against Mdm2 and p21WAF1/CIP1. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 837–842.
154. Asada, N.; Tsuchiya, H.; Tomita, K. De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line. *Anticancer Res.* **2000**, *19*, 5131–5137.
155. Tsuchiya, H.; Mori, Y.; Ueda, Y.; Okada, G.; Tomita, K. Sensitization and caffeine potentiation of cisplatin cytotoxicity resulting from introduction of wild-type p53 gene in human osteosarcoma. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 235–242.
156. Fan, J.; Bertino, J.R. Modulation of Cisplatin Cytotoxicity by p53: Effect of p53-Mediated Apoptosis and DNA Repair. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 966–972. [\[CrossRef\]](#)
157. Song, B.; Wang, Y.; Xi, Y.; Kudo, K.; Bruheim, S.; Botchkina, G.I.; Gavin, E.; Formentini, A.; Kornmann, M.; Fodstad, O.; et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* **2009**, *28*, 4065–4074. [\[CrossRef\]](#)
158. Goto, A.; Kanda, H.; Ishikawa, Y.; Matsumoto, S.; Kawaguchi, N.; Machinami, R.; Kato, Y.; Kitagawa, T. Association of Loss of Heterozygosity at the p53 Locus with Chemoresistance in Osteosarcomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **1998**, *89*, 539–547. [\[CrossRef\]](#)
159. Ferrari, S.; Bertoni, F.; Zanella, L.; Setola, E.; Bacchini, P.; Alberghini, M.; Versari, M.; Bacci, G. Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/Erbb-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer* **2004**, *100*, 1936–1942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
160. Rossner, J.P.; Gammon, M.D.; Zhang, Y.-J.; Terry, M.B.; Hibshoosh, H.; Memeo, L.; Mansukhani, M.; Long, C.-M.; Garbowski, G.; Agrawal, M.; et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *13*, 3847–3857. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
161. Pakos, E.E.; Kyzas, P.A.; Ioannidis, J.P.A. Prognostic significance of TP53 tumor suppressor gene expression and mutations in human osteosarcoma: A meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10 Pt 1*, 6208–6214. [\[CrossRef\]](#)
162. Wunder, J.S.; Gokgoz, N.; Parkes, R.; Bull, S.B.; Eskandarian, S.; Davis, A.M.; Beauchamp, C.P.; Conrad, E.U.; Grimer, R.J.; Healey, J.H.; et al. TP53 Mutations and Outcome in Osteosarcoma: A Prospective, Multicenter Study. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1483–1490. [\[CrossRef\]](#)
163. Hata, A.N.; Engelman, J.A.; Faber, A.C. The BCL-2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 475–487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Reed, J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nat. Cell Biol.* **1997**, *387*, 773–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Zhao, Y.; Zhang, C.-L.; Zeng, B.-F.; Wu, X.-S.; Gao, T.-T.; Oda, Y. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 642–647. [\[CrossRef\]](#)
166. Eliseev, R.A.; Dong, Y.-F.; Sampson, E.; Zuscik, M.J.; Schwarz, E.M.; O’Keefe, R.J.; Rosier, R.N.; Drissi, H. Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis. *Oncogene* **2008**, *27*, 3605–3614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Zangemeister-Wittke, U. Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1002*, 90–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
168. Zhang, L.; Yu, J.; Park, B.H.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Role of BAX in the Apoptotic Response to Anticancer Agents. *Science* **2000**, *290*, 989–992. [\[CrossRef\]](#)

169. Wu, X.; Cai, Z.-D.; Lou, L.-M.; Zhu, Y.-B. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* **2012**, *36*, 212–216. [\[CrossRef\]](#)
170. Nedelcu, T.; Kubista, B.; Koller, A.; Sulzbacher, I.; Mosberger, I.; Arrich, F.; Trieb, K.; Kotz, R.; Toma, C.D. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2007**, *134*, 237–244. [\[CrossRef\]](#)
171. Konstadoulakis, M.M.; Khaldi, L.; Gomatos, I.P.; Tzagarakis, G.P.; Alevizos, L.; Leandros, E.; Papagelopoulos, P.J.; Soucacos, P.N. Prognostic value of bax, bcl-2, and p53 staining in primary osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2008**, *97*, 259–266. [\[CrossRef\]](#)
172. Patatsos, K.; Shekhar, T.M.; Hawkins, C.J. Pre-clinical evaluation of proteasome inhibitors for canine and human osteosarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* **2018**, *16*, 544–553. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
173. Lemmon, M.A.; Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2010**, *141*, 1117–1134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Pignochino, Y.; Grignani, G.; Cavalloni, G.; Motta, M.; Tapparo, M.; Bruno, S.; Bottos, A.; Gammaitoni, L.; Migliardi, G.; Camussi, G.; et al. Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
175. Hughes, D.P.M.; Thomas, D.G.; Giordano, T.J.; Baker, L.H.; McDonagh, K.T. Cell Surface Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Her-2 with Nuclear Expression of Her-4 in Primary Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2047–2053. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
176. Zhou, Q.; Chen, S.; Deng, Z.; Long, H.; Zhang, S.; Chen, X. VEGF and EMMPRIN expression correlates with survival of patients with osteosarcoma. *Surg. Oncol.* **2011**, *20*, 13–19. [\[CrossRef\]](#)
177. Wu, H.; Zhang, J.; Dai, R.; Xu, J.; Feng, H. Transferrin receptor-1 and VEGF are prognostic factors for osteosarcoma. *J. Orthop. Surg. Res.* **2019**, *14*, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
178. Ebb, D.H.; Meyers, P.; Grier, H.; Bernstein, M.; Gorlick, R.; Lipshultz, S.E.; Krailo, M.; Devidas, M.; Barkauskas, D.A.; Siegal, G.P.; et al. Phase II Trial of Trastuzumab in Combination With Cytotoxic Chemotherapy for Treatment of Metastatic Osteosarcoma With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression: A Report From the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2545–2551. [\[CrossRef\]](#)
179. Maris, J.M.; Courtright, J.; Houghton, P.J.; Morton, C.L.; Gorlick, R.; Kolb, E.A.; Lock, R.; Tajbakhsh, M.; Reynolds, C.P.; Keir, S.T.; et al. Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr. Blood Cancer* **2008**, *50*, 581–587. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
180. MacEwen, E.G.; Pastor, J.; Kutzke, J.; Tsan, R.; Kurzman, I.D.; Thamm, D.H.; Wilson, M.; Radinsky, R. IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 77–91. [\[CrossRef\]](#)
181. Hassan, S.E.; Ba, M.B.; Kim, M.Y.; Lin, J.; Bs, S.P.; Gorlick, R.; Geller, D.S. Cell surface receptor expression patterns in osteosarcoma. *Cancer* **2011**, *118*, 740–749. [\[CrossRef\]](#)
182. Wang, Y.; Han, X.-D.; Qiu, Y.; Xiong, J.; Yu, Y.; Wang, B.; Zhu, Y.Q.Z.-Z.; Qian, B.-P.; Chen, Y.-X.; Wang, S.F.; et al. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor is correlated with tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2011**, *105*, 235–243. [\[CrossRef\]](#)
183. Luk, F.; Yu, Y.; Walsh, W.R.; Yang, J.-L. IGF1R-Targeted Therapy and Its Enhancement of Doxorubicin Chemosensitivity in Human Osteosarcoma Cell Lines. *Cancer Investig.* **2011**, *29*, 521–532. [\[CrossRef\]](#)
184. Rettew, A.N.; Young, E.D.; Lev, D.; Kleiner, E.S.; Abdulkarim, F.W.; Getty, P.J.; Greenfield, E.M. Multiple receptor tyrosine kinases promote the in vitro phenotype of metastatic human osteosarcoma cell lines. *Oncogenesis* **2012**, *1*, e34. [\[CrossRef\]](#)
185. Anderson, P.M.; Bielack, S.S.; Gorlick, R.G.; Skubitz, K.; Daw, N.C.; Herzog, C.E.; Monge, O.R.; Lassaletta, A.; Boldrini, E.; Pápai, Z.; et al. A phase II study of clinical activity of SCH 717454 (rocatumumab) in patients with relapsed osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **2016**, *63*, 1761–1770. [\[CrossRef\]](#)
186. Chitnis, M.M.; Yuen, J.S.; Protheroe, A.; Pollak, M.; Macaulay, V.M. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6364–6370. [\[CrossRef\]](#)
187. Analysis of Aberrant Signal Transduction Pathways in Osteosarcoma Cell Lines. *Cancer Research*. Available online: https://cancerres.aacrjournals.org/content/65/9_Supplement/1075.2 (accessed on 8 November 2020).
188. Adamopoulos, C.; Gargalionis, A.N.; Basdra, E.K.; Papavassiliou, A.G. Deciphering signaling networks in osteosarcoma pathobiology. *Exp. Biol. Med.* **2016**, *241*, 1296–1305. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
189. Kuijjer, M.L.; van den Akker, B.E.; Hilhorst, R.; Mommersteeg, M.; Buddingh, E.P.; Serra, M.; Buerger, H.; Hogendoorn, P.C.; Cleton-Jansen, A.-M. Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy. *BMC Med. Genom.* **2014**, *7*, 4. [\[CrossRef\]](#)
190. Meric-Bernstam, F.; Gonzalez-Angulo, A.M. Targeting the mTOR Signaling Network for Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2278–2287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
191. Gordon, I.K.; Ye, F.; Kent, M.S. Evaluation of the mammalian target of rapamycin pathway and the effect of rapamycin on target expression and cellular proliferation in osteosarcoma cells from dogs. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 1079–1084. [\[CrossRef\]](#)
192. Gazitt, Y.; Kolaparthi, V.; Moncada, K.; Thomas, C.; Freeman, J. Targeted therapy of human osteosarcoma with 17AAG or rapamycin: Characterization of induced apoptosis and inhibition of mTOR and Akt/MAPK/Wnt pathways. *Int. J. Oncol.* **1992**, *34*, 551–561. [\[CrossRef\]](#)
193. Wan, X.; Mendoza, A.; Khanna, C.; Helman, L.J. Rapamycin Inhibits Ezrin-Mediated Metastatic Behavior in a Murine Model of Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2406–2411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

194. Houghton, P.J.; Gorlick, R.; Kolb, E.A.; Lock, R.B.; Carol, H.; Bs, C.L.M.; Keir, S.T.; Reynolds, C.P.; Kang, M.H.; Phelps, D.; et al. Initial testing (stage 1) of the mTOR kinase inhibitor AZD8055 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr. Blood Cancer* **2011**, *58*, 191–199. [\[CrossRef\]](#)
195. Chandhanayyong, C.; Kim, Y.; Staples, J.R.; Hahn, C.; Lee, F.Y. MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. *Sarcoma* **2012**, *2012*, e404810. [\[CrossRef\]](#)
196. Cai, Y.; Cai, T.; Chen, Y. Wnt Pathway in Osteosarcoma, from Oncogenic to Therapeutic. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115*, 625–631. [\[CrossRef\]](#)
197. Vijayakumar, S.; Liu, G.; Rus, I.A.; Yao, S.; Chen, Y.; Akiri, G.; Grumolato, L.; Aaronson, S.A. High-Frequency Canonical Wnt Activation in Multiple Sarcoma Subtypes Drives Proliferation through a TCF/ β -Catenin Target Gene, CDC25A. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 601–612. [\[CrossRef\]](#)
198. Leow, P.-C.; Tian, Q.; Ong, Z.Y.; Yang, Z.; Ee, R.P.-L. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Investig. New Drugs* **2009**, *28*, 766–782. [\[CrossRef\]](#)
199. Guo, Y.; Rubin, E.M.; Xie, J.; Zi, X.; Hoang, B.H. Dominant Negative LRP5 Decreases Tumorigenicity and Metastasis of Osteosarcoma in an Animal Model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2039–2045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
200. Kansara, M.; Tsang, M.; Kodjabachian, L.; Sims, N.A.; Trivett, M.K.; Ehrich, M.; Dobrovic, A.; Slavlin, J.; Choong, P.F.; Simmons, P.J.; et al. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 837–851. [\[CrossRef\]](#)
201. Kansara, M.; Teng, M.W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 722–735. [\[CrossRef\]](#)
202. Danieau, G.; Morice, S.; Redini, F.; Verrecchia, F.; Le Royer, B.B. New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
203. Dieudonné, F.-X.; Marion, A.; Marie, P.J.; Modrowski, D. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 2118–2129. [\[CrossRef\]](#)
204. Jiang, J.; Tian, S.; Yu, C.; Chen, M.; Sun, C. TRIM37 promoted the growth and migration of the pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* **2015**, *37*, 2629–2634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
205. Tao, Y.; Xin, M.; Cheng, H.; Huang, Z.; Huanchen, C.; Zhang, T.; Wang, J. TRIM37 promotes tumor cell proliferation and drug resistance in pediatric osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 6365–6372. [\[CrossRef\]](#)
206. Fang, F.; VanCleave, A.; Helmuth, R.; Torres, H.; Rickel, K.; Wollenzien, H.; Sun, H.; Zeng, E.; Zhao, J.; Tao, J. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36780–36792. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
207. Krishnamurthy, N.; Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 50–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
208. Harb, J.; Lin, P.-J.; Hao, J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
209. Degenhardt, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Bray, K.; Anderson, D.; Chen, G.; Mukherjee, C.; Shi, Y.; Gélina, C.; Fan, Y.; et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 51–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
210. Maiuri, M.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G.; Maiuri, M.C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A. Kroemer G Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 741–752. [\[CrossRef\]](#)
211. Kim, H.J.; Lee, S.G.; Kim, Y.J.; Park, J.-E.; Lee, K.Y.; Yoo, Y.H.; Kim, J.-M. Cytoprotective role of autophagy during paclitaxel-induced apoptosis in Saos-2 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 1985–1992. [\[CrossRef\]](#)
212. Zhang, Z.; Shao, Z.; Xiong, L.; Che, B.; Deng, C.; Xu, W. Expression of Beclin1 in osteosarcoma and the effects of down-regulation of autophagy on the chemotherapeutic sensitivity. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **2009**, *29*, 737–740. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
213. Coupienne, I.; Fettweis, G.; Piette, J. RIP3 expression induces a death profile change in U2OS osteosarcoma cells after 5-ALA-PDT. *Lasers Surg. Med.* **2011**, *43*, 557–564. [\[CrossRef\]](#)
214. Tang, D.; Kang, R.; Cheh, C.-W.; Livesey, K.M.; Liang, X.; Schapiro, N.E.; Benshop, R.; Sparvero, L.J.; Amoscato, A.A.; Tracey, K.J.; et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 5299–5310. [\[CrossRef\]](#)
215. Huang, J.; Liu, K.; Yu, Y.; Xie, M.; Kang, R.; Vernon, P.J.; Cao, L.; Tang, D.; Ni, J. Targeting HMGB1-mediated autophagy as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma. *Autophagy* **2012**, *8*, 275–277. [\[CrossRef\]](#)
216. Huang, J.; Ni, J.; Liu, K.; Yu, Y.; Xie, M.; Kang, R.; Vernon, P.; Cao, L.; Tang, D. HMGB1 Promotes Drug Resistance in Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 230–238. [\[CrossRef\]](#)
217. Yang, C.; Gao, R.; Wang, J.; Yuan, W.; Wang, C.; Zhou, X. High-mobility group nucleosome-binding domain 5 increases drug resistance in osteosarcoma through upregulating autophagy. *Tumor Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2014**, *35*, 6357–6363. [\[CrossRef\]](#)
218. Xiao, X.; Wang, W.; Li, Y.; Yang, D.; Li, X.; Shen, C.; Liu, Y.; Ke, X.; Guo, S.; Guo, Z. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 201. [\[CrossRef\]](#)

219. Amaravadi, R.K.; Yu, D.; Lum, J.J.; Bui, T.; Christoprou, M.A.; Evan, G.I.; Thomas-Tikhonenko, A.; Thompson, C.B. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 326–336. [\[CrossRef\]](#)
220. Carew, J.S.; Medina, E.C.; Ii, J.A.E.; Mahalingam, D.; Swords, R.; Kelly, K.; Zhang, H.; Huang, P.; Mita, A.C.; Mita, M.M.; et al. Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *14*, 2448–2459. [\[CrossRef\]](#)
221. Shen, C.; Wang, W.; Tao, L.; Liu, B.; Yang, Z.; Tao, H. Chloroquine blocks the autophagic process in cisplatin-resistant osteosarcoma cells by regulating the expression of p62/SQSTM1. *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *32*, 448–456. [\[CrossRef\]](#)
222. Liu, W.D.; Sun, W.; Hua, Y.Q.; Wang, S.G.; Cai, Z.D. Effect of rapamycin and chloroquine on osteosarcoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **2017**, *97*, 1510–1514. [\[PubMed\]](#)
223. Senthebane, D.A.; Rowe, A.; Thomford, N.E.; Shipanga, H.; Munro, D.; Al Mazeedi, M.A.M.; Almazaydi, H.A.M.; Kallmeyer, K.; Dandara, C.; Pepper, M.S.; et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
224. Vinogradov, S.; Wei, X. Cancer stem cells and drug resistance: The potential of nanomedicine. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 597–615. [\[CrossRef\]](#)
225. Liu, B.; Ma, W.; Jha, R.K.; Gurung, K. Cancer stem cells in osteosarcoma: Recent progress and perspective. *Acta Oncol.* **2011**, *50*, 1142–1150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
226. Zhang, H.; Wu, H.; Zheng, J.; Yu, P.; Xu, L.; Jiang, P.; Gao, J.; Wang, H.; Zhang, Y. Transforming Growth Factor β 1 Signal is Crucial for Dedifferentiation of Cancer Cells to Cancer Stem Cells in Osteosarcoma. *Stem Cells* **2013**, *31*, 433–446. [\[CrossRef\]](#)
227. Gibbs, C.P.; Kukekov, V.G.; Reith, J.D.; Tchigrinova, O.; Suslov, O.N.; Scott, E.W.; Ghivizzani, S.C.; Ignatova, T.N.; Steindler, D.A. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia* **2005**, *7*, 967–976. [\[CrossRef\]](#)
228. Tirino, V.; Desiderio, V.; d'Aquino, R.; De Francesco, F.; Pirozzi, G.; Graziano, A.; Galderisi, U.; Cavaliere, C.; de Rosa, A.; Papaccio, G. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3469. [\[CrossRef\]](#)
229. Di Fiore, R.; Santulli, A.; Ferrante, R.D.; Giuliano, M.; De Blasio, A.; Messina, C.; Pirozzi, G.; Tirino, V.; Tesoriere, G.; Vento, R. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *219*, 301–313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
230. Martins-Neves, S.R.; Lopes, Á.O.; do Carmo, A.; Paiva, A.A.; Simões, P.C.; Abrunhosa, A.J.; Gomes, C.M.F. Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
231. Fujii, H.; Honoki, K.; Tsujiuchi, T.; Kido, A.; Yoshitani, K.; Takakura, Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 1381–1386. [\[PubMed\]](#)
232. Honoki, K.; Fujii, H.; Kubo, A.; Kido, A.; Mori, T.; Tanaka, Y.; Tsujiuchi, T. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol. Rep.* **2010**, *24*, 501–505. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
233. Chan, C.-H.; Morrow, J.K.; Li, C.-F.; Gao, Y.; Jin, G.; Moten, A.; Stagg, L.J.; Ladbury, J.E.; Cai, Z.; Xu, D.; et al. Pharmacological Inactivation of Skp2 SCF Ubiquitin Ligase Restricts Cancer Stem Cell Traits and Cancer Progression. *Cell* **2013**, *154*, 556–568. [\[CrossRef\]](#)
234. Ding, L.; Wang, C.; Cui, Y.; Han, X.; Zhou, Y.; Bai, J.; Li, R. S-phase kinase-associated protein 2 is involved in epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-resistant osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1841–1852. [\[CrossRef\]](#)
235. Cheng, Z.; Guo, Y.; Yang, Y.; Kan, J.; Dai, S.; Helian, M.; Li, B.; Xu, J.; Liu, C. Nitidine chloride suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in osteosarcoma cell migration and invasion through Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 1023–1029. [\[CrossRef\]](#)
236. Laverdière, C.; Kolb, E.A.; Supko, J.G.; Gorlick, R.; Meyers, P.A.; Maki, R.G.; Wexler, L.; Demetri, G.D.; Healey, J.H.; Huvoos, A.G.; et al. Phase II study of ecteinascidin 743 in heavily pretreated patients with recurrent osteosarcoma. *Cancer* **2003**, *98*, 832–840. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
237. Ratti, C.; Botti, L.; Cancila, V.; Galvan, S.; Torselli, I.; Garofalo, C.; Manara, M.C.; Bongiovanni, L.; Valenti, C.F.; Burocchi, A.; et al. Trabectedin Overrides Osteosarcoma Differentiative Block and Reprograms the Tumor Immune Environment Enabling Effective Combination with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 5149–5161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

D'autres mécanismes de résistance aux thérapies conventionnelles dans l'ostéosarcome, non évoqués dans cette revue ont été décrits comme l'implication des ARN non codants (ncARN) ou encore des vésicules extra-cellulaires. Parmi les mécanismes décrits dans cette revue, l'autophagie ainsi que les modulations des voies de signalisation, notamment les voies PI3K-Akt-mTOR et MAPK seront les deux processus biologiques étudiés dans ce projet de thèse. L'étude des mécanismes de résistance, étant à l'origine de l'échec thérapeutique de certains patients, a permis d'identifier de nouvelles cibles et/ou stratégies thérapeutiques. Les drogues dites « épigénétiques », telles que les inhibiteurs de protéines à bromodomaine et domaine extraterminal font partie des nouvelles thérapies en développement.

4. La thérapie épigénétique ciblant les protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal

Toute information génétique qui n'est pas directement codée par la séquence d'ADN correspond à l'information épigénétique. L'essentiel de l'information épigénétique est codé par des modifications chimiques de l'ADN. Ces modifications épigénétiques, matérialisées par des marques biochimiques apposées sur l'ADN ou les histones, sont à l'origine de l'expression ou non des gènes. Les marques apposées sur l'ADN les mieux caractérisées sont les groupements méthyle (CH₃). Cette modification consiste en l'ajout covalent d'un groupement méthyle sur la base cytosine de l'ADN. Lorsqu'elle se produit sur la séquence promotrice des gènes, il y a généralement une répression de l'expression des gènes. Les modifications chimiques apposées sur les histones peuvent être des phosphorylations, des acétylations, des méthylations, des ubiquitinations ou encore des SUMOylations. Ces modifications d'histones ou l'incorporation d'histones légèrement différentes peuvent favoriser (« allumer ») ou au contraire bloquer (« éteindre ») l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN et des histones entraîne un empaquetage des nucléosomes empêchant la fixation des facteurs de transcription. Ceci réprime

alors l'expression des gènes. A l'inverse, l'acétylation entraîne un dépliement des nucléosomes. Les facteurs de transcription peuvent se fixer à l'ADN, permettant la transcription et l'expression des gènes. Les différentes marques sont apposées, identifiées ou encore effacées par différentes enzymes épigénétiques. Les enzymes dites « écrivaines » (« writers ») catalysent l'addition des modifications épigénétiques. Il s'agit, par exemple, des enzymes Histone AcétylTransférase (HAT) et Histone MéthylTranférase (HMT) (Figure 7) [288]. Ces modifications sont réversibles et peuvent être effacées par les enzymes épigénétiques « effaceurs » (« erasers »), comme les enzymes histone désacéthylase (HDAC) ou histone lysine ou arginine déméthylase (KDM ou RDM), catalysent la suppression des modifications (Figure 7). Les marques apposées peuvent être reconnues par des protéines épigénétiques dites « lectrices » (« readers ») (Figure 7). Ces enzymes présentent des affinités pour des modifications spécifiques. Cette spécificité est due à l'interaction entre les résidus des histones et de l'enzyme « lectrice », plus précisément sa poche de liaison au ligand. Les processus épigénétiques interviennent dans la régulation de nombreux événements tels que la division, la différenciation, la survie ou encore la mobilité cellulaire. L'altération des processus épigénétiques favorise le développement et la progression des maladies humaines telles que les syndromes héréditaires (syndrome Immuno-Déficience Combinée), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, parkinson, etc.) ou métaboliques (obésité, diabète de type 2, etc.) mais aussi les cancers. Des anomalies épigénétiques telles que des épimutations, activant des oncogènes ou inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs ont pu être mises en évidence. Dans les cellules cancéreuses, l'épigénome est caractérisé par une reprogrammation de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones, du positionnement des nucléosomes ou encore des ARN non codants, en particulier l'expression des microARN [289]. De même, des mutations affectant des gènes codant pour les enzymes responsables des marquages épigénétiques ont été identifiées dans des cellules tumorales. Puisque les marques épigénétiques sont réversibles, il doit être possible de corriger celles associées à des maladies, notamment dans le cancer. Ainsi, les molécules agissant sur les mécanismes épigénétiques semblent être des agents thérapeutiques prometteurs. Plusieurs inhibiteurs de protéines épigénétiques ont été approuvés par la FDA pour le traitement du cancer. Des inhibiteurs de HDAC, le vorinostat ou le romidepsin sont par exemple utilisés dans le traitement du lymphome cutané à cellules T récidivant [290–292]. Des inhibiteurs de DNA méthylase, tel que l'azacytidine, sont utilisés dans l'indication du traitement de maintenance chez les patients adultes atteints de leucémie aiguë myéloïde [293,294]. D'autres acteurs épigénétiques tels que les bromodomaines (BRD) et plus précisément les protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal (BET)

apparaissent aujourd'hui comme de potentielles cibles pour le développement de nouvelles thérapies [295].

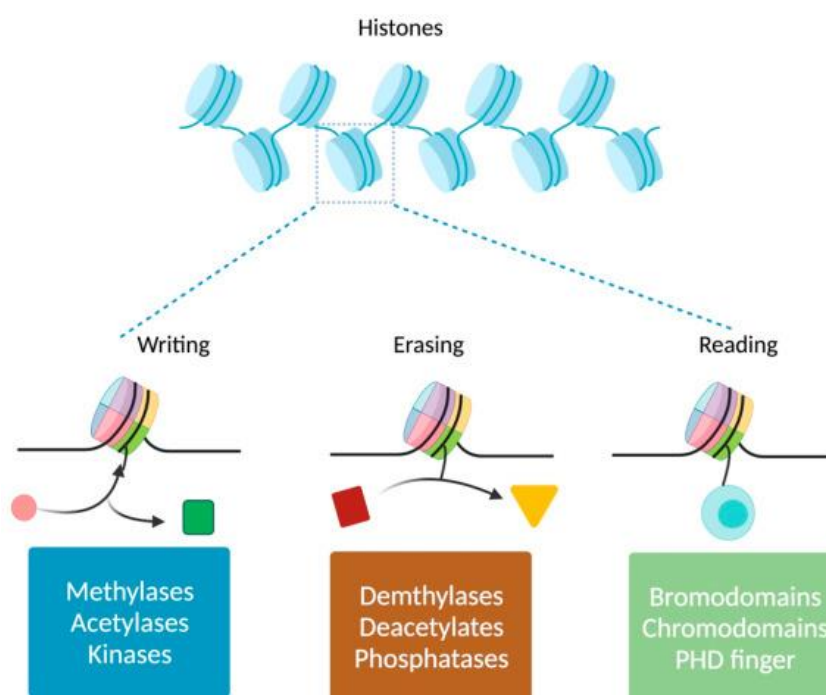


Figure 7 : Les protéines BET sont les lecteurs des modifications épigénétiques apposées sur les histones. Les modifications épigénétiques apposées sur les histones par les enzymes histone acétyltransférase et histone méthyltransférase, sont identifiées par les protéines à bromodomaines et effacées par les enzymes histone désacétylase ou histone lysine ou arginine déméthylase. Figure issue de la revue « Bromodomains : A novel target for the anticancer therapy – Shivani Gokani » [288].

a) La famille des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal

Les bromodomaines, identifiés dans les années 1970 au niveau des gènes *Brahma* et *female sterile homeostic* de la drosophile *Drosophila melanogaster* [296], sont un groupe de protéines caractérisées comme des lecteurs (« readers ») de modifications épigénétique, identifiant particulièrement les lysines ϵ -N-acétylées (Kac) des queues des histones ainsi que des protéines non histones associées à la transcription telles que les facteurs de transcription et les co-régulateurs transcriptionnels [297]. Soixante et un motifs bromodomaines ont été répertoriés à ce jour dans le génome humain et sont classés en 8 sous-familles [298]. Les protéines contenant des motifs bromodomaines sont constituées d'un ou plusieurs bromodomaines. La majorité de ces protéines possèdent un bromodomaine, un tiers en possède deux, la protéine à bromodomaine PB1 en possède six. Les 61 bromodomaines codés par le

protéome humain ont été classifiés par Knapp et al, en huit familles distinctes, notées de I à VIII, selon leur similarité de séquence et de structures (Figure 8). Les membres appartenant à la sous-famille II sont les protéines à Bromodomaine et domaine Extra-Terminal [298]. Cette sous-famille, aussi appelée « BET » comprenant 8 membres et est subdivisée en deux sous-familles BD1 et BD2.

Figure 8 : Arbre phylogénétique représentant les 61 bromodomaines codés par le protéome humain et classifiés selon leur similarité de séquence et de structures par Knapp et al. en huit familles distinctes (I à VIII). Chacune de ces 8 sous-familles est représentée par une couleur et un chiffre romain. Figure issue de la revue « Bromodomains : structure, function and pharmacology of inhibition – Elena Ferri » [297].

positif d'élongation de la transcription-b (P-TEFb). P-TEFb va ensuite phosphoryler la sérine 2 présente sur le domaine carboxyl-terminal de l'ARN pol II, permettant l'élongation de la transcription [298]. Le domaine ExtraTerminal est une région conservée d'environ 80 acides aminés qui recrute les protéines effectrices de la transcription. Le domaine C-Terminal, quant à lui, est une région conservée d'environ 40 acides aminés qui facilite le recrutement de régulateurs transcriptionnels, notamment P-TEFb [301]. Les protéines BET sont alors capables de reconnaître et de fixer de manière dépendante ou indépendante du bromodomaine d'autres protéines que des histones acétylées, comme différents facteurs de transcription. Ces protéines peuvent aussi avoir une activité kinase, qui n'est pas encore totalement bien comprise [302].

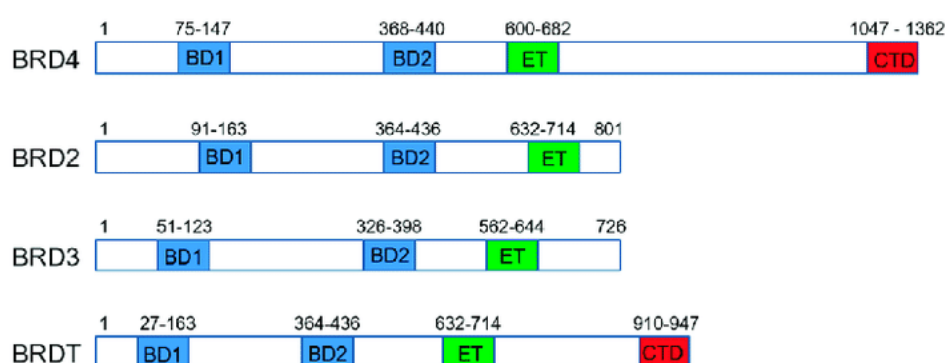


Figure 9 : Organisation des domaines des membres de la famille BET humaine BRD4, BRD2, BRD3, et BRDT. Deux bromodomaines (BD1 et BD2) et un domaine extra-terminal sont présents dans les protéines BET (ET). Les protéines BRD4 et BRDT contiennent également un domaine C-terminal, noté CTD. Figure issue de « BET family protein BRD4: An emerging actor in NFκB signaling in inflammation and cancer – Azadeh Hajmirza » [303].

BD : bromodomaine; ET : domaine extra-terminal ; CTD : Domaine C-terminal.

La protéine BRD2, aussi connue sous les noms RING3 ou FSRG1 est une sérine/thréonine kinase appartenant au complexe multiprotéique, le médiateur, fonctionnant comme un co-activateur transcriptionnel de l'ARN polII [304]. BRD2 recrute E2F-1 et E2F-2, deux facteurs de transcription et contribue à la transcription médiée par la Pol II au niveau de la chromatine hyperacétylée. En recrutant les protéines E2F, BRD2 active les promoteurs de gènes régulateurs du cycle cellulaire, comme la cycline A, la cycline D1 et la cycline E [305–307]. De plus, il a été démontré que BRD2 possède un rôle de protéine chaperonne d'histone contribuant au remodelage de la chromatine [308].

La protéine BRD3, aussi notée ORFX, est également une sérine/thréonine kinase qui facilite la transcription de la Pol II via des nucléosomes hyperacétylés et ce indépendamment de P-TEFb. BRD3 pourrait coopérer avec BRD4 afin de recruter le complexe protéique P-TEFb

sur la chromatine et faciliter l'activation transcriptionnelle [309]. D'une manière dépendante de l'acétylation, BRD3 se lie au facteur de transcription GATA1 facilitant une association stable avec la chromatine [310]. BRD3 et BRD4 sont nécessaires à la transcription induite par l'IL-1 β ou le TNF- α [309].

Dans le cadre de l'épissage, BRDT alias BRD6 module l'expression des gènes et participe au remodelage de la chromatine. Au cours de la spermatogenèse, BRDT interagit avec l'histone H4 acétylée et pourrait contribuer à l'élimination des histones acétylées [301].

BRD4, aussi notée MCAP ou Hunk1, est une sérine kinase. Il s'agit du membre le plus étudié de la famille de protéines BET. Cette protéine se lie à la chromatine avec une préférence pour la lysine-14 acétylée sur l'histone H3 et la lysine-5/12 sur l'histone H4 [311]. BRD4 comprend trois isoformes d'épissage, notés A, B et C. Seulement l'isoforme A contient le domaine CTD [312]. Cet isoforme joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle en agissant comme co-activateur transcriptionnel de P-TEFb et stimule la transcription de Pol II [313,314]. La liaison de BRD4 facilite le recrutement de P-TEFb sur la chromatine. De plus, la kinase-9 dépendante de la cycline (CDK9), une protéine centrale du complexe e P-TEFb a été identifiée comme étant nécessaire pour la régulation de la transcription médiée par MYC (Figure 10) [301]. De plus, le domaine ET de BRD4 recrute indépendamment des activateurs transcriptionnels tels que NSD3 (une histone méthyltransférase), JMJD6 (une histone arginine déméthylase) et CHD4 (la sous-unité catalytique du remodeleur de chromatine NuRD) (Figure 10). BRD4 agit également comme un signet mitotique et un régulateur du cycle cellulaire. En effet, BRD4 reste associée à H4K5 acétylée sur la chromatine pendant la mitose, ce qui entraîne une décompaction rapide de la chromatine adjacente et la transcription. Tout au long de la mitose, BRD4 marque les sites de début de transcription des gènes liés à la croissance lors de la transition M/G1 et favorise la progression du cycle cellulaire des phases G1 à S et G2 à M [315]. Il a également été montré que la fonction transcriptionnelle de BRD4 est vitale au cours de l'embryogenèse. En effet, elle semble nécessaire à l'auto-renouvellement et au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires [316]. L'expression de cette protéine BET est également essentielle pour la myogenèse et l'adipogenèse [298].

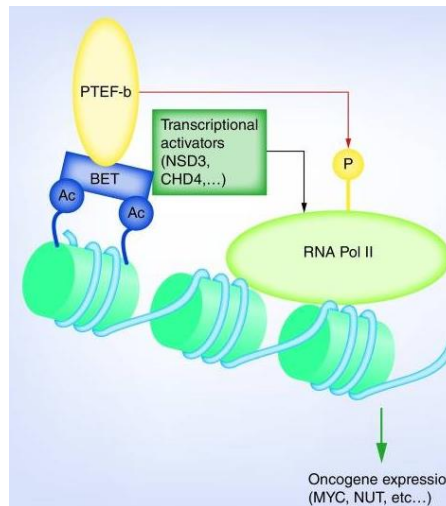


Figure 10 : Rôle des protéines BET dans l'expression d'oncogènes. Les protéines BET se lie aux histones acétylées et recrute PTEF-b aux sites de transcription active de gènes favorisant la croissance tels que MYC et NUT. De plus, le domaine ET de BRD4 recrute NSD3, JMJD6 et CHD4, des activateurs de transcription indépendants dans le but de stimuler encore plus les taux de transcription. Figure issue de la revue « Bromodomain and extra-terminal motif inhibitors: a review of preclinical and clinical advances in cancer therapy – Ali Alqahtani » [317]. PTEF-b: positive transcription elongation factor b; BET: Bromodomain and Extra Terminal Domain; Ac: Actylation; NSD3: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 3; CHD4: chromodomain helicase DNA binding protein 4; RNA Pol III: RNA polymerase III.

b) Rôle des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal dans le cancer

Les protéines BET ont été initialement décrites pour leur rôle de régulateurs épigénétiques importants dans l'inflammation et les maladies inflammatoires [288,298]; cependant, il est maintenant bien établi que les protéines BET, en particulier la protéine BRD4, sont fréquemment dérégulées dans le cancer, contribuant au remodelage chromatinien aberrant et à la transcription des gènes qui médient la tumorigenèse [317].

Tout d'abord, des réarrangements chromosomiques peuvent avoir lieu entre les gènes BET BRD4 (ou moins fréquemment BRD3) sur le chromosome 19q13.1, et le gène NUT sur le chromosome 15q14. Ces réarrangements sont responsables de l'apparition d'un cancer, le carcinome NUT (NMC), une forme rare et agressive de carcinome épidermoïque indifférencié. NUT est une protéine exprimée exclusivement au cours de la spermatogenèse et dont la fonction est inconnue, or la translocation t(15;19) crée un oncogène, noté BRD4-NUT régulé par le promoteur de BRD4. L'oncoprotéine de fusion BRD-NUT est impliquée dans la transformation

cellulaire, contribuant notamment à la carcinogenèse du carcinome NUT [317–319]. L'oncoprotéine BRD4-NUT bloque la différenciation des cellules NMC en maintenant l'expression de MYC, alors que sa suppression entraîne la différenciation des cellules NMC [320,321]. La protéine de fusion BRD4-NUT induit la tumorigenèse en recrutant et en séquestrant la protéine histone acétyltransférase CBP/p300. NUT interagit avec CBP/p300 et suractive son activité d'acétylation, induisant l'hyperacétylation des histones et l'activation de la transcription. BRD4-NUT empêche ainsi CBP/p300 d'aller co-activer la transcription de nombreux gènes, et bloque notamment la réponse apoptotique p53-dépendante [322,323]. La partie NUT de la protéine de fusion ancrée à la chromatine par les doubles bromodomaines stimule également l'hyperacétylation des histones, ce qui entraîne une liaison plus étroite de BRD4 à la chromatine. Par conséquent, de multiples facteurs interagissant avec BRD4 sont recrutés au locus chromatinien associé à NUT pour activer l'expression *in situ* du transgène [322]. L'oncogène de fusion BRD4-NUT conduit également à l'activation anormale de SOX2, un facteur de transcription essentiel dans le maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches embryogéniques indifférenciées, entraînant la prolifération et la transformation cellulaire de type cellule souche en cellule de carcinome NUT [324]. Ainsi dans les cellules de carcinome NUT, la dérégulation de BRD4 est impliquée dans la prolifération cellulaire anormale.

Des mutations des gènes codants pour les protéines BET telles que des substitutions faux-sens et des substitutions non-sens, ont été documentées dans les cancers du gros intestin, du poumon ou encore dans les tumeurs malignes hématopoïétiques [298,325,326]. Des substitutions d'acides aminés au niveau des régions des deux hélices terminales αB et αC et proximales au site de liaison acétyl-lysine des protéines BET modifient la structure tertiaire des protéines et diminuent leur stabilité, favorisant ainsi les propriétés oncogéniques des protéines BET [326]. Ainsi, les événements génétiques affectant les membres de la famille BET peuvent modifier la conformation des protéines et avoir un impact sur les interactions protéine-protéine ou protéine-ADN qui régulent les processus biologiques intervenant dans l'initiation tumorale, la progression tumorale ou encore la dissémination métastatique [298].

Le gène BRD4 est amplifié dans 20 types de cancers [327], tels que le glioblastome ou le mélanome (primaire et métastatique) [317,328,329]. BRD4 s'est avérée fortement exprimée dans les tissus tumoraux et les lignées cellulaires d'ostéosarcome et pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'ostéosarcome agressif [330–332]. BRD4 en s'associant

avec le complexe Mediator, régule l'expression de divers oncogènes tels que MYC [317,333]. Ainsi, la surexpression de la protéine BRD4, favorise l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale [300,334,335]. L'expression aberrante de la protéine BRD4, *in vitro* est associée à l'invasion cellulaire, à la progression du cycle cellulaire et à la formation de métastases [298,336]. L'expression aberrante de l'oncogène MYC, induite par la surexpression de BRD4 a été montrée dans diverses hémopathies malignes telles que la leucémie mixte, la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et le lymphome de type Burkitt [334,335,337–339]. La surexpression de MYC est également montrée dans un certain nombre de tumeurs solides, notamment les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein [340–342].

Les protéines BET sont en partie responsables de la modulation de l'expression des cytokines inflammatoires impliquées dans l'initiation, la progression des tumeurs et l'acquisition du phénotype métastatique des cellules cancéreuses [288,311].

L'inflammation chronique peut entraîner la transformation cellulaire et l'initiation tumorale [343,344]. Des études ont démontré une incidence accrue du cancer du sein chez les patients atteints de diabète de type 2 [336]. Les patients atteints de diabète de type 2 présentent dans la plupart des cas une inflammation du tissu adipeux viscéral, conduisant à une inflammation chronique du tissu adipeux mammaire et à l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α , l'IL-17A et l'IL-22 qui favorisent l'initiation du cancer [336]. En s'associant physiquement au promoteur RORC (Recombinant RAR-Related Orphan Receptor C), augmentant au cours de l'obésité, BRD4 augmente directement l'expression des cytokines IL-17 et IL-22, favorisant l'initiation du cancer. Comme évoqué dans les paragraphes précédents, l'expression de l'oncogène c-MYC est amplifiée dans certains cancers. Dans les états inflammatoires, les altérations de l'expression et de la fonction de cet oncogène sont également fréquentes. Cela pourrait signifier que MYC contrôle des voies moléculaires et cellulaires reliant l'inflammation et la tumorigenèse [345]. Des souris atteintes d'obésité présentent une activité de MYC accrue ainsi qu'une augmentation de l'expression du FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), favorisant la transformation des cellules épithéliales, à l'origine des cellules cancéreuses, dans la peau et le colon. Dans ces souris, l'inhibition de la protéine BRD4 diminue la transcription dépendante de MYC, ce qui inhibe l'obésité ainsi que la libération de FGF2 et bloque la transformation néoplasique des cellules épithéliales, limitant ainsi l'initiation du cancer [346,347]. BRD4 augmente aussi l'expression de facteurs SASP (senescent-associated secreted phenotype) comme l'IL-1 α , β , l'IL-8, l'INHBA (Inhibin Subunit Beta A), et la BMP2 (Bone morphogenetic protein 2), intervenant dans la sénescence des

cellules [288]. Or, le sécrétome des cellules sénescents favorise l'initiation tumorale, notamment en permettant la prolifération de cellules pré-cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse mais aussi la chimiorésistance [348].

La progression tumorale peut être influencée par les protéines BET, qui favorisent la promotion de l'inflammation et l'activation des voies de signalisation, y compris des voies pro-inflammatoires dans le microenvironnement tumoral. La protéine NF- κ B (nuclear factor-kappa B) est constitutivement active dans de nombreux cancers et la signalisation médiée par NF- κ B favorise la transcription de cytokines pro-tumorigènes et pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) [298,349]. La liaison de la protéine BRD4 au résidu acétylé lysine-310 sur RelA (REL-associated), impliqué dans la formation d'hétérodimères NF- κ B, de sa translocation nucléaire et de son activation, entraîne la co-activation et la stabilisation de NF- κ B dans des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire humain [350]. Le rôle de la protéine BRD2 a également été démontré dans la régulation de l'activité de NF- κ B dans les lignées cellulaires de mélanome [351]. L'inhibition de BRD2, dans les cellules de mélanome, bloque la signalisation dépendante de NF- κ B, entraînant la diminution de l'expression des gènes cibles de NF- κ B, notamment IL-6, IL-8, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5) et CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10). Tout cela inhibe la croissance des cellules de mélanome [349]. De plus, l'inhibition pharmacologique des cytokines pro-tumorigènes IL-6 et IL-8 bloque cette boucle de signalisation autocrine et diminue l'activation de NF- κ B [351]. L'amplification de MYC due à une surexpression des protéines BET, notamment de la protéine BRD4, augmente l'expression de CCL9 (C-C Motif Chemokine Ligand 9) et de IL-23 [352]. CCL9 augmente la production et la libération de cytokines impliquées dans l'angiogenèse. L'IL-23 est une cytokine qui supprime les fonctions des cellules T effectrices, des cellules B et des cellules NK infiltrant la tumeur, favorisant ainsi l'immuno-évasion et la progression de la tumeur [298]. Les protéines BET comme BRD4 jouent également un rôle dans le cancer via l'activation de d'autres voies de signalisation, comme la voie des oestrogènes dans le cancer du sein. BRD4 régule l'expression génique induite par le récepteur α des oestrogènes en affectant la phosphorylation associée à l'élongation de l'ARN polymérase II (RNAPII) et la mono-ubiquitination de l'histone H2B. Ainsi, une surexpression de BRD4 induit l'activation de la signalisation des oestrogènes, impliquée dans la prolifération cellulaire et la tumorigenèse.

La surexpression des protéines BET renforce également la dissémination métastatique. Les cellules cancéreuses perdent leurs adhérences intercellulaires et leurs polarités cellulaires au cours de la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM). Elles développent également des

propriétés invasives qui provoquent l'apparition de métastases. Dans les cellules de cancer du sein, l'EMT et l'acquisition du phénotype invasif est induit par la voie de signalisation Jagged1/Notch1 [353]. Jagged1 se lie au récepteur de Notch, le clive et induit sa translocation vers le noyau. Une fois dans le noyau Notch se lie à CBF1 (C Promoter Binding Factor 1), à CSL (CBF-1, Suppressor of Hairless, Lag-1) et à CoAs (Coenzyme A) et active l'expression de facteurs de transcription essentiels à la TEM, tels que Snail et Slug [353]. La protéine BRD4 en augmentant l'expression de Jagged1, un ligand de Notch1, active la signalisation induite par Notch1 et active ainsi les propriétés migratoires des lignées cellulaires du cancer du sein [344,354].

Les protéines BRD2 et BRD4 sont également impliquées dans la transmission des virus tumoraux pendant la division cellulaire. Ces protéines facilitent l'attachement de la chromatine aux épisomes viraux. Par exemple, le virus d'Epstein-Barr et les papillomavirus sont associés à BRD4 pour l'ancrage de leurs génomes viraux aux chromosomes mitotiques [355].

Ainsi, l'inhibition des protéines BET pourrait jouer un rôle important dans le traitement des cancers.

c) Inhibiteurs des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal

Dans le but de perturber la liaison des protéines BET aux résidus lysine acétylée de la chromatine, d'inhiber l'expression de voies oncogéniques, comme c-MYC [300], YAP [356], NOTCH3 [357] ou encore RUNX2 [331] et de limiter ainsi l'effet des protéines BET sur la tumorigenèse, des inhibiteurs spécifiques de ces protéines (BETi) ont été développés et font, pour certains d'entre eux, l'objet d'évaluations cliniques.

L'inhibition de l'interaction des protéines BET avec les histones acétylées peut se faire de différentes manières [358]. Les premiers inhibiteurs de protéines BET à avoir été développés, les pan-BET, ne font pas de distinction entre les deux bromodomaines d'une même protéine BET. Ils peuvent ainsi se fixer aux deux bromodomaines, BD1 et BD2, des protéines BET [358]. Dans le but d'améliorer la sélectivité, d'accroître la puissance et la pharmacodynamique de ces inhibiteurs, les chimistes ont optimisé ces composés et ont développé des inhibiteurs dits bivalents [359]. Ces inhibiteurs se fixent simultanément aux deux bromodomaines et ont l'avantage de créer une liaison forte et puissante avec les protéines BET.

D'autres inhibiteurs ont été développés dans le but d'interagir avec un des bromodomaine et le domaine extra-terminal des protéines BET. Certains inhibiteurs, appelés inhibiteurs monovalents, se fixent préférentiellement à un seul bromodomaine et sont donc soit spécifiques du BD1, soit spécifiques du BD2. Enfin, de nouveaux composés, les PROTACS (proteolytic targeting chimera) ont récemment été conçus. Contrairement aux molécules inhibitrices jusqu'alors développées, ces nouvelles molécules sont capables, en plus d'inhiber les protéines BET, de les dégrader.

Les inhibiteurs pan-BET

En 2010, le premier inhibiteur de protéines BET a été développé et caractérisé. Il s'agit de la molécule JQ1, une thiénotriazolo-1,4-diazépine, inhibant BRD2 et BRD4 [360] (Figure 11). Cet inhibiteur se lie au motif de liaison de la lysine acétylée, empêchant alors la fixation de la protéine BRD4 à la chromatine. JQ1 a initialement été testé dans le carcinome NUT [361]. *In vitro* et *in vivo*, cet inhibiteur est capable de cibler l'oncoprotéine BRD4-NUT [362]. De plus, les cellules NMC (NUT midline carcinoma) traitées avec du JQ1 subissent un arrêt de la différenciation et de la croissance cellulaire. *In vivo*, JQ1 inhibe la progression tumorale et améliore les taux de survie dans un modèle de xénogreffe de souris NMC [361]. Cet inhibiteur est également efficace dans de nombreuses tumeurs solides, y compris dans le cancer du poumon, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le médulloblastome ou encore le neuroblastome [363]. Dans les lignées de cancer du pancréas [364], des tumeurs du système nerveux [365–367], de cancer colorectal [368] ou encore de cancer du sein [369,370], la réduction de l'expression de MYC, par l'inhibition de BRD4 via le JQ1, inhibe la croissance cellulaire, induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cet inhibiteur est également efficace dans des modèles précliniques d'hémopathies malignes telles que les myélomes multiples [300], les leucémies lymphoblastiques [339,371] ou encore les leucémies myéloïdes aiguës [372]. Dans le myélome multiple, le JQ1 diminue l'expression de MYC et IRF4 (Interferon regulatory factor 4) et augmente celle de HEXIM1 (hexamethylene bisacetamide inducible protein 1) [373]. *In vivo*, JQ1 possède une efficacité anticancéreuse dans différents modèles tels que l'adénocarcinome du canal pancréatique [374], le cancer colorectal [364], le cancer du sein triple négatif [375,376], puisqu'il induit une répression tumorale significative [377,378].

Au sein du laboratoire, il a été montré que le JQ1 réduit la viabilité cellulaire de lignées d'ostéosarcome. Son utilisation *in vivo*, diminue la croissance tumorale et prolonge également la survie des souris [331]. L'équipe d'Emma K. Baker, a aussi montré que l'inhibition de BRD4

par le JQ1 exerce une puissante activité anti-tumorale envers des lignées cellulaires primaires et établies d'ostéosarcome. Le JQ1 induit l'apoptose mais ne permet pas l'arrêt du cycle cellulaire. L'activité de cet inhibiteur dans les cellules d'ostéosarcome est médiée indépendamment de la régulation négative de MYC. JQ1 inhibe l'expression du facteur de transcription FOSL1 en déplaçant BRD4 de son locus. Dans cette même étude, le JQ1 montre également une activité anti-tumorale significative *in vivo* [332]. Malgré son activité anti-tumorale, le JQ1 présente un profil pharmacocinétique médiocre et une faible biodisponibilité orale [379]. Cette molécule n'est pas utilisée en clinique en raison de sa courte demi-vie, qui est de seulement 1 heure. Des améliorations ultérieures des propriétés pharmacologiques ont permis la synthèse d'analogues du JQ1, tels que TEN-010 aussi noté JQ2 [380] et OTX-015, aussi connu sous le nom MK-8628 ou encore Birabresib (Figure 12). D'autres inhibiteurs, comme l'I-BET 151, aussi noté GSK1210151A ; l'I-BET 762, aussi connu sous les noms GSK525762 ou molibresib ; le CPI-0610 aussi connu sous le nom de pelabresib ; l'ABBV-075 (inhibiteur pan-BET le plus efficace pour le moment) ou encore le GS-5829, aussi connu sous le nom d'Alobresib ont été développés et ont montré leur efficacité anti-tumorale dans de nombreux cancers (Figure 12).

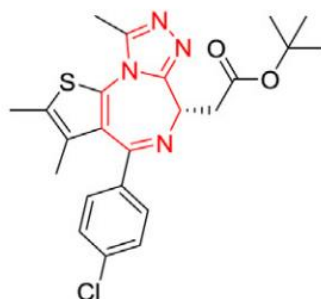


Figure 11 : Structure chimique de l'inhibiteur JQ1. Figure issue de la revue « Bromodomains : structure, function and pharmacology of inhibition » [297].

Ces inhibiteurs pan-BET ont montré leur efficacité, *in vitro* et *in vivo*, dans de nombreux modèles de cancers hématologiques. L'ABBV-075 possède, par exemple, une efficacité anti-tumorale, en pré-clinique dans des lignées cellulaires de cancers hématologiques [381,382]. De plus, l'OTX-015 [383,384], l'I-BET 151 [335] ou encore l'I-BET 762 [385,386] sont efficaces dans des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë et lymphoïde (LAM et LAL). De manière générale, ces inhibiteurs limitent la fixation des protéines BET sur la chromatine et inhibent la transcription de gènes clés comme C-MYC, BCL-2, CDK6 et BCL-xL, et, au contraire, activent la transcription de BAD, BAK et BAX. Cela conduit à un arrêt du cycle

cellulaire, à une induction de l'apoptose et, par conséquent à une inhibition de la croissance cellulaire. Le GS-5829 montre également son efficacité pré-clinique dans la leucémie lymphoïde chronique. En effet, cet inhibiteur inhibe la prolifération des cellules et induit l'apoptose des cellules leucémiques par la dérégulation de voies de signalisation clés, telles que BLK, AKT, ERK1/2 et MYC. La modulation de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ indique que le GS-5829 inhibe également la signalisation NF- κB [387]. Le CPI-0610 montre son efficacité anti-tumorale dans des lignées cellulaires ainsi que dans les cellules de myélome multiple dérivées de patients [388]. *In vivo*, cet inhibiteur [388] ainsi que l'I-BET 151 [389] et l'I-BET 762 [389–392] inhibent la croissance tumorale et augmente la survie de souris atteintes de myélome multiple. De plus, le CPI-0610 réduit la transactivation de NF- κB , voie médiatrice importante de l'inflammation chronique dans la myélofibrose. Le CPI-0610 inhibe également la production de cytokines inflammatoires et améliore la survie de souris atteintes de myélofibrose [408]. L'I-BET 762 est testé dans un essai clinique incluant des patients d'hémopathies malignes récidivantes ou réfractaires (NCT01943851).

Les inhibiteurs pan-BET possèdent aussi une efficacité anti-tumorale envers les tumeurs solides. L'ABBV-075 montre, par exemple, une efficacité dans des modèles murins de xénogreffes de cancers du poumon, du pancréas, du sein, de la prostate, de la tête et du cou [414]. Les BET inhibiteurs ont montré leur efficacité dans des tumeurs cérébrales. En effet, le TEN-010 [393] ou l'I-BET 762 [394], en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire, inhibent la viabilité cellulaire dans le neuroblastome. Le traitement de cellules de glioblastome ou de médulloblastome avec de l'I-BET 151 arrête la progression du cycle cellulaire et diminue la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* [328,397]. Ces mêmes observations sont faites dans un modèle de cancer ovarien traitées avec l'OTX-015 [395,396]. Ce même inhibiteur réduit significativement la masse tumorale dans un modèle murin de xénogreffes de cancer du sein [383]. L'I-BET 762 inhibe également la croissance tumorale et augmente la survie de souris atteintes de cancer du sein [389–392]. Des cellules de carcinome séreux utérin, une variante biologiquement rare et agressive du cancer de l'endomètre, montrent une bonne sensibilité *in vitro* et *in vivo* au GS-5829. De plus, dans ce modèle, le GS-5829 s'est avéré plus efficace que le JQ1 [397]. La prolifération cellulaire des cellules du cancer du pancréas [398] ou de la prostate est inhibée par l'I-BET 762. *In vivo*, l'utilisation de cet inhibiteur inhibe la croissance tumorale et augmente la survie de souris atteintes de cancer de la prostate [389–392]. L'I-BET 762 induit aussi l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire et inhibe la prolifération cellulaire dans l'ostéosarcome [332]. Les inhibiteurs pan-BET sont également efficaces dans des tumeurs plus rares. L'inhibiteur I-BET 151 présente une activité

anti-tumorale significative dans des modèles murins de carcinome NUT [317]. En clinique, l'utilisation d'OTX-015 contre les carcinomes NUT montre des données prometteuses [391]. De plus, une rémission partielle et une maladie stable sont observées chez des patients atteints de carcinome NUT traités par le GSK525762 (NCT01587703) [406] (Tableau V). L'inhibition de BRD4 par l'I-BET 762, diminue la capacité clonogénique, induit l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la sénescence de cellules de carcinome muco-épidermoïde. De plus, l'inhibition de BRD4 a également entraîné l'élimination des cellules souches cancéreuses de l'ensemble des populations cellulaires de carcinome muco-épidermoïde [399].

D'autres inhibiteurs pan-BET font l'objet d'études cliniques à la fois chez des patients atteints de tumeurs hématologiques et de tumeurs solides. D'après deux études cliniques menés chez des patients atteints de cancer du sein (NCT02983604) ou de cancer de la prostate (NCT02607228), le GS-5829 a été bien toléré mais a montré une efficacité limitée [400]. L'inocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique ainsi que l'activité anti-tumorale du TEN-010 sont évaluées dans deux essais cliniques de phase I incluant des patients atteints de tumeurs solides avancées (NCT01987362) ou de leucémies myéloïdes aiguës et de syndrome myélodysplasique (NCT02308761). Des études cliniques, visant à déterminer la dose d'OXT-015 à prescrire, sont menées chez des patients atteints de glioblastomes (NCT02296476), d'hémopathies malignes comme la leucémie aiguë (NCT01713582) [383], le lymphome et le myélome multiple (NCT02698189) (NCT01713582) [401] ou encore chez des patients atteints de tumeurs solides avancées telles que le cancer du sein, de la prostate résistant à la castration, de carcinome NUT midline et de cancer du poumon non à petites cellules (NCT02698176) (NCT02259114) [402]. Le CPI-0610 est évalué en clinique chez des patients atteints de myélome multiple (NCT02157636), le lymphome progressif (NCT01949883) ou encore de tumeurs malignes avancées (NCT05391022) (Tableau V). Enfin, l'efficacité clinique de l'ABV-075 est démontrée au niveau clinique, notamment chez des patients atteints de tumeurs solides avancées. Parmi 72 patients atteints de tumeurs solides, 26 (43 %) présentent une maladie stabilisée. Malgré le fait que cet inhibiteur soit efficace à de faibles concentrations (environ 10 fois inférieure à celle de l'OTX-015) et qu'il possède une sélectivité plus élevée vis-à-vis des protéines BET, il entraîne tout de même des effets toxiques [403].

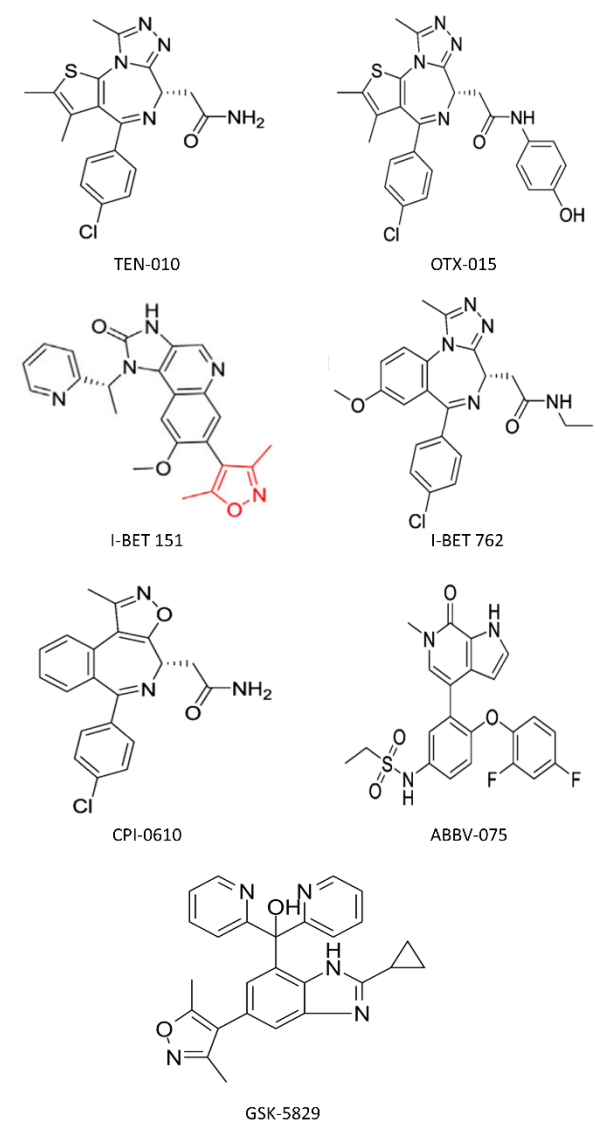


Figure 12 : Structures chimiques des inhibiteurs pan-BET. Figure adaptée des revues « Drug Discovery targeting Bromodomain-containing protein 4 – Zhiqing Liu» [404], « Bromodomains : structure, function and pharmacology of inhibition» [297] et du site internet du fournisseur MedChemExpress « <https://www.medchemexpress.com/alobresib.html> »

De nombreux autres inhibiteurs pan-BET ont été développés. Ceux pour lesquels il existe des évaluations cliniques sont cités dans le tableau V.

Les inhibiteurs bivalents

Des inhibiteurs de protéines BET, tels que MT-1, MS645, N2817 et AZD5153 ont été développés dans le but d'interagir avec les deux bromodomaines, BD1 et BD2, simultanément (Figure 13).

MT1, aussi noté (Bis-CPI203)-PEG7, est un inhibiteur bivalent de BRD4 qui est 100 fois plus puissant, dans les essais pré-cliniques, que l'antagoniste monovalent, JQ1. *In vivo*, le MT1 inhibe significativement la progression tumorale de leucémies, comparé au JQ1 [405]. D'autres inhibiteurs tels que le MS645 ou encore le N2817 inhibent la protéine BRD4 avec une puissance supérieure à celle des inhibiteurs monovalents de BET, entraînant une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, de gènes du contrôle du cycle cellulaire et de la réparation des dommages à l'ADN. Ces inhibiteurs bloquent la prolifération cellulaire de tumeurs solides, y compris un panel de cellules de cancer du sein triple négatif [406,407] ou encore de cellules de carcinome thymique, de carcinome ovarien, de carcinome pulmonaire, de cancer du sein, de cancer du colon, cancer du pancréas, d'hépatocarcinome, de cancer de la prostate ou encore de leucémie. Le N2817 inhibe également la prolifération et induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, limitant alors la croissance des xénogreffes tumorales. De plus, le N2817 a montré une grande stabilité métabolique, une demi-vie relativement longue ainsi qu'une absence de pénétration dans le cerveau après administration orale [408]. Aucune investigation clinique n'est pour le moment en cours concernant ces trois inhibiteurs.

L'inhibiteur bivalent AZD5153 est efficace à des concentrations nettement inférieures à celles de la plupart des autres BETi [409,410]. L'utilisation de AZD5153 inhibe la croissance de lignées cellulaires hématologiques, prostatiques ou encore thyroïdiennes à une concentration inférieure à 150 nM [409–411]. La plupart des lignées cellulaires hématologiques répondent au traitement à une concentration inférieure à 25 nM [409]. Cet inhibiteur montre également son efficacité dans des modèles de cancer colorectal, de foie, de rein chez l'enfant (tumeur de Wilms) [412–414]. L'inhibition de la croissance de ces lignées cellulaires est notamment due à une induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire [410,412]. En effet, les cellules traitées avec l'AZD5153 présentent une activation de marqueurs de l'apoptose comme les caspases-3 et -9 ou la protéine PARP ((poly(ADP-ribose)polymérase) et une sous-régulation des protéines régulées par BRD4 telles que c-Myc, Bcl-2 et la cycline D1 [411,412]. L'AZD5153 inhibe aussi la croissance tumorale de xénogreffes de cancer de prostate, de carcinome thyroïdien, de carcinome hépatocellulaire ou encore de cancer du rein [410,411,413,414].

Des essais cliniques sont menés notamment chez des patients atteints de lymphome non hodgkinien agressif récidivant/réfractaire (NCT03527147) ou encore des patients souffrant de

tumeurs solides récidivantes ou réfractaires, y compris des cancers ovariens, des cancers du sein, des cancers de la prostate ou encore des cancers du pancréas (NCT03205176) (tableau V). Néanmoins, l'utilisation cet inhibiteur inhibiteur rapporte des toxicités limitant la dose similaires à ceux d'OTX-015, ce qui indique que, malgré la diversité de la structure chimique des BETis, les toxicités peuvent être partagées par tous les BETis [415]. En effet, des essais cliniques ont même dû être interrompus prématurément en raison de la présence trop importante de toxicités limitant la dose. Une nouvelle étude clinique de phase I/II recrutant actuellement des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë établira une méthode de dépistage génomique ainsi qu'une évaluation de thérapies ou d'associations expérimentales, incluant l'inhibiteur AZD5153.

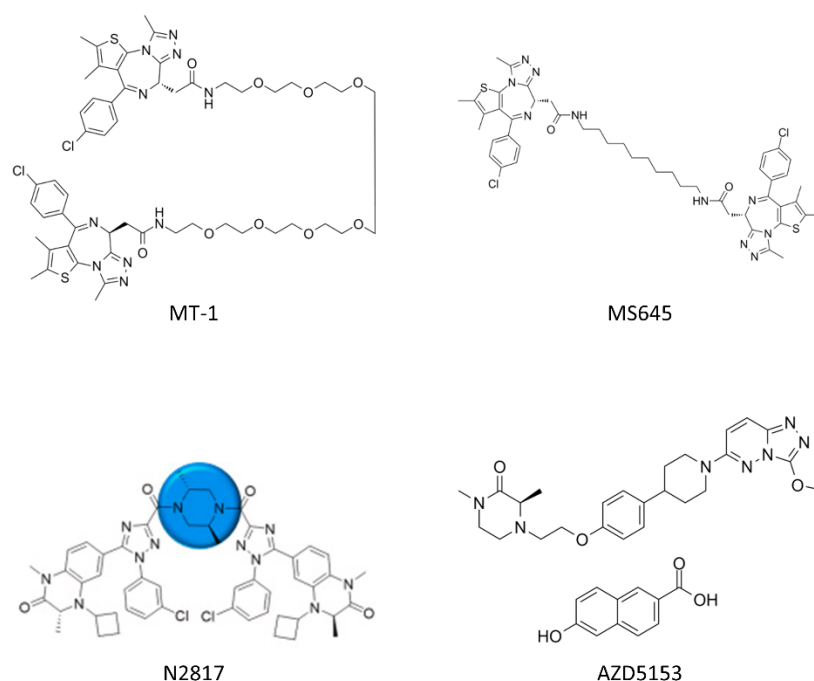


Figure 13 : Structures chimiques des inhibiteurs bivalents. Figure adaptée du site internet du fournisseur MedChemExpress «<https://www.medchemexpress.com>» et de l'article « Design and development of a novel series of oral bivalent BET inhibitors with potent anticancer activities-MenglanLuo » [407]

Les inhibiteurs spécifiques du bromodomaine et du domaine extra-terminal des protéine BET

Dans le but d'améliorer la spécificité et l'efficacité mais également de limiter les effets secondaires des inhibiteurs de protéines BET, de puissants inhibiteurs bivalents du bromodomaine (BD) et du domaine extraterminal (ET) ont été développés. Ces inhibiteurs ne sont cependant pas encore évalués en clinique.

Le GXH-II-052 (Figure 14) montre un potentiel de liaison pour BRD4-1, BRD4-2, BRD4-T, BRDT-1, BRDT-2, BRDT-T. Cet inhibiteur diminue l'expression de c-Myc et possède donc une activité anti-proliférative dans des cellules de myélome [416].

Un second puissant inhibiteur du bromodomaine et du domaine extraterminal (BET), le NC-III-49-1 (Figure 14), inhibe également le niveau de c-Myc et, par conséquent, la croissance cellulaire de cellules de myélome multiple. L'IC₅₀ obtenue avec ce nouvel inhibiteur est plus élevée que celle obtenue avec un inhibiteur homologue monovalent. L'inhibition de la croissance s'accompagne d'une diminution dose-dépendante des niveaux d'expression de c-myc causée par une inhibition de BRD4 [416].

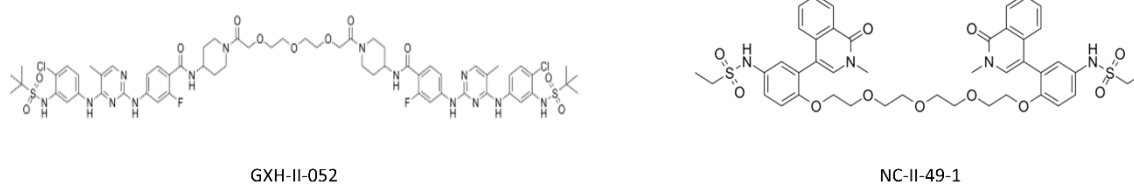


Figure 14 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine et du domaine extra-terminal des protéines BET. Figure adaptée du site internet du fournisseur MedChemExpress «<https://www.medchemexpress.com>».

Les inhibiteurs monovalents spécifiques du bromodomaine 1 des protéines BET

L'olinone, le GSK778 (Figure 15) ainsi que les molécules MS611, MS436, MS402 (Figure 15) dérivant du même composé chimique [358,417–419], sont des inhibiteurs de protéines BET monovalents spécifiques du bromodomaine 1 (BD1). L'olinone présente une affinité de liaison 100 fois plus élevée pour BD1 que pour BD2 dans toutes les protéines BET, [358,417,420]. Le GSK778, un analogue de l'I-BET 151 [421], présente une sélectivité 130 fois plus importante pour le BD1 de BRD4 par rapport au BD2. Cet inhibiteur montre un effet plus prononcé sur la croissance et la viabilité de cellules de cancer de sein et de leucémie myéloïde aiguë comparé aux effets générés dans ces mêmes cellules par un inhibiteur pan-BET, l'I-BET 151 [422]. Le GSK778 montre également de forts effets anti-cancéreux *in vivo*, prolongeant la survie de souris atteintes de leucémies myéloïdes aiguës [422,423]. Les

inhibiteurs spécifiques du bromodomaine 1 des protéines BET ne font pour le moment pas l'objet d'évaluation en clinique.

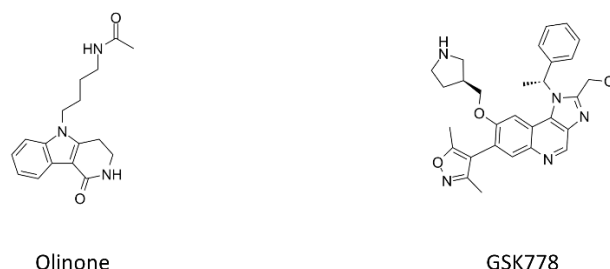


Figure 15 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine 1 des protéines BET. Figure adaptée du site internet du fournisseur MedChemExpress «<https://www.medchemexpress.com>».

Les inhibiteurs monovalents spécifiques du bromodomaine 2 des protéines BET

Les inhibiteurs de protéines BET spécifiques du bromodomaine 2 sont de plus en plus nombreux car leur potentiel thérapeutique est de plus en plus reconnu [358].

L'inhibiteur BY27 (Figure 16) se lie à BD2 avec une sélectivité de 5 à 38 fois supérieure à celle de BD1 [358,424]. Le traitement des cellules du cancer du foie humain (HepG2) avec BY27 ou OTX-015 entraîne des différences significatives dans l'expression génique. Même si BY27 inhibe de manière dose-dépendante le niveau de protéine de c-Myc et augmente le niveau de protéine de p21, ce qui est en accord avec les données obtenues pour OTX-015, plus de gènes sont sous-régulés et moins de gènes sont surrégulés en présence de BY27, par rapport à OTX-015 (393 contre 251, 158 contre 205, respectivement). De plus, le BY27 entraîne une inhibition de 67 % de la croissance tumorale d'un modèle murin de xénogreffe et est moins toxique qu'un inhibiteur pan-BET à fortes doses [424]. Les recherches concernant cet inhibiteur spécifique du bromodomaine 2 des protéines BET n'en sont pour le moment qu'au stade pré-clinique.

L' ABBV-744 (Figure 16), un inhibiteur possédant une affinité de liaison pour BD2 environ 300 fois supérieure à BD1 [358,425–427], montre son efficacité *in vitro et in vivo* dans des cellules de leucémie myéloïde aiguë et de cancer de la prostate. L'efficacité anti-tumorale de l'ABBV-744 est comparable à celle de l'inhibiteur pan-BET ABBV-075 mais présente cependant moins de toxicités plaquettaires et gastro-intestinales que l'inhibiteur ABBV-075 [427,428]. Cet inhibiteur spécifique du bromodomaine 2 est actuellement en essai clinique. En effet, deux essais cliniques de phase I incluant des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë

(NCT03360006) ou de myélofibrose évaluent l'innocuité et la pharmacocinétique de l'ABBV-744 (NCT04454658) (Tableau V).

Même si les inhibiteurs de protéines BET décrits précédemment ont montré une meilleure efficacité et de meilleures propriétés pharmacocinétiques que les inhibiteurs pan-BET, les inhibiteurs spécifiques de BD2 sont parfois moins efficaces. L'inhibiteur GSK046 (Figure 16), ayant une affinité de liaison à BD2 300 fois supérieure à celle de BD1 [358,422], est contrairement à d'autres inhibiteurs comme le GSK788 (BET BD1) ou l'I-BET 151 (pan-BET), moins efficace. En effet, l'inhibiteur spécifique de BD2 ne montre pas d'avantage de survie dans le modèle de leucémie myéloïde aiguë agressive MLL-AF9 contrairement au GSK778 [422].

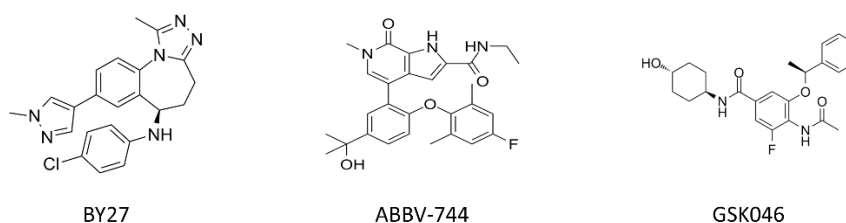


Figure 16 : Structures chimiques des inhibiteurs spécifiques du bromodomaine 2 des protéines BD2. Figure adaptée du site internet du fournisseur MedChemExpress «<https://www.medchemexpress.com>».

L'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs monovalents, se liant de manière spécifique à l'un des bromodomaines (BD1 et BD2) des protéines BET est controversée [408]. Les inhibiteurs ciblant les deux bromodomaines (BD1 et BD2) des protéines BET montrent une activité clinique modeste dans les essais de monothérapie contre le cancer. De plus, des effets indésirables comme une thrombocytopénie ainsi que des symptômes de toxicité gastro-intestinale apparaissent après traitement avec ces inhibiteurs de protéine BET [401,403,429–431].

Les dégradeurs PROTAC (proteolytic targeting chimera)

Les molécules inhibitrices, PROTAC, limitent la fixation des protéines BET des lysines acétylées, mais permettent aussi leur ubiquitination et leur dégradation. En effet, ces molécules sont liées via un lien flexible à un module de reconnaissance de l'ubiquitine ligase. Une fois que la protéine BET interagit avec la molécule PROTAC, le complexe PROTAC-protéine BET est mis en contact avec la machinerie de dégradation des protéines et la protéine BET est dégradée. Cette nouvelle approche présente des avantages comme la dégradation très efficace

des protéines, l'utilisation de n'importe quel site de liaison ou d'interaction même transitoire avec la protéine, la réutilisation de la molécule inhibitrice par la cellule afin de réaliser plusieurs cycles de dégradation de la protéine cible, la possibilité d'affecter la localisation subcellulaire et la régulation transcriptionnelle de la protéine cible, l'utilisation de doses sensiblement plus faibles de la molécule nécessaires pour obtenir un effet pharmacologique ou encore le retardement voir l'impossibilité d'apparition de résistance par l'inhibition plus prononcée de la protéine BET [432,433]. Leur efficacité *in vitro* et *in vivo* de certains de ces PROTAC est démontrée dans diverses cellules cancéreuses et dans un modèle animal de cancer de la prostate [432]. Néanmoins, les recherches concernant ces molécules inhibitrices n'en sont qu'au stade pré-clinique car leur potentiel thérapeutique est encore inconnu [358]. De plus, avant que ces molécules n'entrent en phase clinique, certains critères doivent être améliorés. En effet, la taille considérable de ces inhibiteurs pose problème quant à l'absorption et aux modifications métaboliques. De plus, le dégradeur doit être adapté à chaque molécule. Des différences dans la capacité de dégradation d'un PROTAC sont observées et pourraient être expliquées par la flexibilité différente des molécules. Pour la protéine BRD4, seul le complexe contenant Van Hippel Lindau et le complexe ubiquitine ligase E3 de Cereblon sont utilisés comme dégradeurs [432]. De nombreuses études montrent que les PROTAC constituent une nouvelle génération de médicaments dont l'efficacité thérapeutique est augmentée par rapport aux inhibiteurs BET classiques [434]. En effet, les inhibiteurs de type PROTAC, présentent, de manière générale des IC50 plus faibles que des molécules inhibitrices telles que JQ1 ou OTX-015[435].

De manière générale, la dégradation de la protéines BRD4 par les PROTAC diminue plus efficacement les niveaux de l'oncogène c-MYC, induisant l'apoptose des cellules tumorales et inhibant aussi la prolifération cellulaire, la migration ainsi que la capacité clonogénique des cellules tumorales. De nombreuses études ont démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de différents PROTAC tels que l'ARV-825, l'ARV-771 (possédant des propriétés pharmacologiques supérieures à celles de l'ARV-825 [436]), l'A1874 ou encore le MZ1 (Figure 23). *In vitro*, les PROTAC ARV-825 [434,435,437,437–440], ARV-711 [436] ou encore MZ1 [441] sont efficaces dans des hémopathies malignes comme le lymphome de Burkitt, la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T ou encore d'autres lymphomes. Le traitement des xénogreffes de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T avec l'ARV-825 réduit significativement la croissance tumorale [446].

Les PROTAC montrent également leur efficacité, *in vitro*, dans de nombreux cancers solides. L'ARV-825 inhibe la viabilité cellulaire dans des lignées de neuroblastome, de cancer

du sein, de cancer gastrique, de carcinome pulmonaire, de carcinome thyroïdien ou encore le cholangiocarcinome [442,443]. L'ARV-771 diminue considérablement l'expression des protéines BET dans des cellules de cancer de la prostate, entraînant une suppression de l'expression des récepteurs aux androgènes et de la signalisation en aval. Cela inhibe plus efficacement de la croissance tumorale ainsi que du taux de PSA (antigène spécifique de la prostate) [454]. Ce même inhibiteur montre aussi son efficacité anti-tumorale au sein de lignées de carcinome hépatocellulaire [455]. Dans les cellules primaires et établies du cancer du côlon, le traitement des cellules avec l'A1874 stabilise la protéine p53 et produit des espèces réactives de l'oxygène [456]. Un autre dégradeur, le MZ1, montre un effet anti-prolifératif dans des cellules de cancer du sein triple négatif [448] et de neuroblastome [457]. L'efficacité anti-tumorale de ces PROTAC est également retrouvée *in vivo* dans des lignées de tumeurs solides. L'ARV-711, l'A1874, le MZ1 et l'ARV-825 inhibent la progression tumorale dans des modèles murins de carcinome hépatocellulaire [455], cancer du côlon [456] ou encore de neuroblastome [444,445].

Une deuxième génération de dégradeurs de protéine BET, présentant une sélectivité ainsi qu'une activité anti-tumorale supérieure aux premiers dégradeurs, a été développée [446]. L'inhibiteur BET-d246 montre une activité anti-tumorale dans des cellules de cancer du sein triple négatif, cancer manquant de thérapie ciblée efficace (Figure 17). Le traitement avec le BET-d246 a induit la dégradation des protéines BET entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose. De plus cet inhibiteur, ainsi que son analogue, le BET-d260, inhibent efficacement les protéines BET dans des modèles murins de xénogreffes de tumeurs cancéreuses du sein [446] (Figure 17). Le BET-d260 possède aussi une efficacité anti-tumorale dans différents modèles tumoraux comme le carcinome hépatocellulaire [447] mais aussi l'ostéosarcome [448]. Le BETd-260, inhibe également la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de carcinome hépatocellulaire ou d'ostéosarcome dérivées de cellules de patients. Dans le modèle d'ostéosarcome, l'activité de BETd-260 était 1000 fois plus importante que celle de l'inhibiteur JQ1.

Ces molécules capables d'inhiber et de dégrader les protéines BET sont toujours en développement [444].

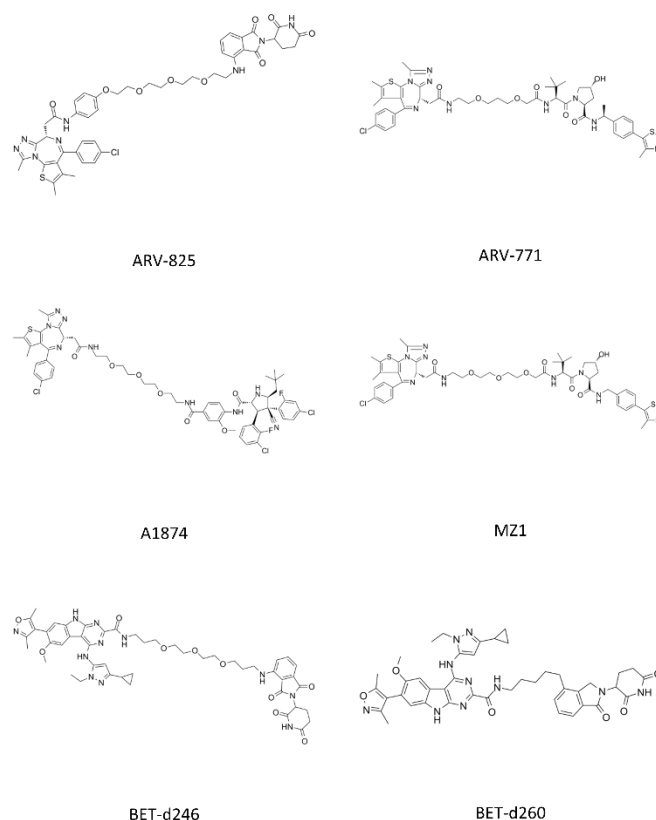


Figure 17 : Structures chimiques des dégradeurs PROTAC (Proteolytic Targeting Chimera). Figure adaptée du site internet du fournisseur MedChemExpress «<https://www.medchemexpress.com>».

Tableau V : Essais cliniques menés avec des inhibiteurs de protéines BET.

Type d'inhibiteur	Nom de l'inhibiteur	Phase	Combinaison	Pathologies	Référence
Pan-BET	ABBV-075/Mivebresib	I	venetoclax	Tumeurs solides récidivantes ou réfractaires	NCT02391480
		I	Ruxolitinib Navitoclax	myélofibrose	NCT04480086
	BAY1238097	I	x	tumeurs solides lymphomes	NCT02369029
	BI894999	I	x	tumeurs solides malignes avancées lymphomes diffus à grandes cellules B	NCT02516553
	BMS-986158	I/II	x	cancer pédiatrique	NCT03936465
		I/II	x	Cancers avancés	NCT02419417
		I/II	ruxolitinib	myélofibrose	NCT04817007
		I/II	tazemetostat trametinib dexaméthasone	myélome multiple récidivant ou réfractaire	NCT05372354
	CC-90010/Trotabresib	I	x	tumeurs solides avancées lymphomes non hodgkiniens récidivants ou réfractaires	NCT03220347
		I	x	astrocytome diffus	NCT0404730

				astrocytome anaplasique glioblastome progressifs/récurrents	
		I	x	cancer pédiatrique	NCT03936465
		I	cisplatine étoposide	cancer du poumon à petites cellules de première ligne et de stade avancé	NCT03850067
		I	témozolomide	glioblastome	NCT04324840
	CPI-0610/pelabresib	I	x	myélome multiple	NCT02157636
		I	x	lymphome progressif	NCT01949883
		I	x	Tumeurs malignes avancées	NCT05391022
		I/II	pelabresib ruxolitinib	myélofibrose	NCT04603495
		III	ruxolitinib	myélofibrose	NCT02158858
	FT-1101/CC-95775	I	x	hémopathies malignes récidivantes ou réfractaires	NCT02543879
		I	x	tumeurs solides avancées lymphomes non hodgkiniens récidivants ou réfractaires	NCT04089527
	GS-5829	I/II	fulvestrant exémestane	Cancer du sein avancé ER+/HER2-	NCT02983604
		I/II	enzalutamide	cancer de la prostate métastatique résistant à la castration	NCT02607228
		I	fulvestrant	tumeurs solides lymphomes avancés	NCT02392611
	I-BET 762/ GSK525762	I	x	Hémopathies malignes réfractaire ou récurrentes	NCT01943851
		II	x	carcinome NUT	NCT01587703
		I	fluvestrant	cancer du sein	NCT02964507
		I	abiraterone enzalutamide prednisone	cancer de la prostate	NCT03150056
	INCB054329	I/II	x	tumeurs solides hémopathies malignes	NCT02431260
	INCB057643	I	ruxolitinib	myélofibrose autres néoplasmes myéloïdes avancés	NCT04279847
		I/II	azacitidine pembrolizumab epacadostat INCB057643 INCB059872	Tumeurs solides avancées Cancers métastatiques	NCT02959437
		I/II	paclitaxel rucaparib abiraterone ruxolitinib azacitidine	tumeurs malignes avancées	NCT02711137
	ODM-207/BET-IN-4	I/II	x	tumeurs solides avancées	NCT03035591
	OTX-015/MK- 8626/Bilabresib	I	x	hémopathies malignes	NCT01713582
		I	x	leucémies myéloïdes (de novo ou secondaires) lymphomes diffus à grandes cellules	NCT02698189

		I	x	tumeurs solides avancées	NCT02698176
		I	x	tumeurs solides avancées	NCT02259114
		II	x	glioblastome multiforme récurrent	NCT02296476
	PLX51107	I	x	tumeurs malignes avancées	NCT02683395
		I/II	x	leucémie myéloïde aiguë syndrome myélodysplasique	NCT04022785
	TEN-010 – RO6870810	I	x	Tumeurs solides avancées	NCT01987362
		I	x	Leucémie myéloïde aiguë Syndrome myélodysplasique	NCT02308761
		I	venetoclax rituximab	Lymphomes à cellules B	NCT03255096
		I	atezolizumab	Cancer ovarien avancé Cancer du sein triple négatif	NCT03292172
		I	daratumumab	Myélome multiple avancé	NCT03068351
BETi bivalent	AZD5153	I	x	tumeurs solides récidivantes ou réfractaires	NCT03205176
		I	x	lymphome non hodgkinien (LNH) agressif récidivant/réfractaire	NCT03527147
		I/II	x	leucémie myéloïde aiguë	NCT03013998
		I/II	sélumétinib durvalumab	sarcomes réfractaires/non résécables	NCT05253131
BETi spécifique de BD2	ABBV-744	I	ruxolitinib navitoclax	myélofibrose	NCT04454658
		I	X	leucémie myéloïde aiguë	NCT03360006

Bien que les résultats de la plupart des études cliniques ne soient que préliminaires, les résultats des premiers essais cliniques confirment le potentiel anti-tumoral des inhibiteurs de BET. Mais ils montrent également une activité/efficacité limitée lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie. Des effets indésirables ont également été observés et peuvent limiter l'utilisation de ce traitement [302] .

5. Résistance aux inhibiteurs de protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal

L'inhibition pharmacologique des protéines BET via des molécules inhibitrices, telles que JQ1, montre des activités antinéoplasiques dans le traitement de cancers hématologiques [300,373,449] et de cancers solides humains [423,450] en inhibant l'expression de voies oncogéniques, comme c-MYC [300], YAP [356], NOTCH3 [357] ou encore RUNX2 [331]. L'efficacité des inhibiteurs de protéines BET ainsi que l'apport de réponse thérapeutique durable peuvent être limités par la mise en place de mécanismes de résistance [451–453].

Afin d'améliorer la thérapie ciblant les protéines BET, les mécanismes potentiellement responsables de la résistance aux BETi sont à l'étude dans de nombreux types de cancers, comme le carcinome hépatocellulaire [442], le cancer colorectal [443,454], le cancer du pancréas [452], du poumon [455], de la prostate [456,457], du sein [445], de l'ovaire [458,459] ou encore des leucémies [451,453,460,461]. Ces études entreprises, pour le moment sur la résistance acquise aux BETi, ont principalement utilisé les inhibiteurs JQ1 et I-BET 762 [462]. Les différents mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET varient selon les types de cancer. Certains mécanismes permettent de retrouver une fonctionnalité des protéines BET. D'autres mécanismes de résistance compensent la suppression de MYC, réactivant ainsi son expression [443]. Enfin, l'activation de voies de signalisation alternatives ou de processus biologiques entraîne l'émergence de mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET.

a) Hyperphosphorylation et stabilisation des protéines BET

Des cancers comme l'adénocarcinome de poumon [455], le cancer du sein triple négatif [445] ou encore le cancer colorectal [463], présentent une hyperphosphorylation de BRD4 entraînant le développement d'une résistance acquise aux BETi tels que JQ1.

La phosphorylation de BRD4 par la protéine CK2 (protéine caseine kinase-2) ne perturbe pas sa liaison avec les BETi, mais provoque un changement dans les interactions protéiques pouvant expliquer l'émergence de résistance aux inhibiteurs de protéines BET [464]. En effet, dans le cancer du sein triple négatif, il est démontré que la protéine BRD4 phosphorylée se lie plus efficacement à MED1. Le complexe pBRD4-MED1, en se liant indépendamment du bromodomaine aux lysines-acétylées des histones, active l'initiation de la transcription et réactive ainsi l'expression de MYC, et ce même en présence de l'inhibiteur JQ1. Ce phénomène entraîne donc une résistance aux inhibiteurs de protéines BET. Néanmoins, malgré des cibles communes, le complexe pBRD4-MED1 se fixe sur des régions différentes de celles de BRD4 non phosphorylée. Cette fixation est susceptible de provoquer l'activation transcriptionnelle de gènes différents, notamment des gènes qui étaient transcriptionnellement silencieux dans les cellules sensibles au JQ1.

Dans le cancer de la prostate, la phosphorylation de BRD4 au niveau de la tyrosine 97/98 est médiée par les fibroblastes associés au cancer (CAF). En effet, les CAF activent la

signalisation stromale interleukines-6/8-JAK2. Les interleukines 6 et 8 sont des cytokines pro-inflammatoires induisant l'expression de la protéine BRD4. La protéine JAK2 (Janus kinase 2), phosphoryle la protéine BRD4. Dans ces lignées de cancer colorectal, la protéine BRD4 phosphorylée présente une capacité de liaison accrue à la chromatine mais réduite aux inhibiteurs de protéines BET, induisant alors une résistance à ces composés. La protéine BRD4 phosphorylée interagit avec la protéine UCHL3 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3), qui est une déubiquitinase, entraînant l'accumulation et la stabilisation de la protéine BRD4 [463].

La surexpression et l'accumulation de protéines BET est également un des mécanismes à l'origine de l'apparition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans des lignées cellulaires et d'échantillons de patients de cancer de la prostate. L'accumulation des protéines BET s'explique par une réduction de leur dégradation protéasomique due à une mutation de la protéine SPOP (POZ de type speckle). La protéine SPOP, un adaptateur de liaison au substrat de l'ubiquitine ligase E3, de type sauvage se lie aux protéines BET (BRD2, BRD3 et BRD4) et induit leur ubiquitination et leur dégradation protéasomique. Dans le cancer de la prostate, cette protéine est fréquemment mutée. Ces protéines mutées ont une liaison déficiente aux protéines BET, réduisant la dégradation protéasomique des protéines BET. Ainsi, les lignées cellulaires et les organoïdes du cancer de la prostate dérivés d'individus porteurs de mutations SPOP sont plus résistants à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose en réponse aux inhibiteurs de BET [456,465].

Aucun mécanisme de résistance aux inhibiteurs de protéines BET décrit jusqu'à présent ne montre la présence d'une mutation sur les protéines BET, entraînant sa surexpression et son accumulation [317].

b) Reprogrammation adaptative du kinome

Grâce à un processus connu sous le nom de « reprogrammation adaptative du kinome », qui se caractérise par des modifications importantes des réseaux de signalisation des kinases, les cellules tumorales peuvent acquérir une résistance aux traitements. Cela a par exemple été montré dans la résistance aux inhibiteurs de kinases [466–470]. Après le traitement avec un de ces inhibiteurs, les cellules tumorales envoient des signaux, provoquant l'activation des voies de survie régulées par les protéines kinases. Ces protéines contournent alors l'action de l'inhibiteur permettant aux cellules tumorales d'échapper aux thérapies ciblées. Ce mécanisme

de résistance est montré dans le cancer ovarien résistant au JQ1. En effet, après un traitement prolongé avec le JQ1, les cellules de cancer ovarien ont acquis une résistance, médiée par une reprogrammation du kinome. Dans ces cellules l'activation de réseaux de kinases compensatoires pro-survie surmontent l'inhibition de la protéine BET. Les cellules résistantes au JQ1 montrent une activation des récepteurs à tyrosine kinase ainsi qu'une activation des voies de signalisation en aval telles que les voies MAPK ou PI3K/Akt/mTOR. La combinaison d'inhibiteurs ciblant les récepteurs à tyrosine kinase ou les voies de signalisation activées avec des inhibiteurs de protéines BET peut prévenir ou retarder la résistance des cellules. En effet, dans les cellules résistantes au JQ1, l'inhibition de certains récepteurs à tyrosine kinase tels que le FGFR ou l'EGFR avec de l'AZD4547 ou du lapatinib, respectivement, diminue l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt/mTOR, entraînant une diminution de la capacité clonogénique des cellules [458]. Ainsi, les inhibiteurs de protéines BET peuvent avoir une efficacité limitée en tant qu'agents uniques dans certains cancers ovariens en raison de la reprogrammation adaptative du kinome. Néanmoins, des stratégies de combinaison impliquant des inhibiteurs ciblant les kinases et les protéines bromodomaines BET pourraient maximiser le bénéfice clinique.

c) Suractivation de voies de signalisation

Les voies de signalisation sont très fréquemment impliquées dans les mécanismes de résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Les études *in vitro* réalisées jusqu'à aujourd'hui montrent que certaines voies telles que les voies YAP, WNT, PI3K/AKT-mTOR ou encore MAPK pourraient jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET.

La voie de Hedgehog :

La voie de signalisation Hedgehog (HH) joue un rôle dans le développement embryonnaire mais aussi dans la tumorigenèse. La voie de signalisation HH régule la croissance et la différenciation des cellules normales. Cette voie est réactivée dans plusieurs cancers, notamment le médulloblastome, le rhabdomyosarcome, le carcinome basocellulaire, le glioblastome, le cancer du poumon, du côlon, de l'estomac, du pancréas, de l'ovaire et du sein [471]. La dérégulation de la voie de signalisation HH induit la tumorigenèse et favorise les phénotypes agressifs du cancer humain tels que la transformation néoplasique, la croissance

tumorale, les métastases et la résistance aux traitements [471,472]. Les protéines HH sont des glycoprotéines sécrétées qui se lient au récepteur transmembranaire homologue de Patched (PTCH). En l'absence de HH, le PTCH interagit avec la protéine transmembranaire inactive SMO (smoothed). La fixation de HH libère SMO et permet à une série d'événements moléculaires de se produire telle que la translocation nucléaire du facteur de transcription GLI (zinc finger protein). Ces facteurs induisent l'expression de gènes cibles tels que Ptch1, Gli1, des membres de la famille Wnt, ainsi que des gènes impliqués dans la croissance et la division cellulaire [473].

Les cellules cancéreuses pancréatiques développent une résistance aux inhibiteurs de BET via une sur-régulation de la protéine GLI2, intervenant dans la cancérogenèse et régulant la voie de Hedgehog. Les cellules résistantes à JQ1 restent dépendantes à l'expression de c-MYC qui est co-régulé par des niveaux élevés de GLI2. L'inhibition de GLI2 resensibilise significativement les cellules résistantes à JQ1, en diminuant l'expression de MYC [452].

La voie de signalisation des androgènes :

D'un point de vue physiologique, le développement, la croissance et la fonction de la prostate reposent sur la voie de signalisation des androgènes [474]. Dans cette voie, des ligands tels que la testostérone et le dihydrotestostérone se lient au récepteur des androgènes, déclenchant la translocation du complexe ligand-récepteur vers le noyau. Ce même complexe se fixe ensuite sur des séquences d'ADN spécifiques et active la transcription de gènes cibles [475].

Les analyses transcriptomiques de cellules de cancer de prostate résistantes à la castration et aux BETi, montrent une réactivation de la signalisation des androgènes, sur laquelle repose le développement et la croissance tumorale. La réactivation de cette voie est due à la phosphorylation du récepteur des androgènes par la protéine CDK9. L'inhibition des récepteurs aux androgènes, à l'aide d'enzalutamide, sensibilise les cellules tumorales résistantes aux inhibiteurs de protéines BET [457].

La voie de signalisation NF- κ B :

D'autres voies de signalisation comme la voie NF- κ B semble être impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de protéines BET. Cette voie de signalisation participe à l'inflammation, la réponse immunitaire, la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Figure 18).

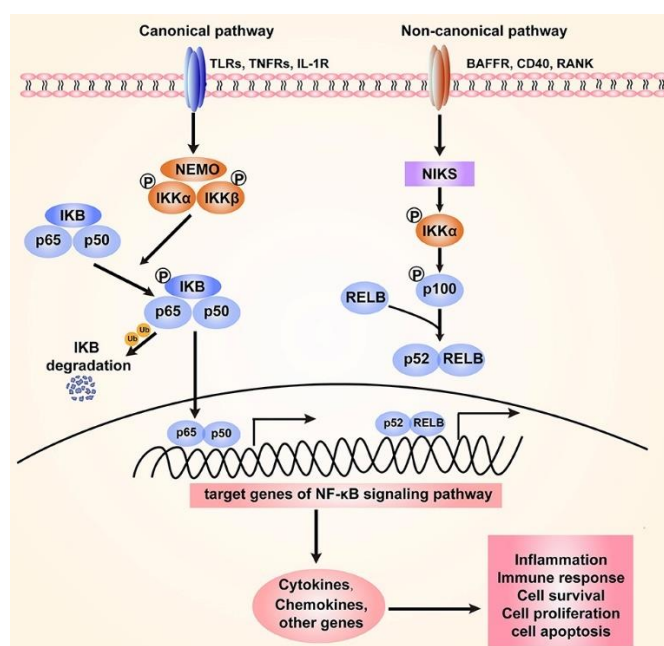


Figure 18 : Voie de signalisation Nf-κB. L'activation des récepteurs TLR, TNFR, IL-1R induit l'activation de la voie canonique. Après activation de ces récepteurs, la protéine inhibitrice IκB est phosphorylée et dégradée. La dégradation de IκB active NF-κB, qui est transloquée dans le noyau. L'activation des récepteurs BAFFR, CD40 et RANK permettent l'activation de la voie non canonique. Après activation de ces récepteurs, la protéine NIK est phosphorylée et phosphoryle à son tour IKKα. L'activation de IKKα permet la phosphorylation de P100, entraînant la formation et l'activation de l'hétérodimère p52-RelB. p52-RelB est ensuite transloqué au noyau. Dans les deux cas, la translocation de NF-κB ou de p52/RelB dans le noyau permet la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire, la survie et la prolifération cellulaire ou encore dans l'apoptose. Figure provenant de la revue « The NF-κB Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis : Recent Advances – Chao Peng » [476].

TLR : Toll-like receptors ; TNFR : Tumor necrosis factor receptors; IL-1R : Interleukin-1 receptor; NEMO: NF-κB Essential Modulator; IKK: IkappaB kinase; BAFFR: B-cell activating factor receptor; CD40: cluster of differentiation 40; RANK: Receptor activator of nuclear factor κ B; NIKS: NF-κB-inducing kinase.

Dans des cellules de mélanome uvéal résistantes à l'inhibiteur BET, PLX51107, l'expression des gènes impliqués dans la signalisation NF-κB, tels que REL, RELB, CEBPD ou encore SOD2, augmente. Le parthenolide, un inhibiteur de la signalisation NF-κB, inhibe la phosphorylation de la sous-unité p65 de la protéine NF-κB. De plus, la combinaison de PLX51107 avec le parthenolide, inhibe l'expression de la sous-unité p50 de NF-κB, induit l'inhibiteur IκBα du NF-κB et augmente le clivage PARP. La combinaison de traitement induit donc plus efficacement l'apoptose par rapport aux agents uniques. *In vivo*, l'association du PLX51107 avec le PTL inhibe de manière significative la croissance tumorale de manière dose-dépendante par rapport au PLX51107 en monothérapie [477]. Dans des cellules parentales de

cancer colorectal, l'activation de NF- κ B par le ciblage de l'inhibiteur I κ B α via un siRNA induit une résistance à JQ1. Ainsi, l'activation de la voie NF- κ B est impliquée dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET. L'efficacité des traitements combinés a été testée dans des modèles de lignées cellulaires et de xénogreffes dérivées de patients (PDX). Dans des cellules cancéreuses colorectales, le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, sensibilise de manière synergique les cellules résistantes aux BETi au traitement par JQ1. En effet, la combinaison du JQ1 avec le bortezomib, induit un arrêt du cycle en G2/M. Le bortezomib phosphoryle Bcl-2 et des produits de clivage qui conduisent également à l'arrêt du cycle en G2/M et à l'apoptose. L'inhibition de NF- κ B par le bortezomib sensibilise les cellules résistantes à JQ1 en diminuant l'expression de c-myc, GADD45s puis de FOXM1 qui à son tour inhibe l'expression des gènes du point de contrôle G2/M. Enfin, la combinaison du JQ1 avec le bortezomib inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse dans le modèle de xénogreffe de lignées cellulaires de cancer colorectal ainsi que dans des modèles PDX (xénogreffe dérivée de la tumeur du patient) [454,478]. Des cellules de lymphome résistantes à l'inhibiteur de BET, I-BET 151, présentant une surexpression de BRD2 et BRD4, présentent également une activation de la voie de signalisation NF- κ B, avec une surexpression de la protéine nucléaire NF- κ Bp65. L'inhibition de IKK VII sensibilise les cellules tumorales à l'I-BET 151. De plus, l'inhibition de IKK VII a eu un effet synergique sur l'activité anti-tumorale de l'I-BET 151 [479]. Ainsi la combinaison des inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs du protéasome pourraient limiter l'activation de la voie NF- κ B et améliorer l'efficacité de l'inhibition de BET chez les patients atteints de cancer.

La voie de signalisation Hippo :

La voie hippo est une voie de signalisation qui régule de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la mobilité, la différenciation, la survie cellulaire mais aussi l'apoptose. Cette voie de signalisation consiste en une cascade de kinases comprenant les protéines TAO1/2/3 (TAO kinases), MST1/2 et LATS1/2, qui phosphorylent les co-activateurs de la transcription YAP (Yes-associated protein) et TAZ (Tafazzin). YAP/TAZ phosphorylé est séquestré dans le cytoplasme, limitant ainsi sa fonction transcriptionnelle co-activatrice. A l'inverse, lorsque la voie Hippo est inactive, YAP/TAZ est transloqué au noyau et joue son rôle de co-activateur de la transcription [480,481].

Dans des cellules de cancer du poumon, la voie Hippo joue un rôle central dans la médiation de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET [482]. En effet, trois gènes de la voie Hippo, LATS2, TAO1 et NF2, sont des acteurs clés de la sensibilité aux BETi, puisque

leur knock-out induit une résistance au BETi, en favorisant la localisation nucléaire et l'activité transcriptionnelle de TAZ. Inversement, l'expression de TAZ favorise la résistance à ces médicaments [482]. De plus, dans les cellules d'adénocarcinome de poumon, l'activation de YAP1 fait de la voie Hippo la deuxième voie la plus enrichie associée à la résistance au JQ1. L'activation de YAP, dans ces cellules est due à AXL, surrégulé par pBRD4. Cela signifie que AXL est une potentielle cible transcriptionnelle en aval de BRD4 phosphorylé permettant de contourner les effets du JQ1. Ainsi, dans le but de contre-carrer la résistance au JQ1 dans ces cellules, la voie de signalisation Hippo ou les acteurs activant cette voie tels que AXL, pourraient être ciblés [455].

La voie de signalisation WNT :

D'autres mécanismes de résistance comprennent une régulation compensatoire de MYC par la voie de signalisation Wnt [317]. La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la polarisation et la différenciation cellulaire [131].

Dans un modèle murin de leucémie myéloïde aiguë résistant à I-BET 762, le traitement avec l'inhibiteur de protéines BET diminue l'expression des protéines BET, telles que BRD4. Cette diminution devrait inhiber l'expression de MYC ; néanmoins, celle-ci reste inchangée. Dans ces cellules, un programme transcriptionnel compensatoire se met en place suite au traitement avec l'I-BET 762, induisant une résistance aux inhibiteurs de protéines BET. Dans ce modèle, la résistance émerge d'une sous-population de cellules souches leucémiques présentant une amplification de la signalisation Wnt/ β -caténine. En effet, l'inhibition de la signalisation Wnt/ β -caténine sensibilise les cellules tumorales à l'I-BET 762, alors que la stimulation de cette voie dans les cellules sensibles entraîne une résistance à l'I-BET 762. Dans les cellules naïves, la protéine BRD4 se lie aux éléments cis-régulateurs de MYC. En revanche, dans les cellules résistantes à l'I-BET 762, la liaison de BRD4 diminue alors que celle de la β -caténine augmente, expliquant l'expression soutenue de Myc sous traitement à l'I-BET 762. En outre, la sensibilité de différents échantillons humains de leucémie myéloïde aiguë à l'I-BET 762 est inversement proportionnelle à l'expression des gènes cibles de Wnt/ β -caténine. Cela confirme que les effets des BETi sont inhibés par l'augmentation de la signalisation Wnt/ β -caténine [297,451]. Une analyse transcriptomique des cellules leucémiques sensibles et résistantes au JQ1 révèle également que l'altération la plus significative est une surrégulation des gènes associés à la signalisation Wnt [297,453].

La voie de signalisation PI3K/AKT/ mTOR :

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR joue un rôle majeur dans la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire, de la croissance, de la survie, de la migration ou encore de l'angiogenèse [483].

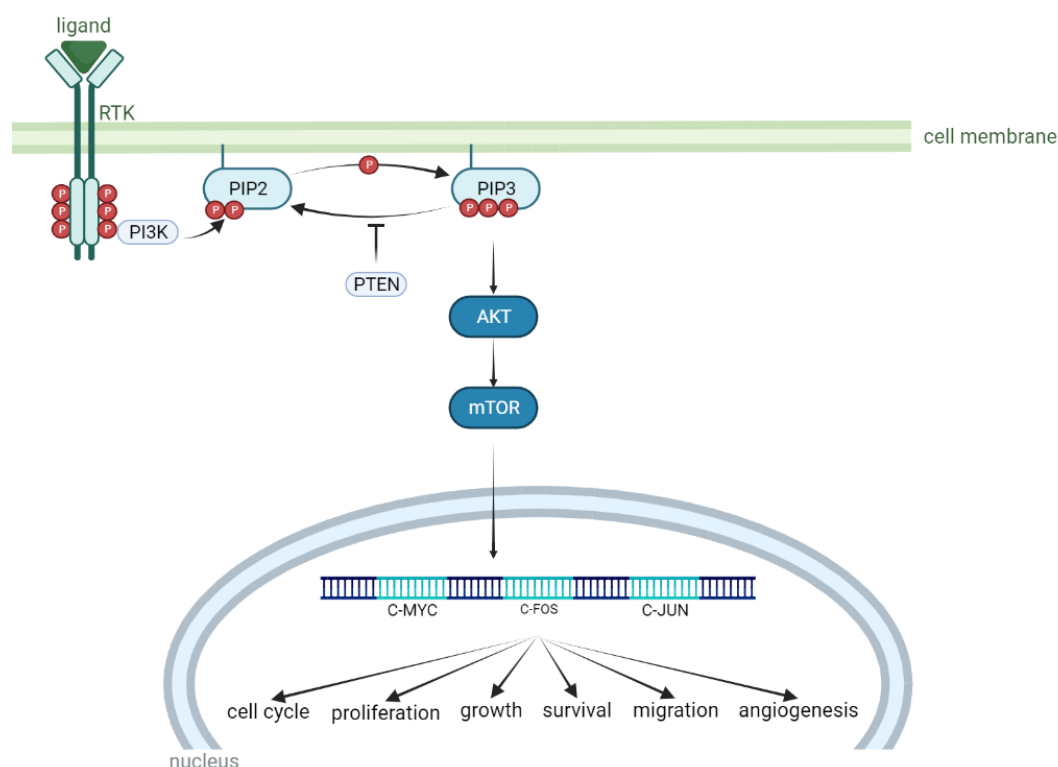


Figure 19 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. La voie PI3K est activée lorsque des ligands tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones se lient aux récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Cela entraîne l'activation de la PI3K qui catalyse la phosphorylation de la PIP2 pour produire la PIP3. PIP3 active AKT qui déclenche par la suite l'activation de mTOR, entraînant la modulation de la transcription des gènes liés au cycle cellulaire, à la prolifération, à la croissance, à la survie, à la migration ou encore à l'angiogenèse.

RTK : receptor tyrosine kinase ; PI3K phosphatidylinositol-3-kinase ; PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5triphosphate ; PTEN : phosphatase and tensin homolog ; mTOR :mammalian target of rapamycine.

Différentes études mettent en évidence le rôle de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET. En effet, dans le cancer de la prostate, la résistance aux BETi est due à l'augmentation de la signalisation PI3K/Akt/mTOR [456]. Comme évoqué précédemment, la mutation de SPOP dans le cancer de la prostate amplifie l'expression et la stabilisation de la protéine BRD4. Après l'analyse du transcriptome et du cistrome de ces cellules, l'activation de la signalisation AKT-mTORC1 est

révélée comme étant une conséquence de la stabilisation de BRD4 [456]. Dans des lignées de cancer de la prostate, l'inhibition pharmacologique, avec du MK-2206 ou la déplétion génétique d'Akt inhibe BRD4, sensibilisant les cellules à la cytotoxicité induite par l'AZD5153 [410]. Le criblage CRISPR/Cas9 dans un modèle de neuroblastome révèle que l'activation de PI3K confère une résistance au BETi [484]. L'activation constitutive d'Akt protège de manière significative les cellules de sarcome d'Ewing contre les inhibiteurs de BET, ce qui suggère que la suractivation de la voie PI3K/Akt/mTOR est à l'origine du manque de sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BET [485]. L'inhibition des protéines appartenant à cette voie de signalisation pourrait resensibiliser les cellules aux inhibiteurs de BET. Dans des cellules d'adénocarcinome du poumon, l'utilisation d'un inhibiteur de PI3K, le BEZ-235 aussi connu sous le nom de dactolisib réduit la viabilité des cellules résistantes au JQ1 comparativement aux cellules sensibles [455].

La voie de signalisation MAPK :

La voie RAS/MAPK est impliquée dans la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaire [486].

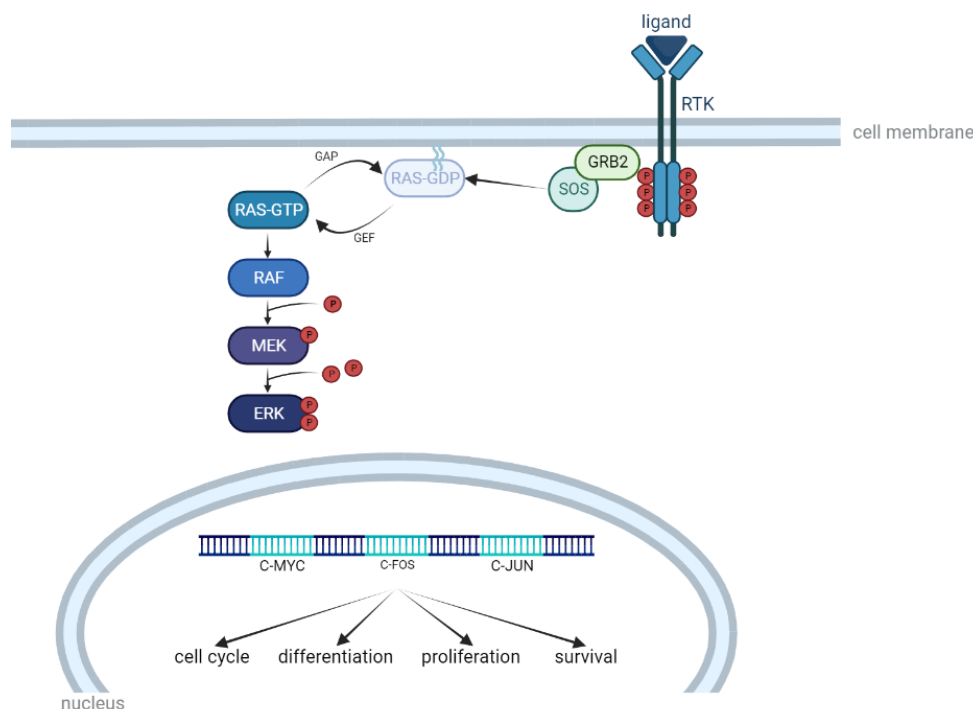


Figure 20 : Voie de signalisation MAPK. La voie MAPK est activée par des stimuli extracellulaires. Une fois qu'un ligand s'est fixé au récepteur à tyrosine kinase (RTK), les protéines GRB2 reconnaissent les résidus phosphorylés ainsi que le facteur d'échange de guanine nucléotide SOS et se lie au récepteur. La GTPase Ras échange le GDP contre le GTP qui se lie à Ras pour le rendre actif. Ras active Raf qui peut

phosphoryler et activer MEK qui à son tour active ERK. ERK régule un certain nombre de facteurs de transcription, notamment *c-myc*, *C-fos*, et *c-jun*. Ces facteurs régulent l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération ou encore la survie.

RTK: receptor tyrosine kinase; GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2; SOS: son of sevenless; GDP: Guanosine-5'-diphosphate; GTP: Guanosine-5'-triphosphate; GAP: GTPase-activating protein; GEF: guanine nucleotide exchange factor.

La voie de signalisation MAPK est impliquée dans les phénomènes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans le cancer [423]. En effet, des études montrent que les inhibiteurs de protéines BET induisent une ré-activation de la signalisation MAPK. Dans le cancer ovarien, le traitement via des inhibiteurs de protéines BET tels que le JQ1 ou l'I-BET151 active la voie de signalisation MAPK. Suite à un traitement avec des BETi, l'expression des gènes EGFR1 et FOS, ainsi que la phosphorylation des protéines ERK et MEK augmente. A l'inverse, l'expression des régulateurs négatifs de la cascade de signalisation MAPK tels que *sprouty1*, *spread2* ou encore les protéines DUSP de la phosphatase ERK diminue [459]. Des mutations activatrices des protéines KRAS, NRAS, BRAF ou une amplification du récepteur à l'EGF (EGFR) suractivent la voie MAPK dans la majorité des cancers colorectaux [443,487]. L'activation de la voie MAPK diminue la sensibilité des cellules de carcinome hépatocellulaire à l'ARV-771 [488] et affecte également la sensibilité des cellules de carcinome hépatocellulaire au JQ1. Une mutation activatrice du récepteur à l'EGF, EGFR-I645L altère la sensibilité des cellules via la suractivation de la voie de signalisation MAPK. Le niveau de la protéine MYC est considérablement réduit *in vitro* et *in vivo* et la résistance au JQ1 est surmontée lorsque l'activité de l'EGFR ou des protéines ERK est inhibée [442]. L'inhibition de cette voie de signalisation pourrait donc être inhibée dans le but de resensibiliser les cellules aux inhibiteurs de protéines BET. Une étude visant à mettre en évidence des biomarqueurs d'activité de l'inhibiteur I-BET 762 au sein des lignées cellulaires cancéreuses démontre que les mutations KRAS sont de nouveaux biomarqueurs de résistance aux inhibiteurs de protéines BET. De plus, cette étude pré-clinique montre que le traitement par l'I-BET 762 augmente les niveaux de p-ERK1/2 dans les lignées cellulaires de type sauvage et mutantes KRAS, suggérant que l'activation de la voie de signalisation MAPK est un mécanisme de résistance adaptative aux inhibiteurs de BET [489].

d) Implication de l'autophagie

- Le mécanisme de l'autophagie :

L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire conservé de protection et de recyclage du matériel cellulaire où les organites cellulaires et les protéines endommagées sont dégradés. Ce processus biologique permet ainsi de maintenir la biosynthèse cellulaire. L'autophagie permet également aux cellules de survivre en cas de stress cellulaire en éliminant les organites et les protéines afin de fournir de l'énergie [490]. Trois formes d'autophagie ont été identifiées et diffèrent selon les moyens utilisés pour présenter le contenu cellulaire à dégrader et à recycler au lysosome [491]. Ces 3 formes d'autophagie sont l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, la microautophagie et la macroautophagie. Dans le cas de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, les organites et protéines contenant un motif pentapeptidique particulier sont identifiés par des protéines chaperonnes, dépliés et transloqués individuellement à travers la membrane du lysosome. Ainsi cette forme d'autophagie n'utilise pas de structures membranaires pour séquestrer la cargaison à dégrader et à recycler [492]. La microautophagie consiste à capturer les organites et protéines via des invaginations ou des protubérances de la membrane lysosomale [493]. Enfin, la macroautophagie implique la séquestration des organites et des protéines à dégrader et à recycler d'abord par une structure bien distincte du lysosome, appelé le phagophore [494]. Cette forme d'autophagie est la forme la plus abondante et la mieux étudiée et est généralement appelée simplement autophagie. La macroautophagie peut être de deux types. Dans des conditions normales, lorsqu'elle entraîne l'élimination des composants cellulaires ou organites endommagés, elle est dite basale continue. En revanche, lorsque la macroautophagie est activée en réponse à certains facteurs tels que l'hypoxie, la privation de nutriments ou encore le stress oxydatif ou cytotoxique suite à un traitement de chimiothérapie par exemple, elle est décrite comme étant inducible [495,496]. La macroautophagie inducible peut être non-sélective ou sélective. Si elle est non-sélective, par exemple au cours de carences nutritionnelles, les organites cellulaires et les protéines sont dégradés de manière aléatoire afin d'assurer un métabolisme suffisant pour la production d'énergie. En revanche, la macroautophagie sélective implique la séquestration d'un seul type de structure ou d'organite [497]. Cette sélection est rendue possible grâce à des protéines cargo sélectives de l'autophagie, tels que SQSTM1 (Sequestosome 1) aussi connu sous le nom de p62 (ubiquitin-binding protein), NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein), NDP52 (Nuclear Dot Protein 52) ou l'OPTN (optineurin), permettent de cibler et de séquestrer le matériel cellulaire destiné à être détruit dans les autophagosomes [498,499]. Pour isoler le

matériel lésé, une membrane appelée phagophore est formé dans le cytosol. Un autophagosome, une vésicule à double membrane, est produit lorsque le phagophore s'allonge et se ferme. Le contenu est ensuite dégradé et recyclé dans les autolysosomes, qui sont créés lorsque les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes (Figure 27) [500].

Plus de 30 protéines liées à l'autophagie, appelées Atg (Autophagy-related genes), régulent le processus autophagique. L'initiation de l'autophagie est médiée par la formation d'un complexe composé de sérine/thréonine protéines kinases ULK1 et ULK2 (UNC-51-Like Kinase), d'Atg13, de RB1CC1/FIP200 (RB1 Inducible Coiled-Coil 1/ FAK-family Interacting Protein of 200 kDa) et d'Atg101 [501]. Ce processus d'initiation est contrôlé par deux régulateurs majeurs, un négatif et un positif, qui sont le complexe mTORC1 (mammalian target of Rapamycin) et la protéine AMPK (Adenosine-Monophosphate activated Protein Kinase). A l'état basal, c'est-à-dire en présence de quantités suffisantes de nutriments, l'autophagie a une fonction, dite de « ménage » où les protéines à durée de vie longue sont dégradées et où les organites endommagés sont renouvelés. Dans ce cas, la voie de signalisation mTORC1 est fortement activée et bloque l'autophagie par la phosphorylation d'ULK1/2 et l'inactivation des protéines Atg13 [502,503]. Inversement, dans une situation de carence nutritionnelle ou de stress cellulaire, mTORC1 est inhibée par l'activation de l'AMPK, un senseur énergétique intracellulaire impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire afin de maintenir l'homéostasie énergétique [504]. Cette inhibition inactive ULK1, phosphoryle Atg13 et RB1CC1/FIP200 et induit le processus autophagique nécessaire à la survie des cellules. L'AMPK peut également phosphoryler et activer directement ULK1 [505–507]. Cette phase d'initiation est ensuite suivie de la nucléation, consistant à former une portion membranaire comprenant l'ensemble des protéines indispensables à la création d'un phagophore [508]. La nucléation est rendue possible grâce au complexe PI3-K de classe III (Class III PhosphoInositide 3-Kinase) coordonné par l'interaction de différentes protéines telles que Atg14L, Beclin1, Ambra1, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting-associated protein) et VPS15 [507]. Les protéines activées ULK1 et ULK2 augmentent l'activité des protéines VPS34 et Beclin-1 via la phosphorylation des protéines Ambra1 et Beclin-1. Cela active la PI3K, entraînant la production du PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate). Le PI3P permet le recrutement de protéines effectrices de liaison PI3P, telles que DFCP1 (Double FYVE Containing Protein 1) et WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2) favorisant la nucléation [508,509]. Par la suite, l'élongation du phagophore nécessite deux systèmes conjugués comprenant Atg12-Atg5-Atg16 et LC3-Atg3 qui conduisent à la formation de LC3-PE (microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3- phosphatidyléthanolamine),

aussi notée LC3-II. Leurs mécanismes de conjugaison respectifs sont nécessaires pour l'allongement et la fermeture du phagophore [508,510]. Le premier complexe va permettre la formation du conjugué Atg12-Atg5-Atg16. Les enzymes Atg7 et Atg10 assure la conjugaison covalente des protéines Atg12 et Atg5. La protéine Atg16 va ensuite se fixer au conjugué Atg12-Atg5. Le second système de conjugaison de type ubiquitine permet la conjugaison de la PE (PhosphatidylEthanolamine) à LC3 (Microtubule-Associated Protein 1A/1B light chain 3 - MAP1LC3B). La protéine LC3 est traitée par la protéase Atg4, activée par l'enzyme Atg7, transférée à l'enzyme de conjugaison Atg3, puis conjuguée au PE [509,511]. Le matériel cellulaire à dégrader est emprisonné dans le phagophore au fur et à mesure de son élongation. Lorsqu'il s'agit d'un processus autophagique sélectif, les récepteurs sélectifs, tels que P62 ou OPTN, assurent la livraison du matériel cellulaire à dégrader et à éliminer jusqu'aux autophagosomes grâce à une séquence d'acides aminés spécifique qui se lie aux membres de la famille des protéines Atg8 (région d'interaction avec LC3 aussi appelé motif LIR (LC3-interacting region)) [498,499]. Une fois refermé, le phagophore devient un autophagosome. Ce dernier va alors fusionner avec le lysosome pour former un autolysosome. Exposées à la lumière acide et aux hydrolases résidentes du lysosome telles que la sérine protéase TPP1 (TriPeptidyl Peptidase 1), la membrane interne de l'autophagosome ainsi que la cargaison autophagique sont dégradées. Des perméases lysosomales exportent ensuite les composants dégradés vers le cytoplasme. Ces composants sont ensuite utilisés par la cellule dans des processus de biosynthèse ou pour générer de l'énergie (Figure 21) [494].

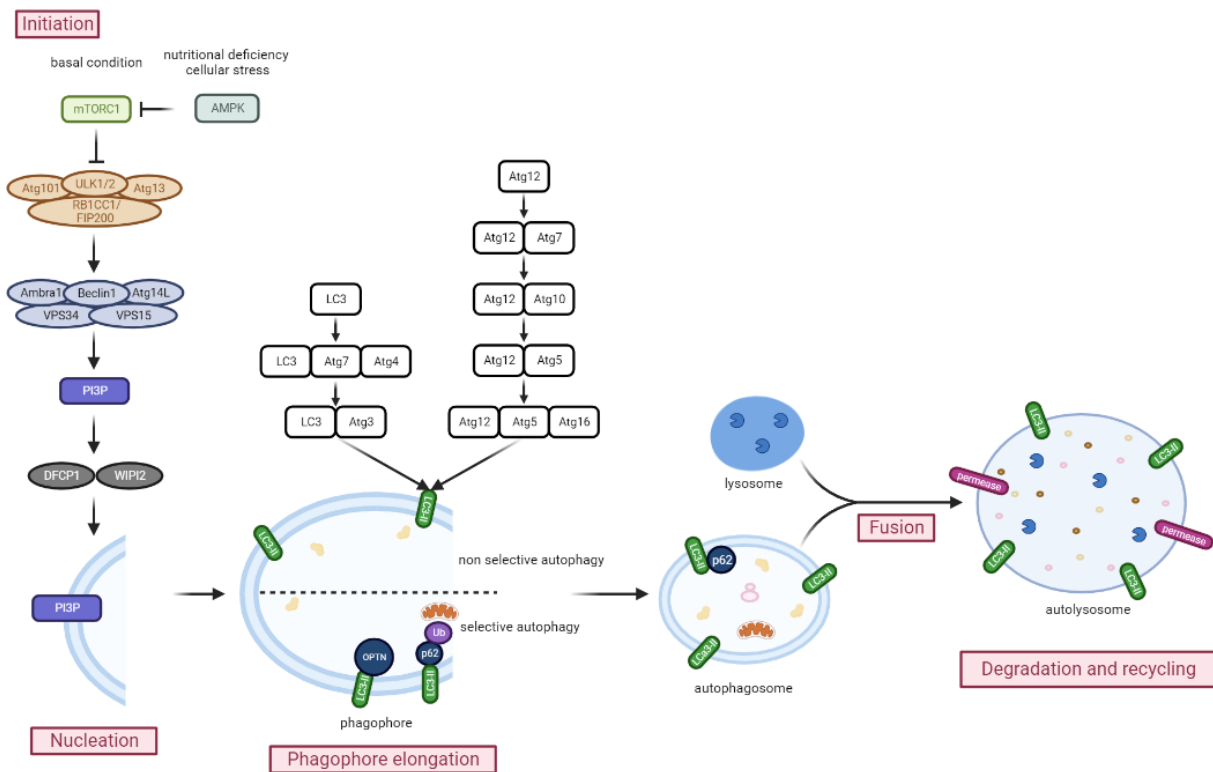


Figure 21 : Schéma du mécanisme de la macroautophagie. La première étape de l'autophagie est l'initiation, régulée négativement par le complexe mTORC1 ou positivement par l'AMPK. L'initiation requière la formation et l'activation du complexe ULK1/2-Atg13-RB1CC1/FIP200-Atg10. Une fois l'autophagie initiée, la membrane du phagosome commence à se générer grâce à la formation et à la liaison de PI3P, par le complexe PI3-K class III et les protéines DFCP1 et WIPI2. Cette étape est appelée la nucléation. L'élongation du phagosome nouvellement formé nécessite la formation de la protéine LC3-II par les systèmes conjugués Atg12-Atg5-Atg16 et LC3-Atg3. Le matériel cytoplasmique à dégrader et à recycler est alors emprisonné dans le phagosome. Une fois refermé le phagosome, devenu un autophagosome, fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome. Le contenu emprisonné dans cet autolysosome est dégradé grâce aux hydrolases lysosomales. Les composants alors dégradés sont exportés vers le cytoplasme par des perméases lysosomales et utilisés par la cellule dans le but de générer de l'énergie.

AMPK : adenosine-monophosphate activated protein kinase ; mTORC1 : mammalian targets of rapamycin; Atg : autophagy-related genes; ULK: UNC-51 like kinase; RB1CC1 : RB1 inducible coiled-coil1; FIP200: FAK-family interacting protein of 200 kDa; VPS: vacuolar protein sorting-associated protein; PI3P: phosphatidylinositol-3-phosphate; DFCP1: Double FYVE Containing Protein 1; WIPI2: WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein2; LC3-II : LC3-PE: microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3- phosphatidylethanolamine; OPTN: optineurin; Ub: Ubiquitine.

- L'autophagie et le cancer :

L'autophagie joue un rôle important dans l'oncogenèse, notamment dans l'initiation tumorale, la progression tumorale ou encore l'apparition de métastases. Cependant, le rôle dans l'autophagie reste controversé dans la tumorigenèse et dépend du contexte cellulaire et du stade de développement de la tumeur.

En effet, au début de la tumorigenèse, l'autophagie joue un rôle anti-tumoral, alors qu'à des stades plus avancés de la tumorigenèse, elle favorise la survie des cellules tumorales [512,513].

Initialement, l'autophagie se comporte comme un mécanisme de suppression des tumeurs via la suppression des organites endommagés, des protéines mal repliées ou encore des espèces réactives de l'oxygène, limitant ainsi le développement tumoral. Le rôle oncosuppresseur de l'autophagie lors de l'initiation tumorale est montré dans plusieurs études.

Le gène BECN1 codant la protéine Beclin-1 impliquée dans la régulation de l'autophagie a été initialement décrit comme un gène suppresseur de tumeur [514]. Des délétions mono-alléliques de BECN1 et de UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene), un gène codant pour une protéine activatrice de Beclin-1, sont retrouvés dans plusieurs types de cancers [515]. Cela a, en effet, été mis en évidence dans 50 à 70% des cancers du sein, des ovaires ou de la prostate [514,516] et dans le cancer du sein, de l'estomac, du côlon, de la prostate et de la vessie [517], respectivement. L'extinction de ces gènes dans un modèle murin *in vivo* a conduit au développement de tumeurs [515]. Récemment, il a été montré que des mutations au sein des gènes codant les protéines ATG12, ATG2B, ATG5 ou encore ATG9B conduisent au cancer colorectal et gastrique [518]. Également, des délétions des gènes Atg5 ou Atg7 chez la souris induit le développement d'adénomes hépatiques [519]. Enfin, l'extinction des gènes Atg7 ou Ulk1 au sein des cellules souches hématopoïétiques murines induit la prolifération de cellules myéloïdes et la mort des souris [520].

D'autres mécanismes tels que la prévention des dommages de l'ADN, de l'inflammation et de défense contre les pathogènes carcinogènes ; la dégradation sélective de la protéines proto-oncogénique p62 ; l'induction de la sénescence ou encore le frein à la prolifération cellulaire ont été décrit comme étant responsables du rôle oncosuppresseur de l'autophagie [521].

L'accumulation de mitochondries endommagées induite par le stress métabolique est à l'origine de la génération des espèces réactives de l'oxygène ainsi que de l'accumulation de dommages à l'ADN impliqués dans le développement tumoral [522]. Les espèces réactives de

l'oxygène, par l'induction d'un processus inflammatoire, déclenchent la sécrétion de médiateurs favorisant la progression tumorale. Dans un premier temps, l'autophagie prévient les dommages à l'ADN via la dégradation des mitochondries endommagées, limitant ainsi l'initiation tumorale. En dégradant les mitochondries endommagées mais également les protéines impliquées dans la réponse inflammatoires, l'autophagie prévient aussi l'inflammation et par conséquent limite la progression tumorale [522].

De plus, l'autophagie semble jouer un rôle de défense cellulaire contre les virus et les bactéries carcinogènes, puisque son inhibition augmente la capacité des pathogènes favorisant la transformation maligne à infecter les cellules [523].

L'autophagie limite l'oncogenèse en diminuant l'accumulation de la protéine proto-oncogénique p62 via sa dégradation sélective [524]. En effet, les cellules déficientes en autophagie présentent une accumulation de la protéine p62, responsable de l'activation de mTOR ainsi que de facteurs de transcription comme NF- κ B à l'origine de réponses oncogéniques [525]. De plus, différents cancers humains présentent des mutations du gène p62/SQSTM1 [525].

Certains oncogènes induisent la sénescence, un mécanisme anti-tumoral. L'oncogène H-RAS induit l'entrée en sénescence et stimule l'autophagie. L'inhibition de l'autophagie par extinction des gènes ATG limite la sénescence ainsi que la sécrétion de protéines associées à ce processus [526,527].

L'autophagie semble être un frein à la prolifération des cellules cancéreuses en intervenant dans la dégradation de protéines clés de la division cellulaire comme la lamine B1 [528]. D'autres expériences montrent un rôle inhibiteur de l'autophagie sur la prolifération cellulaire chez des souris haplo-insuffisantes pour BECN1 [516].

Même si l'autophagie possède un rôle anti-tumoral au début de la tumorigenèse, de nombreuses études soutiennent le rôle pro-tumoral de l'autophagie dans diverses tumeurs [529,530]. En cas de stress, tel qu'un stress nutritionnel ou un stress hypoxique, l'autophagie permet l'élimination des protéines non pliées et les organites endommagés générant ainsi de l'adénosine triphosphate (ATP). Ainsi l'autophagie se comporte comme un mécanisme de survie cellulaire [531,532].

Dans un premier temps, il a été démontré que l'autophagie favorise l'autonomie des cellules cancéreuses vis-à-vis des signaux de croissance. En effet, l'autophagie est utilisée par

différentes cellules tumorales afin de maintenir leur prolifération incontrôlée. La stimulation de l'autophagie dans les cellules cancéreuses du pancréas et les adénocarcinomes du canal pancréatique favorise leur croissance et ainsi le développement du cancer. De plus, cela joue aussi un rôle protecteur contre les chimiothérapies comme le 5-fluorouracile (5-FU) et la gemcitabine (GEM) dans les lignées cellulaires du cancer du pancréas [533]. Il a, également, été démontré que dans les régions hypoxiques des tumeurs, les facteurs de transcription médiés par PKR-like ER kinase (PERK), Activating transcription factor 4 (ATF4) et DNA damage-inducible transcript 3 (CHOP) augmentent l'autophagie pro-survie [534].

Les cellules tumorales présentent dans la plupart des cas des défauts d'apoptose, permettant à l'autophagie de favoriser la survie des cellules cancéreuses pendant une longue période dans des conditions défavorables [535]. Par exemple, dans les cellules de cancer du sein, l'autophagie médiée par Beclin-1 et ATG7 est utilisée par les cellules comme un moyen de retarder l'apoptose, induite par de dommages à l'ADN, et de prolonger ainsi leur survie [536]. De plus, le rôle de l'autophagie mitochondriale dans la protection contre l'apoptose induite par un choc thermique a été démontrée [537]. En effet, l'inhibition de la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase-3 en aval sont les événements moléculaires à l'origine de l'effet protecteur contre l'apoptose. Les cellules tumorales échappent donc à l'apoptose en régulant à la hausse l'autophagie. En accord avec les résultats ci-dessus, le knockdown d'ATG5 et d'ATG7 a entraîné la mort cellulaire dans les lignées cellulaires de mélanome [538]. Ces lignées cellulaires en condition normale présentent un niveau basal élevé d'autophagie, ce qui suggère que le mécanisme de survie des cellules de mélanome dépend de l'autophagie. L'altération de l'apoptose est une signature majeure des tumeurs humaines, et l'augmentation de l'autophagie pro-survie est impliquée dans ce phénomène. Il existe une communication croisée entre l'apoptose et l'autophagie, et ce à différents niveaux. En effet, ces deux processus biologiques possèdent des médiateurs communs [505].

Au sein des cellules tumorales, l'autophagie a également montré un rôle dans le soutien de l'angiogenèse. En effet, il a été montré que ATG5 module l'angiogenèse induite par le manque de nutriments et l'hypoxie dans les cellules endothéliales en favorisant l'activation de AKT et la production de ROS. L'HMGB1, une protéine nucléaire cruciale liée à la chromatine, peut être responsable de cette modulation de l'angiogenèse [539]. Lors d'un stress, l'HMGB1 est transloquée du noyau au cytoplasme et est libérée dans la région extra-cellulaire des cellules endothéliales [540]. L'HMGB1 ainsi libérée fonctionne comme une cytokine inflammatoire et pourrait alors contribuer à la croissance vasculaire *in vitro* et *in vivo* par divers mécanismes

[540]. De plus, l'HMGB1 présente une homologie de séquence considérable avec la Beclin-1 [541]. L'HMGB1 endogène soutient donc l'autophagie en régulant la formation des autophagosomes [541].

En fonction du micro-environnement au sein des cellules tumorales, la voie métabolique est modifiée, permettant aux cellules tumorales de s'adapter et de survivre en conditions défavorables. De plus, l'autophagie est un processus qui dégrade divers substrats et agit comme un centre du métabolisme du carbone. En maintenant un niveau basal de métabolites en cas de stress métabolique, l'autophagie sert de mécanisme important d'adaptation métabolique pour les cellules cancéreuses afin de favoriser l'oncogenèse [513]. De nombreuses lignées de cellules cancéreuses présentent un niveau d'autophagie basale élevé, comparé aux cellules et tissus sains. L'augmentation de l'autophagie dans les cellules cancéreuses est nécessaire pour répondre à la demande métabolique accrue et entraîne la survie des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* [542]. Avant même que l'angiogenèse ne se mette en place, l'autophagie est activée dans la tumeur et plus précisément dans des zones subissant un important stress métabolique. Des modifications métaboliques se produisent dans les cellules cancéreuses suite à la transformation cellulaire par des oncogènes ou à la perte d'expression ou de fonction de suppresseurs de tumeurs. Ces modifications métaboliques conduisent à une augmentation de la glycolyse aérobie au détriment de la respiration mitochondriale. L'homéostasie du glucose médiée par l'autophagie favorise le maintien des tumeurs pulmonaires via la régulation de l'ATG7 [543]. Également, l'autophagie facilite la glycolyse, qui est importante pour la transformation oncogène médiée par RAS [544]. De plus, le niveau élevé d'autophagie dans certaines tumeurs maintient un niveau métabolique important, entraînant un fort pouvoir prolifératif des cellules cancéreuses [542]. Par exemple, l'autophagie produit de l'arginine, un acide aminé circulant, qui est un facteur essentiel de la croissance tumorale [545]. L'autophagie médiée par ATG7 dans le maintien de la glycolyse a également été démontrée dans la différenciation et la survie de la leucémie myéloïde chronique [546]. De la même manière, l'oncogène RAS nécessite l'autophagie pour maintenir le métabolisme oxydatif et la tumorigenèse [163]. Chez les patients atteints de la maladie de Wilson, l'induction de l'autophagie dans les tissus hépatiques protège les hépatocytes déficients en ATP7B de l'apoptose induite par le cuivre [547]. L'autophagie soutient également le métabolisme mitochondrial de la glutamine, ce qui est d'une importance critique concernant la malignité pulmonaire induite par BrafV600E, car les cellules déficientes en autophagie ne survivent pas en situation de privation de nutriments [548]. De plus, la régulation du métabolisme des lipides

par l'autophagie a été suggérée dans une étude récente où il est montré que l'induction de l'autophagie par le manque de nutriments contribue à la dégradation du corépresseur du récepteur nucléaire 1 (NCoR1) et active ainsi le récepteur α activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR α) dans la lignée cellulaire HepG2 pour réguler la β -oxydation et la production de corps cétoniques. À l'inverse, l'inhibition de l'autophagie entraîne l'accumulation de NCoR1, supprimant l'activité de PPAR α et provoquant une altération de l'oxydation des lipides [549]. Le métabolisme, la prolifération ainsi que la survie des cellules cancéreuses peut être affectée par l'inhibition pharmacologique et génétique de l'autophagie [545]. De plus, l'autophagie est également induite dans des cellules du micro-environnement tumoral telles que les fibroblastes associés au cancer produisant ainsi l'énergie indispensable à la croissance des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses sécrétant du peroxyde d'hydrogène entraînent un stress oxydatif au sein des fibroblastes associés au cancer, induisant ainsi l'autophagie ainsi que des composés métaboliques comme les cétones ou le lactate, ayant un fort pouvoir énergétique [550].

L'autophagie présente un rôle complexe et ambivalent dans la dissémination métastatique. Dans un premier temps, l'autophagie montre un rôle pro-métastatique. Dans différents cancers, comme le cancer du poumon ou dans les cholangiocarcinomes, l'autophagie favorise l'invasion et la migration des cellules tumorales en permettant la transition épithélio-mésenchymateuse [551,552]. En effet, dans des carcinomes hépatocellulaires, l'inactivation de Beclin-1 ou d'ATG5 inhibe l'autophagie ainsi que le développement de métastases pulmonaires [553]. De plus, d'après une étude réalisée sur des échantillons cliniques et dans un modèle murin de métastases, l'autophagie est plus élevée dans les métastases que dans la tumeur primaire [554]. Après cette transition épithélio-mésenchymateuse, l'autophagie joue un rôle de protection des cellules cancéreuses métastatiques de l'anoïkis, un processus de mort cellulaire. À l'inverse, certaines études ont montré un rôle anti-métastatique de l'autophagie. La dégradation de l'inflammasome ainsi que des mitochondries endommagées diminue la nécrose et l'inflammation [555]. Dans un modèle de glioblastome ou dans un modèle murin de cancer hépatique, l'autophagie dégrade des protéines essentielles de la transition épithélio-mésenchymateuse telles que SNAIL et SLUG, diminuant l'invasion cellulaire [556]. Dans les cancers gastriques, la transition épithélio-mésenchymateuse est également inhibée par l'autophagie via un mécanisme de la voie ROS-NF- κ B-HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α) [557].

Enfin, l'autophagie pourrait jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype « cellules souches cancéreuses ». Ces cellules possèdent des niveaux d'autophagie plus élevés que les cellules cancéreuses « non-souches » [558,559]. *In vivo*, l'induction de l'autophagie via la protéine ARH1 (ras homolog member 1) augmente la dormance des cellules [560]. L'inhibition de l'expression du mutant oncogénique KRAS^{G12D}, dans un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique, induit la régression tumorale mais s'accompagne aussi de la survie d'une sous-population de cellules tumorales entrées en dormance de façon dépendante de l'autophagie, favorisant la résurgence de la tumeur [561]. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'autophagie ainsi que l'extinction de l'expression du gène ATG ne permet pas de maintenir le phénotype « cellule souche cancéreuse » [559].

- L'autophagie et la résistance aux inhibiteurs de protéines à bromodomains et domaine extra-terminal :

Ainsi, l'autophagie joue un rôle complexe dans le cancer puisqu'elle peut diminuer l'activité tumorale, mais peut également fournir aux cellules tumorales des nutriments, les aidant à survivre et à se développer plus rapidement [562].

Des lignées de leucémie myéloïde aigüe, résistantes au JQ1 présentent une surexpression de protéines de l'autophagie telles que Beclin1, une augmentation de la lipídation de LC3 (essentielle pour la formation des autophagosome) ainsi qu'une augmentation de la formation d'autophagosome [460]. Ces cellules résistantes présentent également une diminution de p62/SQSTM1, protéine impliquée dans le ciblage et la séquestration du matériel cellulaire à détruire dans les autophagosomes. Ces modulations du processus autophagique sont associées à une diminution de l'apoptose des cellules [563]. Contrairement à d'autres protéines BH3-only, pouvant se lier et inhiber les protéines pro-survie entraînant une augmentation de l'apoptose, Beclin 1 ne fonctionne pas comme une molécule pro-apoptotique, et cela même si elle est surexprimée [564]. De plus, la protéine Bcl-2, lorsqu'elle interagit avec Beclin 1, ne perd pas son potentiel anti-apoptotique [565]. Cela peut alors expliquer la diminution de l'apoptose observée dans les cellules résistantes. La protéine p62 peut interagir avec des protéines apoptotiques et de survie [524,566,567]. P62 est notamment essentielle à l'activation de la caspase-8, qui une fois clivée active à son tour les caspases 3 et 7, responsables de l'apoptose. Ainsi, la diminution d'expression de la protéine p62 inhibe l'activation de la

caspase-8 et donc l'apoptose [568,569]. L'augmentation de l'autophagie permettrait aux cellules de résister aux effets cytotoxiques des inhibiteurs aux protéines BET. De plus, l'autophagie induite par JQ1 dans les cellules résistantes est associée à l'activation de la voie AMPK (p-Thr172)-ULK1 (p-Ser555), indépendamment de la signalisation mTOR [460]. En effet, dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë, l'inhibition pharmacologique de l'AMPK ou son inactivation via un knockdown inhibe l'autophagie induite par JQ1 et favorise l'apoptose des cellules tumorales [317,460,461].

6. Objectif de thèse

Les thérapies anti-tumorales telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou encore l'endocrinothérapie induisent l'autophagie dans les cellules tumorales [570,571]. Différentes études ont montré que l'autophagie joue un rôle protecteur pour les cellules tumorales contre certains traitements et favorise la survie de certains types de lignées cellulaires tumorales [536,572–577]. Les inhibiteurs de protéines BET, tels que JQ1, induisent l'autophagie et inhibent la prolifération cellulaire dans différentes lignées cancéreuses [460,562].

Le premier objectif de ma thèse est de déterminer si l'inhibition de l'autophagie, processus biologique amplifié dans les cellules traitées par des inhibiteurs de protéines BET, permet de potentialiser l'effet anti-tumoral des inhibiteurs de BET dans les cellules d'ostéosarcome. Trois inhibiteurs chimiques de l'autophagie ont été utilisés afin de déterminer l'intérêt de son ciblage thérapeutique ainsi que sa combinaison avec un inhibiteur de protéines BET dans l'ostéosarcome, *in vitro*. L'efficacité de combinaison d'un inhibiteur de protéines BET avec un inhibiteur de l'autophagie, sur des tumeurs d'ostéosarcome a également été étudiée *in vivo*.

Ces dernières années, des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET ont été décrits dans divers cancers [302,432]. Cependant, aucun mécanisme menant à la résistance des inhibiteurs de protéines BET n'a été identifié et décrit dans l'ostéosarcome. C'est pourquoi, il est nécessaire d'identifier, de mieux comprendre et de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de protéines à bromodomaine BET dans l'ostéosarcome. La compréhension de ces mécanismes de résistance permettra d'adapter et proposer une alternative thérapeutique personnalisée pour les patients résistants. Une lignée d'ostéosarcome résistante au JQ1 (HOS JQ1R) a été développée en exposant des cellules HOS-MNNG naïves (HOSn) avec des doses croissantes de JQ1.

Le deuxième objectif de ma thèse est d'identifier et d'explorer le rôle de gène(s), de processus biologique(s) et/ou de voie(s) de signalisation clés dans l'acquisition et le maintien de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans l'ostéosarcome. Dans un premier temps, des méthodes haut débit ont permis d'identifier les modulations et adaptations entre les cellules HOS JQ1R et les cellules HOSn. Par la suite, les processus biologiques et les voies de signalisation modulées dans les cellules HOS JQ1R, comparativement aux cellules HOSn pouvant jouer un rôle dans la résistance ont été caractérisées. En fonction des résultats obtenus, le(s) gène(s), le(s) processus biologique(s) ou la (les) voie(s) de signalisation modulée(s) ont été ciblés dans le but de sensibiliser les cellules résistantes aux BETis.

Dans de nombreux cancers, la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) est suractivée. La FDA (Food and Drug administration) a approuvé des inhibiteurs ciblant des protéines appartenant à cette voie, telles que les protéines RAS, RAF et MEK. Néanmoins, l'efficacité de ces inhibiteurs reste limitée selon les cancers. En effet, un nombre important de patients développent rapidement une résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK [578]. Des alternatives thérapeutiques visant à surmonter la résistance sont néanmoins à l'étude. La combinaison de traitement fait, par exemple, l'objet de nombreuses études pré-cliniques et cliniques [579,580]. Parmi ces combinaisons de traitement, la combinaison des inhibiteurs de protéines BET et des inhibiteurs de MAPK est à l'étude et montre des résultats prometteurs quant au traitement de certains cancers comme le mélanome [581], le gliome [582], le cancer de la thyroïde [583], etc.

Le troisième objectif de ma thèse est d'étudier l'efficacité de la combinaison de l'inhibiteur des protéines BET, le JQ1 avec des inhibiteurs de la voie de signalisation MAPK, tels que le salirasib (RAS inhibiteur), le sorafenib (inhibiteur de RAF), le binimetinib, le trametinib ou le bobimetinib (MEK inhibiteurs) sur les cellules d'ostéosarcome.

L'objectif de cette thèse est donc d'identifier de nouvelles cibles moléculaires permettant d'anticiper ou de contre-carrer la résistance aux inhibiteurs de protéines BET. Ceci ouvrant la voie à des alternatives thérapeutiques.

Matériels et méthodes

1. Réactifs

La chloroquine provient de Sigma-Aldrich et est dissoute dans l'eau à une concentration de 5 mM. La bafilomycine et la 3-méthyladénine (3-MA), provenant de Sigma-Aldrich, sont dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) à des concentrations de 100 μ M et 100 mM, respectivement. Tous ces inhibiteurs de l'autophagie sont stockés à -20°C.

Le JQ1 (Laboratoire Qi) est donné au laboratoire par James Bradner (Dana-Farber Cancer Institut). Pour les études *in vitro*, il est préparé à une concentration de 40 mM dans du DMSO et stocké à -20°C. Pour les études *in vivo*, le JQ1 est également dissous dans du DMSO à 50 mg/mL, puis dilué dans de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD, Sigma-Aldrich) à 10 % pour obtenir une dose finale de 50 mg/kg, et conservé à 4 °C. Le HP- β -CD à 10 % est préparé dans de l'eau stérile filtrée avec un filtre de 0,22 μ . L'I-BET 151 est acheté auprès de MedChemExpress, est préparé dans du DMSO à une concentration de 10mM et stocké à -20°C.

Le mafosfamide est acheté auprès de Sigma-Aldrich et est dilué à une concentration de 20 mg/mL dans du DMSO. Le cisplatine et la doxorubicine proviennent de Sigma-Aldrich et sont resuspendus dans de l'eau à des concentrations de 3,3 mM et 10 mM, respectivement. Ces agents de chimiothérapie sont stockés à -20°C.

La doxycycline provient de Clontech, est préparée dans de l'eau à une concentration de 1 mg/mL et stockée à -20°C.

Les inhibiteurs de la voie MAPK, le binimetinib, le trametinib, le cobimetinib, le salisarib et enfin le sorafenib, proviennent de CliniSciences, sont dilués dans du DMSO à des concentrations de 50 mM, 50 mM, 10 mM, 100 mM, 100 mM, respectivement et stockés à -20°C.

2. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'ostéosarcome HOS-MNNG (HOSn), KHOS, 143B, U2OS, et la lignée cellulaire de rein HEK 293 proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) complémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest). Le milieu de culture des cellules HEK 293 est complémenté avec du G-418 à 0.5 μ g/mL. Les cellules sont incubées dans

une atmosphère humide à 37°C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air. La culture cellulaire est réalisée dans des conditions stériles.

3. Établissement de la lignée HOS-MNNG résistante au JQ1

La lignée cellulaire HOS-MNNG résistante au JQ1 (HOS JQ1R) est obtenue en traitant des HOS-MNNG naïves (HOSn) avec des concentrations croissantes de JQ1 jusqu'à ce que les cellules prolifèrent dans un milieu contenant 24 µM de JQ1, correspondant à une concentration d'environ 14 fois l'IC₅₀ des HOSn qui est de 1.761 µM. Huit mois sont nécessaires à l'établissement de cette lignée résistante au JQ1. Désormais, les cellules HOS JQ1R sont maintenues dans un milieu contenant 24 µM de JQ1 (DMEM complété de 10 % de SVF).

4. Tests de viabilité cellulaire et expériences de dose-réponse

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à J0. A J1, les cellules sont traitées ou non pendant 72 ou 96 heures. Pour les expériences de dose-réponse, les cellules sont traitées avec une gamme de dilutions allant de 0 µM à 100 µM selon le traitement utilisé (se référer aux légendes des figures). A la fin de ce temps de traitement, les cellules sont fixées pendant 5 minutes avec du glutaraldéhyde à 10 % (Sigma-Aldrich) et sont colorées pendant 5 minutes avec 50 µL de cristal violet à 0,1 % (Sigma-Aldrich). Après 24 heures de séchage, la coloration au cristal violet est solubilisée dans une solution de Sorensen (9mg de citrate trisodique, 305 mL d'eau distillée, 195 mL de HCl 0,1N et 500 mL d'EtOH 90 %) et l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide du Victor2 (Perkin Elmer).

5. Test de synergie

A J0, les cellules sontensemencées dans 3 plaques 96 puits différentes. A J1, les cellules sont traitées soit avec un traitement A (pour la première plaque), avec un traitement B (pour la deuxième plaque) ou avec la combinaison des deux traitements A et B (pour la troisième plaque), selon un ratio constant entre les deux traitements. L'effet sur la viabilité cellulaire et la concentration de traitement utilisée sont renseignés dans le logiciel Calcsyn (Version 1.1). Ce logiciel détermine ensuite l'indice de combinaison (IC) à différentes dose-effet (DE) selon la méthode de Chou-Talalay [584]. Un IC inférieur à 1 correspond à un effet synergique des

deux traitements combinés, comparativement à l'effet antagoniste caractérisé par un IC supérieur à 1. Un IC égal à 1 détermine un effet additif.

6. Tests de clonogénicité

Les tests de clonogénicité sont réalisés en plaque 6 puits, à raison de 1 000 cellules par puits, soit après un traitement de 48 heures (inhibiteurs de l'autophagie, JQ1, combinaison de JQ1 et d'inhibiteurs de la voie MAPK), soit après une transduction de shRNA inductible ciblant KRAS et un pré-traitement de 96 heures ou non à la doxycycline (1 µg/mL). Pour les expériences utilisant les shRNA inductibles à la doxycycline, le traitement à la doxycycline est maintenu tout au long du test de clonogénicité. Après 10 à 14 jours de culture, les colonies sont fixées avec du glutaraldéhyde à 10 % (Sigma-Aldrich) et sont colorées avec du cristal violet à 0,1 % (Sigma-Aldrich). Les plaques sont ensuite photographiées et les clones sont comptés à l'aide du logiciel Fiji.

7. Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total est extrait des cellules à l'aide du kit NucleoSpin® RNA plus (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fabricant. Un µg d'ARN est ensuite transcrit de manière inverse à l'aide du kit Maxima™ H Minus First Strand cDNA synthesis (ThermoFisher Scientific). La PCR quantitative en temps réel est réalisée sur 20 ng/µL d'ADNc à l'aide du système de PCR en temps réel QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific) avec du SYBR® Select Master Mix (Life Technologies) et les amorces d'ADN, répertoriées dans le tableau VI. L'expression des gènes cibles est normalisée par rapport au niveau de Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase (hPRT) et de β-2-Microglobuline (B2M) dans les échantillons respectifs. La méthode comparative du seuil de cycle (Ct) est utilisée pour déterminer la quantité relative des ARNm cibles. La comparaison de l'expression relative normalisée des gènes cibles est réalisée à l'aide de la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau VI : Séquences d'amorces pour la RT-qPCR

Nom du primer	Amorce sens	Amorce anti-sens
ATG2A	5'-CCTGCGGCGAGATTATGTCT-3'	3'-CGAATAGTGGCTGGCTCAGT-5'
ATG7	5'-TGTTTCCTTCCGTGACCGTA-3'	3'-CCAACTGCTTTAGGACAATCT-5'
B2M	5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	3'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-5'
KRAS4a	5'-AAGACAGAGAGTGGAGGATGC-3'	3'-CACACAGCCAGGAGTCTTTTC-5'

LDHA	5'-GGAAAGGCTGGGAGTTCACC-3'	3'-CCACTCCATACAGGCACACTG-5'
MAP1LC3B	5'-CCGCACCTTCGAACAAAGAG-3'	3'-AAGCTGCTTCTCACCCCTTGT-5'
OPTN	5'- GACCAGCAGGCTTACCTTGT-3'	3'- GGGGCAGGAATGAATCGGAA-5'
PINK1	5'- CTGTCAGGAGATCCAGGCAAT-3'	3'- ATACTCCTCCAGCCGAAAGC-5'
PRKAA2	5'- ATTGATGATGAAGTAGTGGAGCAG-3'	3'- GTGTAAGCCAGCAGCAGAAC-5'
hPRT	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACC-3'	3'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-5'
SQSTM1	5'-ATCAGCTTCTGGTCCATCGG -3'	3'-CTTCAATGCCCAGAGGGCTA-5'
TPP1	5'-ACACGGTGCAAAAATGGCTC-3'	3'-TCTGCTTGTCGGATGCTCAG-5'
ULK1	5'-ACGCAGGTGCAGAACTACC-3'	3'-CAGAGGACCGAGGTGTTTGG-5'
ULK2	5'- TTGAGAGAAGACTGTCTGGCG-3'	3'- CCTCTTCCTCACGTTCCCAC-5'

8. Extraction protéique et western-blot

Les cellules, sous forme de culot cellulaire, sont lysées pendant 30 minutes avec 30 à 100 µL, selon les culots cellulaires, de tampon Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA, Santa-Cruz) contenant un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (PIC), du fluorure de phénylméthyl-sulfonyl (PMSF) et de l'orthovanadate de sodium (NAVO₄) (Santa Cruz). Les lysats cellulaires sont débarrassés des débris cellulaires par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'un dosage colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma-Aldrich), conformément aux instructions du fabricant, l'absorbance étant mesurée à 562 nm à l'aide du lecteur de plaques Victor2 (Perkin Elmer). Les protéines (30 µg) sont dénaturées par le tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glycérol, 5 % 2-mercaptoéthanol, et 0.001 % de bleu de bromophénol) à 95°C pendant 5 minutes, avant d'être séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 100 V pendant 3 heures à température ambiante et transférées sur une membrane de transfert de 0,45 µm en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Immobilon-FL, Merck Millipore) à 30 V pendant une nuit à 4°C. La membrane est séchée pendant 10 minutes à 37°C, est réactivée dans du méthanol puis est saturée pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon de saturation TBS-tween (intercept®, LI-COR). La membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires dans ce même tampon de saturation. Les protéines cibles sont détectées par analyse western blot avec les anticorps répertoriés dans le tableau VII. Après des lavages de 3x10 minutes avec du TBS-Tween 1X, la membrane est incubée 1 heure à l'obscurité avec les anticorps secondaires répertoriés dans le tableau VII. La liaison des anticorps est visualisée avec le système de fluorescence (Odyssey FC, LI-COR).

Tableau VII : Liste des anticorps primaires utilisés pour les western-blots

Anticorps primaire	Poids Moléculaire (kDA)	Dilution	Fournisseur	Référence
Akt	60	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	9272S
ERK 1/2	42,44	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	9102S
KRAS	21	1/200 ^{ème}	SantaCruz	Sc-30
LC3B	14,16	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	3868S
LDHA	37	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	2012S
MEK1	45	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	2352S
mTOR	289	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	2972S
p62	62	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	5114S
PARP	89,116	1/1 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	9542S
pERK	42,44	1/500 ^{ème}	Cell Signaling Technology	4370S
pMEK1/2	45	1/500 ^{ème}	Cell Signaling Technology	9154S
pmTOR	289	1/500 ^{ème}	Cell Signaling Technology	2971S
pS6	32	1/500 ^{ème}	Cell Signaling Technology	4858S
Vinculin	124	1/20 000 ^{ème}	Cell Signaling Technology	13901S

Tableau VIII : Liste des anticorps secondaires utilisés pour les western-blots

Anticorps secondaire	Dilution	Fournisseur	Référence
Goat-Rabbit IRDye® 800CW	1/20 000 ^{ème}	LI-COR	926-32211
Goat-Mouse IRDye® 680RD	1/20 000 ^{ème}	LI-COR	926-68071

9. Mesure de l'activité des caspases 3 et 7

L'activité des caspases-3 et -7 est évaluée à l'aide du kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). Le réactif du kit est préparé en diluant au 1/100^{ème} le substrat pro-fluorescent des caspases-3 et -7, la rhodamine, dans du tampon bifonctionnel de lyse et d'activité cellulaire. 25 µL de ce réactif sont ajoutés à 10 µL de lysats cellulaires totaux, préalablement dosés à l'aide du kit de dosage de l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma-Aldrich), conformément aux instructions du fabricant, et dilués dans 15 µL de tampon Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA, Santa-Cruz). Après 3 heures d'incubation, la fluorescence à 521 nm est mesurée avec le TriStar LB 941 (BERTHOLD Technologies). La quantité de produit fluorescent généré est représentative de la quantité de caspases-3 et -7 actives présente dans l'échantillon. La normalisation est faite à l'aide des concentrations déterminées lors du dosage protéique de chaque échantillon, permettant ainsi d'obtenir une valeur en Unité Arbitraire/µg (UA/µg).

10. Immunofluorescence et microscopie confocale

A J0, les cellules sontensemencées en plaque Ibidi µ-Slide 8 puits (ibidi). A J1, les cellules sont traitées, avec 1 µM de JQ1 pendant 24 heures et/ou 50 µM de chloroquine pendant 4 heures. Les cellules sont fixées avec une solution froide de méthanol-acétone 3 % pendant 10 minutes à -20°C, puis perméabilisées avec du PBS-Triton 0,3 % pendant 10 minutes. La saturation est faite avec du PBS-3 % de poudre de lait écrémé pendant 30 minutes. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine LC3B (Cell Signaling Technologies, 3868S), dilué au 1/300^{ème} dans du PBS-1 % BSA, est incubé une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire (Invitrogen, Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG), dilué au 1/500^{ème} dans du PBS-0,1 % Triton-2 % sérum de chèvre-1 % BSA, est incubé 1 heure à température ambiante. Le DAPI (Sigma-Aldrich), dilué au 1/5 000^{ème} dans du PBS, est incubé 15 minutes sous agitation lente. Du milieu de montage (ibidi) est placé dans chaque puits. Les images sont acquises à l'aide d'un microscope confocal (NIKON Eclipse Ti) et traitées avec ImageJ.

11. Expérimentations *In vivo*

Des souris nudes NMRI femelles âgées de 4 semaines provenant de la société Janvier sont utilisées pour les expériences *in vivo*. Ces souris sont utilisées en conformité avec les recommandations des structures en charge du bien-être animal (SBEA) et en accord avec le

comité d'éthique (saisine Apafis 8405). Après 1 semaine d'acclimatation dans l'animalerie, 1,5 millions de cellules HOS-MNNG négatives pour les mycobactéries sont injectées par souris dans la région paratibiale. Les souris sont randomisées en 4 groupes de traitement, avec 8 souris par groupe : "contrôle", "chloroquine", "JQ1" et "chloroquine + JQ1". Le JQ1 et la chloroquine sont injectés en intra-péritonéal à des concentrations de 50 mg/kg/jour et 25 mg/kg/jour, respectivement. Le volume de la tumeur est mesuré sur chaque souris tous les 2 ou 3 jours, selon le calcul : longueur*largeur*épaisseur/0,5236. Lorsque le volume tumoral est supérieur à 2 000 mm³ (point final) ou après 24 jours de traitement (fin de l'expérience), les souris sont sacrifiées. Après sacrifice, les tumeurs sont prélevées dans le but de réaliser une étude histologique.

12. Immunohistologie

Les tumeurs collectées sont fixées dans une solution de formol 4 % pendant 48 heures, puis inclus en paraffine. Des coupes sériées de 2 µm sont réalisées sur 2 niveaux (Leica Microsystems). Les lames sont immunomarquées dans le but d'évaluer la prolifération cellulaire (marquage de Ki67), l'apoptose (marquage de la caspase 3 clivée), et le processus d'autophagie (marquage de LC3B et de p62). Dans un premier temps, les lames sont déparaffinées à l'aide de l'automate HMS 740 (Celab), en suivant le protocole suivant : 3x5 minutes OTTIX PLUS (diapath), 3x5 minutes éthanol 100°, 1x5 minutes éthanol 95°, 1x5 minutes éthanol 80°. Les lames sont ensuite réhydratées 3x5 minutes dans de l'eau bidistillée. Un démasquage antigénique est ensuite réalisé dans un tampon citrate pH6 (marquage de Ki67 et de la caspase 3 clivée) ou un tampon Tris/EDTA pH9 (marquage de LC3B et de p62) pendant 20 minutes à 97°C (TP Module Leica). Après un retour à température ambiante, les lames sont rincées 3 fois dans de l'eau bidistillée, puis 3x5 minutes dans du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %. L'activité des peroxydases endogènes est bloquée par l'incubation, pendant 15 minutes à température ambiante, d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (Gifère). Après des lavages de 3x5 minutes avec du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %, les sites de fixation non-spécifiques sont bloqués, pendant 25 minutes à température ambiante, à l'aide d'une solution contenant 2 % de sérum de chèvre non-immun, 1 % de BSA, dilué en TBS 1X pH=7,6 tween 0,05 % (marquage de Ki67 et de la caspase 3 clivée) ou une solution contenant 2 % de sérum d'âne non-immun, 1 % de BSA, dilué en TBS 1X pH=7,4 tween 0,05 % (marquage de LC3B et de p62). Les lames sont de nouveau rincées 3x5 minutes dans du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %. Les anticorps primaires, répertoriés dans le tableau IX, sont dilués dans la solution de

saturation et incubés à température ambiante pendant 2 heures pour le marquage de Ki67 et de la caspase 3 clivée ou 1 heure pour le marquage de LC3B et de p62. Les complexes immuns sont détectés à l'aide d'un système anticorps secondaire biotynilé et streptavidine-peroxydase (système ABC). Après des rinçages de 3x5 minutes dans du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %, les anticorps secondaires, répertoriés dans le tableau X, sont dilués dans la solution de saturation et incubés pendant une heure à température ambiante. Après des rinçages de 3x5 minutes dans du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %, la révélation est réalisée par l'incubation, pendant une heure à température ambiante, de la streptavidine/peroxydase diluée au 1/800^{ème} (DAKO, P0397) dans du TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %. Après de nouveaux rinçages de 3x5 minutes dans une solution de TBS 1X pH=7.6 tween 0.05 %, les lames sont incubées, de 1 à 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité, avec le substrat, la DAB (3, 3'-diaminobenzidine, Dako). La cinétique est contrôlée afin de limiter au maximum le bruit de fond. Après des lavages de 2x5 minutes à l'eau bisdistillée, les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline de Gill-2 (Shandon) pendant 15 secondes à température ambiante, déshydratées, éclaircies et montées entre lames et lamelles au Pertex (Histolab). L'acquisition des immunomarquages est réalisée à l'aide d'un scanner de lames (Nanozoomer, Hamamatsu). Les images sont exportées à partir du fichier brut à un grossissement de x10 et au format *.tiff. Sur chacune des images de marquage Ki67, le profil d'intensité de marquage des noyaux de toutes les cellules du champ est évalué et classé en 4 populations : les fortes intensités, les intermédiaires, les faibles, et les négatives. Cette représentation permet de respecter le niveau d'expression du Ki67 au cours du cycle cellulaire [585]. Pour ce faire, après avoir réalisé une déconvolution d'image en 3 canaux (Plugin Colour Deconvolution, ImageJ), le canal correspondant au signal DAB+ (marron, pseudo niveau de gris) est seuillé en prenant comme référence la plus forte intensité de marquage du champ. Puis de manière semi-automatisée, après plusieurs étapes de seuillage et segmentation, les éléments (noyaux) sont dénombrés. La distribution de chacune des populations est ensuite ramenée au nombre total de noyaux du champ analysé. Pour l'étude du marquage de la caspase 3 clivée, l'analyse est évaluée par le pourcentage d'aire dans la région d'intérêt après seuillage du signal DAB+ et en mesurant l'aire positive ainsi obtenue.

Tableau IX : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Référence
Ki67	1/100 ^{ème}	Dako	M7240
Caspase 3 clivée	1/400 ^{ème}	Cell Signaling Technologies	9664S

LC3B	1/200 ^{ème}	Cell Signaling Technologies	3868S
P62	1/200 ^{ème}	Cell Signaling Technologies	5114S

Tableau X : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunomarquages.

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Référence
Goat anti-mouse biotinylated	1/400 ^{ème}	Dako	E0433
Goat anti-rabbit biotinylated	1/400 ^{ème}	Dako	E0432
Donkey anti-mouse biotinylated	1/500 ^{ème}	JacksonImmunoResearch	711-065-152

13. siRNA interférence

Les cellules tumorales sont ensemencées en plaque 6 puits afin d'atteindre une confluence d'environ 70 % au moment de la transfection. Les cellules sont transfectées à l'aide de Lipofectamine® RNAi max (Invitrogen) et de milieu optiMEM (Opti-Minimum Essential Medium, ThermoFisher) sans siRNA, avec 10 nM de siRNA contrôle (Ambion), 10 nM de siRNA ciblant le gène d'intérêt ATG7 ou 10 nM de siRNA ciblant le gène d'intérêt KRAS. Les expériences utilisant les cellules transfectées avec des siRNA sont réalisées 6 heures après transfection.

14. shRNA interférence

Le système shRNA SMARTvector (Horizon Discovery®) inducible à la doxycycline est utilisé pour éteindre de manière stable l'expression de l'oncogène KRAS dans les cellules HOS JQ1R. Les transductions sont réalisées en utilisant des lentivirus produits à partir des plasmides shV3IHSMCG_9403085 (sh085), shV3IHSMCG_9178388 (sh388) et shV3IHSMCG_8787668 (sh668) (Horizon Discovery®). Le shRNA contrôle (shCT) utilisé est le « Non-targeting Control mCMV-Turbo GFP » (Horizon Discovery®). L'efficacité d'extinction transcriptionnelle et protéique de KRAS est testée à l'aide de RT-qPCR et de western-blot. Seuls les sh388 et sh668 sont utilisés pour la suite des expériences, car le sh085 n'a pas éteint efficacement l'expression de KRAS.

Les cellules HOS JQ1R sontensemencées dans une plaque 24 puits afin d'atteindre une confluence d'environ 20 à 30 % au moment de la transduction, faite en présence de polybrène. La quantité de particules virales déposée sur les cellules HOS JQ1R, pour une MOI de 1, est de 3,704 μ L pour le sh388, de 0,563 μ L pour le sh668 et de 0.537 μ L pour le shCT. Les cellules sont ensuite sélectionnées par un traitement à la puromycine (2,5 μ g/mL). La réalisation de tests de viabilité cellulaire effectués sur les lignées d'ostéosarcome traitées avec une gamme de puromycine allant de 0 à 20 μ g/mL a permis de déterminer la dose la plus faible de puromycine permettant d'éliminer la majorité des cellules. Le traitement des cellules avec 1 μ g/mL de doxycycline permet l'induction des shRNA. Cette concentration de doxycycline a été déterminée après avoir validé qu'elle permettait une bonne induction des shRNA, donc une extinction correcte de l'expression de KRAS sans induire d'effets néfastes sur la viabilité cellulaire des cellules transduites.

15. Surexpression de KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S}

Les plasmides de surexpression de KRAS, inductibles à la doxycycline, sont construits au laboratoire. Dans un premier temps, la séquence de KRAS4a^{WT}, issu du plasmide HS.KRAS4a (Addgene) est intégrée dans le plasmide d'entrée pCW57.1 (Addgene). Pour ce faire, les plasmides (HS.KRAS4a et pCW57.1) sont amplifiés, puis clonés et recombinaés à l'aide du kit GatewayTM LR clonaseTM II enzyme mix (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Une minipréparation est réalisée sur 5 des clones obtenus avec le kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide alors construit (pCW57.1-KRAS4a^{WT}) est amplifié par PCR, puis séquencé chez Eurofins. Après avoir vérifié la bonne intégration de la séquence KRAS4a^{WT} dans le plasmide pCW57.1 par séquençage, une maxipréparation est réalisée à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide codant pour KRAS4a^{G12S} est produit à partir du plasmide pCW57.1-KRAS4a^{WT}. La mutation KRAS4a^{G12S} est intégrée dans le plasmide pCW57.1-KRAS4a^{WT} par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Q5® Site-Directed mutagenesis (New England Biolabs), selon les recommandations du fournisseur. Après mutagenèse, les étapes de minipréparation, d'amplification, de séquençage et de maxipréparation sont également réalisées.

Ces deux plasmides de surexpression sont ensuite transduits de manière stable dans 2 lignées d'ostéosarcome, les HOS-MNNG et les MG63. Pour ce faire, les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits afin d'atteindre une confluence d'environ 20 à 30 % au

moment de la transduction. Les cellules sont ensuite transduites avec un volume de 5 μL de particules virales. Les titrations sont réalisées après transduction. Ainsi, les cellules sont transduites avec une MOI de 0.57 pour le KRAS4a^{WT} et 0.27 pour le KRAS4a^{G12S}. Après transduction, les cellules sont sélectionnées par un traitement de puromycine ayant une concentration de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. L'induction de la surexpression de KRAS4a^{WT} ou KRAS4a^{G12S} est réalisée avec 2 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline. Cette concentration de doxycycline a été déterminée après s'être assuré qu'elle n'entraînait pas d'effet néfaste sur la viabilité cellulaire des cellules tumorales. Pour ce faire, la viabilité cellulaire des lignées d'ostéosarcome traitées avec une gamme de doxycycline allant de 0 à 8 $\mu\text{g/mL}$ a été étudiée. De plus, parmi les différentes concentrations de doxycycline testées (0,1,2,4,6 et 8 $\mu\text{g/mL}$), 2 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline est la concentration permettant une expression transcriptionnelle maximale de KRAS.

16. Séquençage d'ARN et traitement des données bio-informatiques

Des quadruplicats biologiques de cellules HOSn et HOS JQ1R sont envoyés en séquençage haut-débit de l'ARN (RNA-seq). Ce séquençage et sa préparation sont réalisés par la plateforme Biogenouest sur un séquenceur Illumina HiSeq dans un format de 2 x 100 bp (PE100) ; en utilisant un kit Qiagen pour la capture des ARN et un kit Agilent pour la préparation de la librairie.

Les adaptateurs des reads sont ensuite enlevés par fastp 0.20.1 [586]. Les reads sont également filtrés sur leur qualité de séquençage, en éliminant les reads ayant plus de 40 % de bases avec un score phred inférieur à 30. Pour l'alignement génomique, STAR 2.7.5a [587] est utilisé avec le génome GRCh38.p13 issu du NCBI (version "analysis set") et avec l'annotation de Ensembl (version 96). Le sashimi plot est construit à partir de cet alignement en utilisant ggsashimi 1.1.5 [588], en affichant uniquement les jonctions représentées au moins 10 fois.

Pour la quantification des transcrits à partir des fichiers produits par fastp, kallisto 0.46.2 [589] est utilisé sur le transcriptome de référence et l'annotation d'Ensembl (version 96). Puis la normalisation et les comparaisons sont effectuées avec DESeq2 1.30.1 [590]. Les transcrits sont considérés comme différentiellement exprimés si leur p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du $\log_2(\text{FoldChange})$ est supérieure à 1. Les analyses de sur-représentation et d'enrichissement des ontologies GO et KEGG sont faites avec clusterProfiler 3.18.1 [591]. Les heatmaps sont produites avec le package ComplexHeatmap 2.6.2 [592].

17. 3'SRP et traitements des données bio-informatiques

Les cellules HOSn (2 réplicats biologiques), HOS JQ1R (4 réplicats biologiques), HOS JQ1R transduites avec le shCT (6 réplicats biologiques) ou le sh388 (4 réplicats biologiques) sont cultivées pendant 96 heures avec ou sans doxycycline (1µg/mL). 25 ng/µL d'ARN de chaque échantillon sont envoyés à la plateforme GenoBiRD afin d'être séquencés.

Les bibliothèques du protocole de profilage 3'seq-ARN (3'SRP) sont préparées à partir de l'ARN de réplicats de chacune des conditions suivantes : HOS (HOSn), HOS JQ1R, HOS JQ1R avec sh388 avec et sans doxycycline (HOS JQ1R sh388 dox et HOS JQ1R sh388 no dox), HOS JQ1R shCT avec et sans doxycycline (HOS JQ1R shCT dox et HOS JQ1R shCT no dox). Les queues poly(A) des ARNm sont marquées avec des adaptateurs universels, des codes-barres bien spécifiques et des identificateurs moléculaires uniques (UMI) pendant la transcription inverse avec changement de modèle. Les ADNc codés avec un code-barre provenant de plusieurs échantillons sont ensuite regroupés, amplifiés et marqués à l'aide d'une approche de fragmentation par transposon qui enrichit les extrémités 3' des ADNc : 200ng d'ADNc complets sont utilisés comme entrée dans le kit Nextera™ DNA Flex Library Prep. Le séquençage est effectué sur un NovaSeq 6000 avec des lectures de 17*-8-105* cycles.

Les adaptateurs sont enlevés par Cutadapt 1.18 [593]. Les reads sont alignés avec BWA 0.7.17 [594] sur le transcriptome d'Ensembl version 96, puis les duplicats de PCR sont enlevés grâce à la méthode directionnelle de umi_tools 1.0.1 [595]. Ils sont quantifiés avec Salmon 1.6.0 [596]. La normalisation et les seuils appliqués ensuite sont identiques à ceux utilisés pour le RNA-seq.

18. Séquençage Sanger

L'ADN total est extrait à partir de culots secs de cellules HOSn et HOS JQ1R à l'aide du Mini-Kit d'ADN génomique PureLink (ThermoFisher Scientific) en suivant le protocole du fabricant. Le fragment d'ADN comportant le gène KRAS est amplifié à l'aide d'une qPCR. La vérification de l'amplification du fragment est réalisée sur gel d'agarose à 1.2 %. Un mix d'ADN (10 ng/µL) et d'amorces (10 µM), référencées dans le tableau XI est envoyé en séquençage chez Eurofins.

Tableau XI : Séquences d'amorces pour le séquençage Sanger

N° séquençage	Nom des amorces	Amorce sens	Amorce anti-sens
1	KRAS	5'- CGCAGAACAGCAGTCTGGCTAT TTA -3'	3'- CCTCTATTGTTGGATCATATTCCCG TCCAC -5'
2	KRASHOSn_cDNA	5'-CATTTTCGGACTGGGAGCGAG -3'	3'-CTCCTCTTGACCTGCTGTGT -5'
	KRASHOSJQ1R_cDNA	5'-CATTTTCGGACCCGGAGCGAG -3'	3'- CTCCTCTTGACCTGTTGTGT-5'

19. Dosage du glucose et du lactate

Les kits de dosage Glucose-Glo™ (Promega) et Lactate-Glo™ (Promega) sont utilisés selon les protocoles des fabricants afin de déterminer les niveaux de glucose et de lactate dans le milieu de culture HOSn et HOS JQ1R. Pour ces expériences, les cellules sont cultivées dans du DMEM à faible teneur en glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose, Sigma-Aldrich).

75 000 cellules HOSn et HOS JQ1R sontensemencées en plaque 6 puits. A 24, 48, 72 et 96 heures, 2µL de milieu de culture sont prélevés et dilués dans 98µL de PBS, puis stockés à -20°C. A ces mêmes temps, les cellules sont comptées. Au moment du dosage de glucose et de lactate, les différents échantillons sont décongelés et de nouveau dilés dans 100 µL de PBS. Les réactifs des deux kits sont préparés, selon les instructions du fournisseur. 50 µL d'échantillon et 50 µL de réactif sont déposés dans un puits dans une plaque 96 puits noire à fond noir. Cette plaque est agitée pendant 1 minute, puis incubée 60 minutes à température ambiante. La luminescence est mesurée à l'aide du TriStar LB 941 (BERTHOLD Technologies). La normalisation est faite en fonction du nombre de cellules, permettant ainsi d'obtenir une valeur en UA/nombre de cellules.

20. Seahorse

Un kit de mitose cellulaire Seahorse XF et un mini-analyseur Seahorse XF HS (Agilent) sont utilisés pour détecter le taux de consommation d'oxygène (OCR), et le taux d'acide extracellulaire (ECAR). Les cellules sontensemencées dans une plaque 8 puits à raison de 17 500 cellules par puits pour les HOSn et 20 000 cellules par puits pour les HOS JQ1R et incubées pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS, puis avec du milieu Sigma contenant du glucose (25 mM), de la glutamine (4 mM), du pyruvate (1,25 mM). 180 µL de

milieu Sigma sont ajoutés dans chaque puits et de l'oligomycine (1 μ M), du CCCP (carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone) (1,5 μ M), de la roténone (1 μ M) et de l'antimycine A (1 μ M) sont injectés automatiquement pour mesurer l'OCR et l'ECAR. Les valeurs OCR et ECAR sont calculées après normalisation par rapport au nombre de cellules HOSn et HOS JQ1R et sont représentées sous forme de moyenne +/- SD.

21. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase

L'activité de la lactate déshydrogénase est mesurée avec le kit Lactate Dehydrogenase Activity Assay (Sigma-Aldrich). Les cellules HOSn et HOS JQ1R sont homogénéisées dans du tampon de dosage lactate dehydrogenase (LDH) froid. Les composés insolubles sont ensuite éliminés via une centrifugation à 10 000g pendant 15 minutes à 4°C. La fraction soluble est utilisée pour le dosage. Pour une réaction, 48 μ L de tampon sont mélangés à 2 μ L de substrat LDH. 50 μ L de ce réactif sont ajoutés à 25 μ L d'échantillon et 25 μ L de tampon. En parallèle une gamme allant de 0 à 12.5 nmole/puits de NADH est réalisée. Une première mesure d'absorbance à 450 nM est réalisée après 2 à 3 minutes d'incubation. Des lectures sont ensuite réalisées toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que la valeur de l'échantillon le plus actif soit supérieure à la valeur de la gamme la plus élevée (12.5 nmoles/puits). La mesure finale, pour le calcul de l'activité enzymatique est l'avant-dernière lecture. Afin de déterminer l'activité enzymatique, le bruit de fond, obtenu par la valeur 0 nmole/puits de la gamme, est tout d'abord soustrait de chaque échantillon, puis la différence entre la mesure initiale et la mesure finale est calculée. Cette valeur est ensuite comparée à celles obtenues avec la gamme dans le but de déterminer la quantité de NADH générée. L'activité enzymatique est ensuite calculée selon la formule suivante : $\text{activité enzymatique}_{\text{nmole/min/mL}} = (\text{quantité de NADH généré}_{\text{nmole}} / (\text{temps de réaction}_{\text{minutes}} * \text{volume de d'échantillon}_{\text{mL}})) * \text{facteur de dilution}$.

22. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Version6). Le risque α considéré est de 5% (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$).

En ce qui concerne les analyses *in vitro*, des tests statistiques ANOVA 2 voies en comparaisons multiples sont réalisés pour comparer les moyennes des réplicats biologiques.

Pour les tests de métabolisme, notamment la quantification transcriptionnelle de LDHA et la mesure de son activité, le test Mann Whitney est utilisé.

In vivo, un test ANOVA 2 voies est réalisé avec les valeurs de progression de la tumeur (volume de la tumeur à J33 - volume de la tumeur à J12 après injection). Des tests t de Student non appariés entre les groupes "JQ1" et "chloroquine + JQ1" sont également réalisés pour rendre compte d'un éventuel effet bénéfique significatif de la combinaison du JQ1 et de la chloroquine par rapport au JQ1 seul à différents jours de traitement.

Chapitre I : L'inhibition des protéines à Bromodomaine et domaine ExtraTerminal induit l'autophagie dans l'ostéosarcome

1. Introduction

Récemment, plusieurs études ont montré que les traitements anti-cancéreux induisent l'autophagie. Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans le traitement anti-tumoral est controversé, puisque son induction augmente ou diminue l'activité anti-cancéreuse des traitements. L'autophagie joue donc un double rôle dans le développement du cancer. D'une part, certaines études montrent un effet anti-tumoral due à l'induction de l'autophagie. D'autre part, l'induction de l'autophagie peut être cytoprotectrice pour les cellules tumorales et ainsi limiter l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Il semblerait que ce processus biologique agisse comme un mécanisme suppresseur de tumeur seulement à des stades précoces de la tumorigenèse. A des stades plus avancés du développement du cancer, l'autophagie serait pro-tumorale et agirait alors comme un promoteur de tumeur. L'autophagie constitue alors une cible potentielle pour le traitement du cancer [597,598]. A des stades précoces de développement tumoral, l'autophagie pourrait être activée dans le but d'amplifier son effet anti-tumoral et, à l'inverse, elle pourrait être inhibée à des stades plus tardifs de la tumorigenèse dans le but de, cette fois-ci, le limiter.

Tout comme dans les traitements conventionnels tels que la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore l'endocrinologie, l'autophagie est induite par les inhibiteurs de protéines BET dans différentes lignées tumorales [460,562]. L'induction par le JQ1 d'un mécanisme autophagique pro-survie a par exemple été montré dans le cancer de l'ovaire [599].

La première partie de ma thèse a pour but d'étudier l'effet anti-tumoral de l'inhibition de l'autophagie, amplifiée dans les cellules traitées par les inhibiteurs de protéines BET, en combinaison ou non avec des inhibiteurs de protéines BET, dans l'ostéosarcome.

Même s'ils ont été rédigés en français les résultats de cette partie de thèse ont été mis en format papier et, après que les expériences aient été répétées au moins 2 fois, ils feront l'objet d'une soumission.

2. Résultats

Article en préparation

L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse primaire la plus répandue, touchant principalement les enfants et les adolescents avec un pic d'incidence à 18 ans [82]. Depuis les années 1970, l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques a amélioré le taux de survie des patients atteints d'OS [127,171]. Cependant, le taux de survie à 5 ans des patients présentant une mauvaise réponse, des métastases au moment du diagnostic ou une maladie récurrente (20 % des patients) chute dramatiquement à 20%. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire, telles que les inhibiteurs des protéines à bromodomaine et domaine extra-terminal (BET), qui se sont avérés être une approche thérapeutique prometteuse dans divers cancers [450].

Les protéines BET sont des lecteurs épigénétiques de l'acétylation des histones impliqués dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation transcriptionnelle de multiples gènes. Les protéines BET et, en particulier, BRD4 sont impliquées dans des maladies humaines, dont le cancer. En effet, les niveaux de BRD4 sont augmentés dans diverses tumeurs incluant l'OS [331], induisant une expression aberrante des gènes liés à la survie et à la croissance [460]. Les protéines BET sont donc devenues des cibles potentielles et attractives pour le traitement de nombreuses maladies comme le cancer [301].

Des inhibiteurs compétitifs des protéines BET bloquent la liaison des protéines BET à la chromatine et empêchent la transcription d'oncogènes clés. L'inhibition des protéines BET entraîne ainsi l'inactivation transcriptionnelle de plusieurs voies oncogènes tels que c-MYC [300], YAP [356], NOTCH3 [13,14] et RUNX2 [5]. Les inhibiteurs de protéines BET ont montré leur efficacité dans de nombreuses tumeurs hématologiques et solides [302,423]. Dans l'OS, l'inhibiteur BET, JQ1, a montré une efficacité thérapeutique *in vitro*, en réduisant la viabilité des lignées cellulaires d'OS, mais aussi dans des modèles précliniques en retardant la croissance tumorale et en prolongeant la survie des animaux [5]. Néanmoins, les cellules cancéreuses peuvent s'adapter aux traitements par l'activation de voies de signalisation ou l'induction de processus biologiques pour et ne pas répondre au traitement. Par exemple, il est décrit que l'inhibition de protéines BET par JQ1 induit l'autophagie via l'activation de la voie Akt/mTOR dans les cancers de l'ovaire, rendant les cellules tumorales résistantes aux inhibiteurs de protéines BET [599].

L'autophagie est un système d'auto-dégradation conservé qui est essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions de stress. Ce mécanisme biologique joue un rôle complexe dans le cancer puisqu'il peut empêcher l'accumulation de protéines et d'organites endommagés afin de diminuer l'activité tumorale, mais il peut également fournir aux cellules tumorales des nutriments qui les aident à survivre et à se développer plus rapidement [562]. En effet, certaines études ont

montré que les thérapies anticancéreuses telles que la chimiothérapie, la radiothérapie et l'endocrinothérapie induisent l'autophagie dans les cellules cancéreuses, mais les résultats concernant la relation entre l'autophagie et l'effet thérapeutique restent controversés [570]. Certaines études ont montré que l'autophagie joue un rôle protecteur pour les cellules tumorales vis-à-vis de certains médicaments et favorise la survie de certaines lignées cellulaires cancéreuses [18-24], menant au développement de résistance aux traitements [25].

Dans cette étude, nous confirmons que JQ1 induit l'autophagie dans des lignées cellulaires d'OS. De plus, nous démontrons pour la première fois que l'inhibition de l'autophagie avec différents inhibiteurs chimiques et l'utilisation de JQ1 bloquent de manière synergique la prolifération tumorale et induisent l'apoptose *in vitro* dans différentes lignées d'OS, et ralentissent la progression tumorale *in vivo* dans un modèle préclinique d'OS.

Matériels et méthodes :

Réactifs :

La chloroquine (CHQ) provient de Sigma-Aldrich et est dissoute dans l'eau à une concentration de 5 mM. La bafilomycine (Baf-A) et la 3-méthyladénine (3-MA), provenant de Sigma-Aldrich, sont dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) à des concentrations de 100 μ M et 100 mM, respectivement. Tous ces inhibiteurs de l'autophagie sont stockés à -20°C.

Le JQ1 (Laboratoire Qi) est donné au laboratoire par Jun Qi (Dana-Farber Cancer Institut). Pour les études *in vitro*, JQ1 est préparé à une concentration de 40 mM dans du DMSO et stocké à -20°C. Pour les études *in vivo*, JQ1 est également dissous dans du DMSO à 50 mg/mL, puis dilué dans de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD, Sigma-Aldrich) à 10 % pour obtenir une dose finale de 50 mg/kg, et conservé à 4 °C. Le HP- β -CD à 10 % est préparé dans de l'eau stérile filtrée avec un filtre de 0,22 μ m.

Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires d'OS HOS-MNNG, 143B, U2OS et KHOS proviennent de l'American Type Culture Collection. Les cellules sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) complémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest). Les cellules sont incubées dans

une atmosphère humide à 37°C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air. La culture cellulaire est réalisée dans des conditions stériles.

Test de viabilité cellulaire :

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à J0. A J1, les cellules sont traitées ou non pendant 96 heures aux concentrations indiquées. Les cellules sont ensuite fixées pendant 5 minutes avec du glutaraldéhyde à 10 % (Sigma-Aldrich) et sont colorées pendant 5 minutes avec 50 µL de cristal violet à 0,1 % (Sigma-Aldrich). Après 24 heures de séchage, la coloration au cristal violet est solubilisée dans une solution de Sorensen (9mg de citrate trisodique, 305 mL d'eau distillée, 195 mL de HCl 0,1N et 500 mL d'EtOH 90 %) et l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide du Victor2 (Perkin Elmer).

Test de synergie :

Les cellules sontensemencées et traitées avec des concentrations croissantes de chaque drogue seule (CHQ, Baf-A, 3-MA ou JQ1) ou en combinaison (JQ1 combiné à CHQ, 3-MA ou Baf-A), selon un ratio constant entre les deux drogues pendant 72h, puis une coloration au cristal violet est réalisée comme décrit précédemment afin d'évaluer les effets induits. L'effet sur la viabilité cellulaire et la concentration de traitement utilisée sont renseignés dans le logiciel Calcsyn (Version 1.1). Ce logiciel détermine ensuite l'indice de combinaison (IC) à différentes doses-effets (DE) selon la méthode de Chou-Talalay [584]. Un IC inférieur à 1 correspond à un effet synergique des deux traitements combinés, comparativement à l'effet antagoniste caractérisé par un IC supérieur à 1. Un IC égal à 1 détermine un effet additif.

Tests de clonogénicité :

Les cellules subissent un prétraitement de 48 heures avec des inhibiteurs d'autophagie et/ou avec JQ1. À la fin de la période de traitement, les cellules sont trypsinées, comptées et réensemencées à 1 000 cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Le milieu sans traitement est changé tous les deux jours. Les colonies sont fixées avec du glutaraldéhyde à 10% (Sigma-Aldrich) après 14 jours de culture et sont colorées avec du cristal violet à 0,1% (Sigma-Aldrich). Les plaques sont ensuite photographiées.

Extraction d'ARN et qPCR :

L'ARN total est extrait des cellules à l'aide du kit NucleoSpin® RNA plus (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fabricant. Un µg d'ARN est ensuite transcrit de manière inverse à l'aide du kit Maxima™ H Minus First Strand cDNA synthesis (ThermoFisher Scientific). La PCR quantitative en temps réel est réalisée sur 20 ng/µL d'ADNc à l'aide du système de PCR en temps réel QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher Scientific) avec du SYBR® Select Master Mix (Life Technologies) et les amorces d'ADN, répertoriées dans le tableau 1. L'expression des gènes cibles est normalisée par rapport au niveau de Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase (hPRT) et de β-2-Microglobuline (B2M) dans les échantillons respectifs. La méthode comparative du seuil de cycle (Ct) est utilisée pour déterminer la quantité relative des ARNm cibles. La comparaison de l'expression relative normalisée des gènes cibles est réalisée à l'aide de la méthode de calcul 2-ΔΔCt.

Nom des amorces	Sens	Anti-sens
B2M	5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	3'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-5'
hPRT	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACC-3'	3'-CGAGCAAGACGTTCACTCCT-5'
SQSTM1	5'-TGCCCAGACTACGACTTGTG-3'	3'-GAGAAGCCCTCAGACAGGTC-5'

Séquences d'amorces pour la RT-qPCR quantitative.

Extraction protéique et western-blot :

Les cellules, sous forme de culot cellulaire, sont lysées pendant 30 minutes avec 30 à 100 µL, selon les culots cellulaires, de tampon Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA, Santa-Cruz) contenant un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (PIC), du fluorure de phénylméthyl-sulfonyl (PMSF) et de l'orthovanadate de sodium (NAVO₄) (Santa Cruz). Les lysats cellulaires sont débarrassés des débris cellulaires par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'un dosage colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma-Aldrich), conformément aux instructions du fabricant, l'absorbance étant mesurée à 562 nm à l'aide du lecteur de plaques Victor2 (Perkin Elmer). Les protéines (30 µg) sont dénaturées par le tampon Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glycérol, 5 % 2-mercaptoéthanol, et 0.001 % de bleu de bromophénol) à 95°C pendant 5 minutes, avant d'être séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 100 V pendant 3 heures à température ambiante et transférées sur une membrane de transfert de 0,45 µm en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Immobilon-FL, Merck Millipore) à 30 V pendant une nuit à 4°C. La membrane est séchée pendant 10 minutes à 37°C, est réactivée dans du méthanol puis saturée pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon de saturation TBS-tween (intercept®, LI-COR). La membrane

est incubée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires dans ce même tampon de saturation. Les protéines cibles sont détectées par analyse western blot avec les anticorps LC3B (1/1000 ; Cell Signaling Technology ; 3868) et vinculine (1/5000 ; Cell Signaling Technology ; 13901). Après des lavages de 3x10 minutes avec du TBS-Tween 1X, la membrane est incubée 1 heure à l'obscurité avec les anticorps secondaires : Goat anti-rabbit (IRDye® 800CW; 926-32211, LI-COR) and Goat anti-mouse (IRDye® 680RD; 926-68071; LI-COR) dilués au 1/20000. La liaison des anticorps est visualisée avec le système de fluorescence (Odyssey FC, LI-COR).

Mesure de l'activité des caspases 3 et 7 :

L'activité des caspases-3 et -7 est évaluée à l'aide du kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). Le réactif du kit est préparé en diluant au 1/100^{ème} le substrat pro-fluorescent des caspases-3 et -7, la rhodamine, dans du tampon bifonctionnel de lyse et d'activité cellulaire. 25 µL de ce réactif sont ajoutés à 10 µL de lysats cellulaires totaux, préalablement dosés à l'aide du kit de dosage de l'acide bicinchoninique (BCA) (Sigma-Aldrich), conformément aux instructions du fabricant, et dilués dans 15 µL de tampon Radio-Immuno-Precipitation Assay (RIPA, Santa-Cruz). Après 3 heures d'incubation, la fluorescence à 521 nm est mesurée avec le TriStar LB 941 (BERTHOLD Technologies). La quantité de produit fluorescent généré est représentative de la quantité de caspases-3 et -7 actives présente dans l'échantillon. La normalisation est faite à l'aide des concentrations déterminées lors du dosage protéique de chaque échantillon, permettant ainsi d'obtenir une valeur en Unité Arbitraire/µg de protéines (UA/µg de protéines).

Immunofluorescence et microscopie confocale :

10 000 cellules sontensemencées en plaque Ibidi µ-Slide 8-puits (ibidi) pendant 24h. Les cellules sont traitées avec 1 µM de JQ1 pendant 24 heures et/ou 50 µM de chloroquine pendant 4 heures. Les cellules sont fixées avec une solution froide de méthanol, acétone 3 % pendant 10 minutes à -20°C, puis les cellules sont perméabilisées avec du PBS Triton 0,3 % pendant 10 minutes. La saturation est réalisée avec du PBS 3 % de lait écrémé en poudre pendant 30 minutes. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine LC3-B (3868S, Cell signaling) dilué à 1/300 dans du PBS, 1 % BSA est incubé pendant la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire, Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG (Invitrogen), dilué au 1/500 dans du PBS, 0,1 % Triton, 2 % sérum de chèvre, 1 % BSA, est incubé 1 heure à température ambiante. Le DAPI (Sigma-Aldrich) dilué au 1/5 000 dans du PBS est incubé 15 minutes sous agitation.

Du milieu de montage Ibidi (ibidi) est placé dans chaque puits. Les images sont acquises à l'aide d'un microscope confocal (NIKON Eclipse Ti) et traitées avec ImageJ.

Expérimentations *in vivo* :

Des souris nudes NMRI femelles âgées de 4 semaines provenant de la société Janvier sont utilisées pour les expériences *in vivo*, conformément aux recommandations des structures en charge du bien-être animal (SBEA) et en accord avec le comité d'éthique (saisine Apafis #8405). Après 1 semaine d'acclimatation dans l'animalerie, 1,5 millions de cellules HOS-MNNG négatives pour les mycobactéries sont injectées par souris dans la région paratibiale. Les souris sont réparties au hasard en 4 groupes de traitement, avec 8 souris par groupe : "contrôle", "chloroquine", "JQ1" et "chloroquine + JQ1". JQ1 et la chloroquine sont injectés par voie intra-péritonéale à des concentrations de 50 mg/kg/jour et 25 mg/kg/jour, respectivement. Le volume tumoral est mesuré sur chaque souris tous les 2 ou 3 jours, selon le calcul : longueur*largeur*épaisseur/0,5236. Lorsque le volume tumoral atteint 2000 mm³ (point final) ou après 24 jours de traitement (fin de l'expérience), les souris sont sacrifiées et les tumeurs sont prélevées pour réaliser une étude histologique.

Histologie et immunohistochimie :

Les tumeurs collectées sont fixées 48h en formol 4 % puis incluses en paraffine. Des coupes sériées de 2µm sont réalisées sur 2 niveaux (Leica Microsystems). Les lames suivantes sont immunomarquées afin d'évaluer la prolifération cellulaire (antigène Ki67, Dako, 1:100), l'apoptose (caspase 3 clivée, Cell Signaling Technologies, 1:200), et le processus d'autophagie (LC3B / p62, Cell Signaling Technologies cat nb. 3868S / 5114S, 1:200). Après déparaffinage, les coupes sont réhydratées et le démasquage antigénique réalisé à chaud (Tampon citrate pH6 (Ki67, et caspase 3 clivée) ou Tampon Tris/EDTA pH9 (LC3B et p62)). L'activité des peroxydases endogènes est inhibée par incubation avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (Gifère) et les sites de fixation non-spécifiques sont saturés avec une solution contenant 2 % de sérum d'âne non-immun, 1 % de BSA, dilué en TBS tween 0,05 % pH 7,4. L'anticorps primaire, dilué en solution de saturation, est incubé 1h à température ambiante et les complexes immuns sont détectés à l'aide d'un système ABC (anticorps secondaire biotynilé et streptavidine-Peroxydase). La révélation est réalisée avec la DAB (3, 3'-diaminobenzidine). Les lames sont enfin contre-colorées à l'hématoxyline de Gill-2, déshydratées, éclaircies et montées entre lames et lamelles au Pertex. L'acquisition des colorations et immunomarquages est réalisée à l'aide d'un scanner de lames (Nanozoomer, Hamamatsu). Pour chacun des trois immunomarquages les images

réalisées dans un champ représentatif du front de progression tumorale, ont été exportées à partir du fichier brut à un grossissement de x10 et au format *.tiff. Sur chacune des images des marquages Ki67 le profil d'intensité de marquage des noyaux de toutes les cellules du champ a été évalué en 4 populations : les fortes intensités, les intermédiaires, les faibles, et les négatives. Cette représentation permet de respecter le niveau d'expression du Ki67 au cours du cycle cellulaire [585]. Pour ce faire après avoir réalisé une déconvolution d'image en 3 canaux (Plugin Colour Deconvolution, ImageJ), le canal correspondant au signal DAB+ (marron, pseudo niveau de gris) a été seuillée en prenant comme référence la plus forte intensité de marquage du champ. Puis de manière semi-automatisée, après plusieurs étapes de seuillage et segmentation, les éléments (noyaux) sont dénombrés. La distribution de chacune des populations est ensuite ramenée au nombre total de noyaux du champ analysé. Pour l'étude du marquage de la caspase 3 clivée, l'analyse est évaluée par le pourcentage d'aire dans la région d'intérêt après seuillage du signal DAB+ et en mesurant l'aire positive ainsi obtenue.

Analyses statistiques :

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. Version6). Le risque α considéré est de 5 % (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, ***= $p<0,001$; ****= $p<0,0001$). Pour les analyses *in vivo*, un test ANOVA à 2 voies est réalisé avec les valeurs de progression tumorale (volume tumoral à J33 - volume tumoral à J12 après injection). Des tests t de Student non appariés entre les groupes "JQ1" et "chloroquine + JQ1" sont également réalisés pour mettre en évidence un éventuel effet bénéfique significatif de l'association de JQ1 et de la chloroquine par rapport au JQ1 seul à différents jours de traitement.

Résultats :

JQ1 induit l'autophagie *in vivo*.

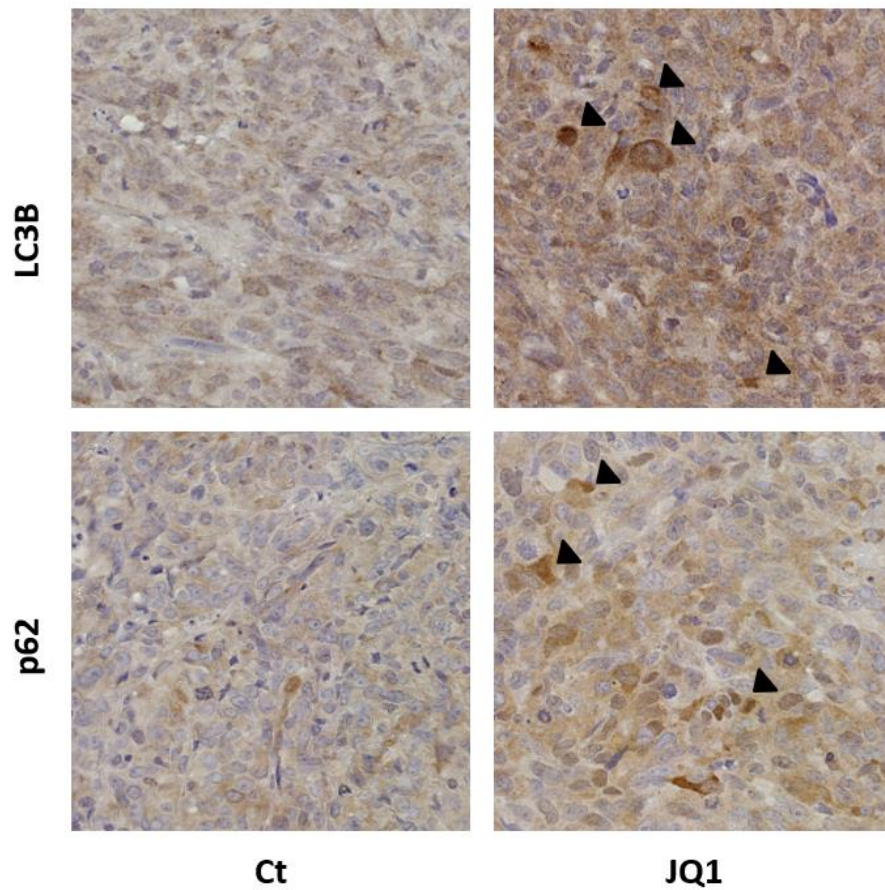


Figure 22 : JQ1 induit l'autophagie in vivo. Détection immunohistochimique des marqueurs autophagiques LC3B et p62 au sein de tumeurs murines d'OS ayant été traitées ou non avec du JQ1.

Comme rapporté dans la littérature pour d'autres types tumoraux, nous avons confirmé dans l'ostéosarcome chez la souris que le traitement avec du JQ1 augmente l'autophagie comme montré par l'expression forte de LC3-II et p62 dans les conditions traitées JQ1 comparativement aux conditions non traitées (Figure 22).

JQ1 induit l'augmentation du flux autophagique dans différentes lignées cellulaires d'OS

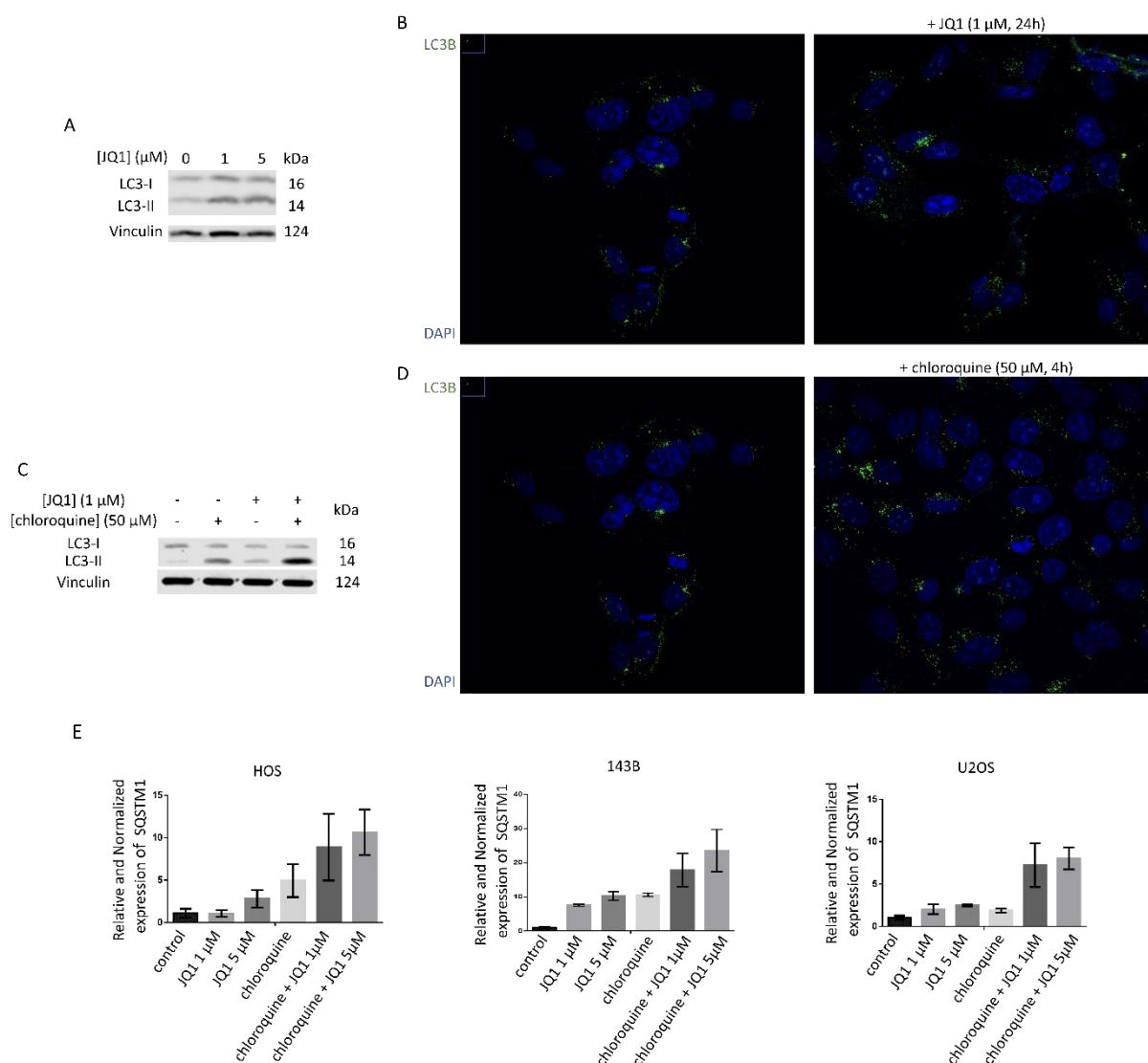
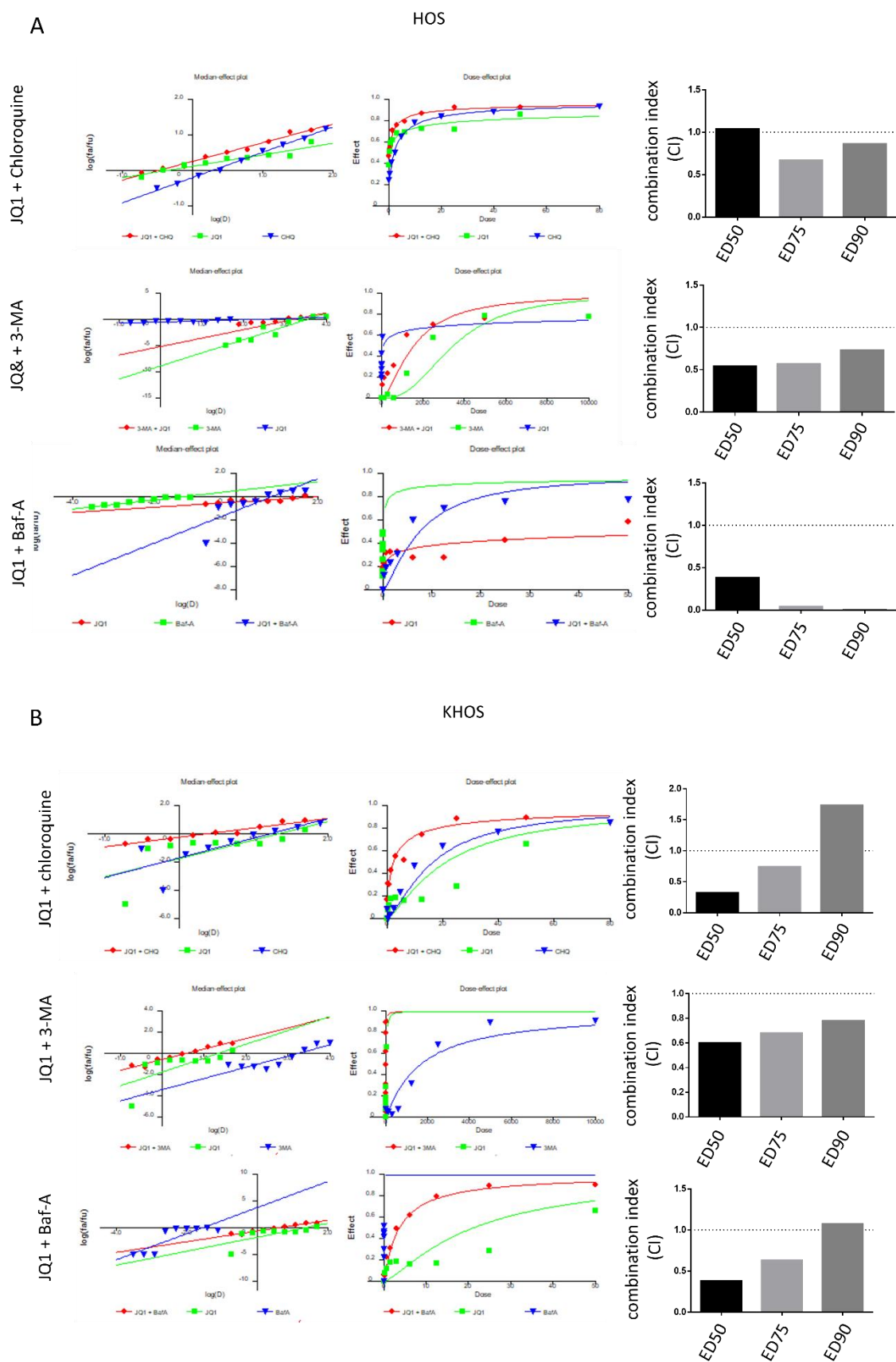


Figure 23 : JQ1 induit l'augmentation du flux autophagique dans différentes lignées cellulaires d'OS. (A) Estimation du flux autophagique par observation de l'accumulation du marqueur des autophagosomes LC3B-II dans les cellules HOS traitées ou non avec 1 ou 5 μM de JQ1 durant 24h par Western Blot. La vinculine est utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Observation des « puncta » LC3B (structures LC3B-II positives), permettant de visualiser les autophagosomes/autolysosomes dans les cellules HOS-MNNG traitées ou non avec 1 μM de JQ1 pendant 24h. Marquage de LC3 (en vert) par immunofluorescence, et coloration des noyaux avec du DAPI (en bleu). Chaque point vert indique la présence d'un autophagosome/autolysosome. Observation par microscopie confocale au grossissement ×60. **(C)** Expression protéique de LC3B-II dans les cellules HOS traitées ou non avec 1 μM de JQ1 durant 24h en présence ou non de 50 μM de chloroquine durant 4h par western blot. **(D)** Marquage de LC3B (en vert) dans la lignée cellulaire HOS traitées avec 50 μM de chloroquine durant 4h par immunofluorescence. **(E)** Expression transcriptionnelle du gène SQSTM1 analysée par RT-qPCR dans les cellules HOS, 143B, U2OS traitées ou non avec 1 ou 5 μM de JQ1 pendant 24h et/ou 50 μM de chloroquine durant 4h. Moyenne des expressions normalisées relatives (méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$, +/- sd).

Afin d'étudier l'effet de JQ1 sur le taux autophagique des cellules d'OS, les cellules HOS-MNNG ont été traitées ou non avec 1 ou 5 μM de JQ1 durant 24h et l'accumulation du marqueur des autophagosomes LC3B-II a été évalué (Figure 23A). Les résultats montrent JQ1 augmente de manière dose-dépendante l'expression protéique de LC3B-II comparativement au contrôle. De plus, le marquage par immunofluorescence de LC3B dans la lignée HOS-MNNG montre une augmentation du nombre de puncta LC3B positifs (punctas en vert) comparativement au contrôle non-traité (Figure 23B), reflétant ainsi une augmentation du nombre d'autophagosomes/autolysosomes dans les cellules HOS-MNNG traitées avec JQ1.

Afin de déterminer si l'augmentation de ce taux autophagique est également associée à une activité autophagique plus importante et non à un défaut de l'autophagie, nous avons combiné JQ1 à la chloroquine (CHQ), molécule connue pour inhiber la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Nos résultats montrent que 1 μM de JQ1 (durant 24h) combiné à 50 μM de CHQ durant 4h induit une accumulation de l'expression protéique de LC3B-II dans la lignée HOS-MNNG comparativement au contrôle (Figure 23C). De plus, une forte accumulation de punctas LC3B est observée dans les cellules HOS-MNNG traitées avec CHQ (Figure 23D) comparativement au nombre de punctas présents lors du traitement des cellules avec du JQ1 (Figure 23B). Enfin, pour connaître l'effet du JQ1 sur l'autophagie nous avons étudié l'expression transcriptionnelle du gène SQSTM1 codant pour la protéine p62, protéine cargo contenue dans l'autophagosome (Figure 23E). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de SQSTM1 d'un facteur 3 à 10 lors du traitement des cellules d'OS HOS, 143B et U2OS avec 5 μM de JQ1. L'expression transcriptionnelle de ce gène suit globalement la même augmentation dans les différentes lignées cellulaires lors du traitement des cellules avec CHQ. Toutefois, l'expression de SQSTM1 est 2 à 3 fois plus importante lorsque le traitement des cellules avec 5 μM de JQ1 est associé à CHQ comparativement aux conditions traitées seules. Ces résultats démontrent donc une augmentation du flux autophagique des cellules d'OS lors du traitement avec JQ1.

L'inhibition de l'autophagie potentialise les effets antitumoraux du JQ1 dans l'OS



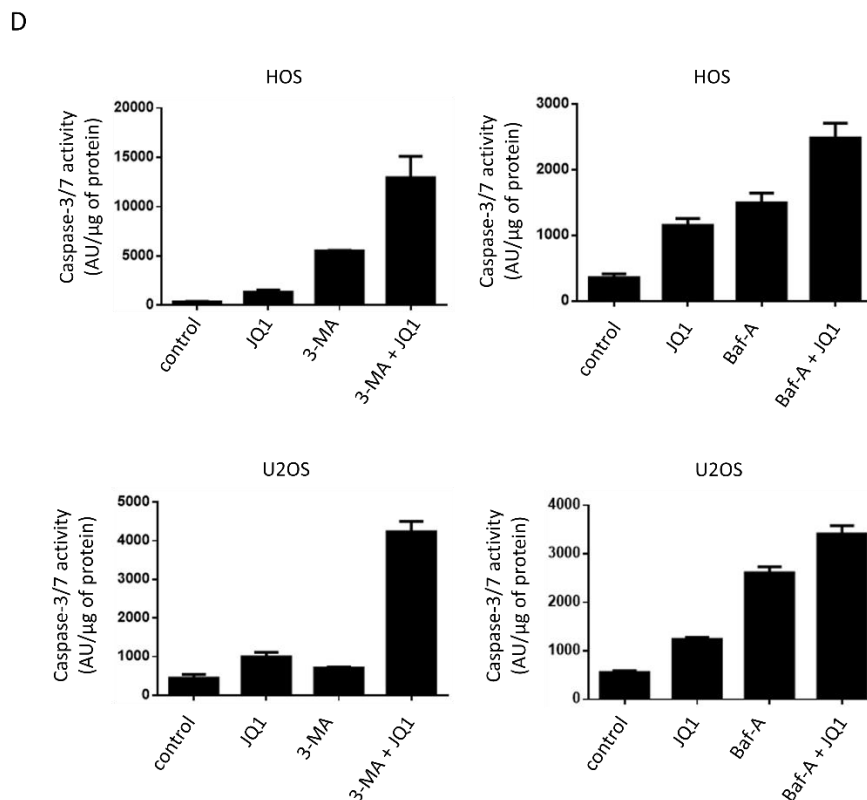
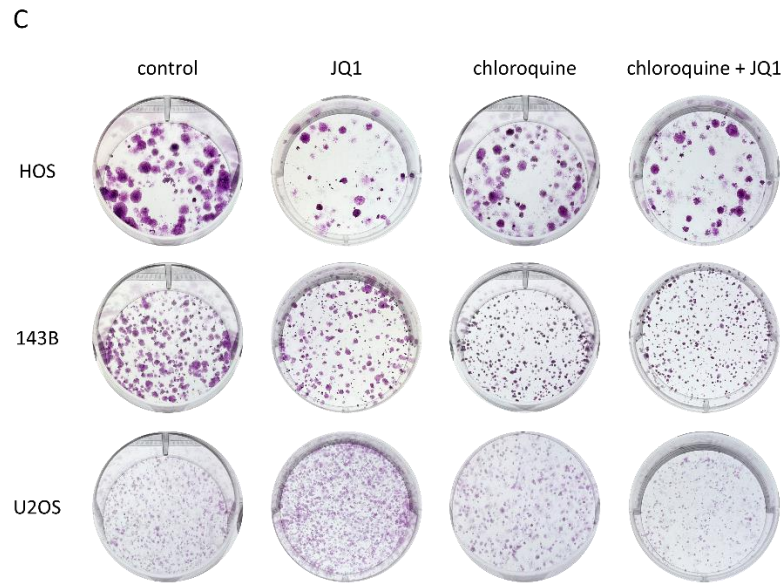


Figure 24 : L'inhibition de l'autophagie potentialise l'effet de JQ1 des lignées d'OS. (A) Tests de synergie de JQ1 avec des inhibiteurs de l'autophagie, la chloroquine (CHQ), la 3-méthyladénine (3-MA) et la bafilomycine-A (Baf-A) sur la viabilité cellulaire des cellules HOS ou des (B) U2OS ensemencées à 2 500 cellules par puits en plaque 96 puits, pendant 96h, suivi d'une coloration au cristal. Les courbes et les valeurs de dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay. (C) Tests clonogéniques des cellules HOS, 143B et U2OS prétraitées pendant 48h avec 1 μ M de JQ1, combiné ou non avec 20 μ M de chloroquine puis comptées et

ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 14 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées. (D) Mesure de l'activité des caspases 3/7 (AU/ μ g de protéine) dans les lysats protéiques des cellules HOS et U2OS traitées ou non avec 1 μ M de JQ1 seul ou en combinaison avec 1mM de 3-MA ou 10 nM de Baf-A pendant 48h.

Dans le but d'étudier les effets de l'inhibition de l'autophagie, induite après un traitement au JQ1, les cellules d'ostéosarcome ont été traitées avec des inhibiteurs chimiques de l'autophagie. L'inhibition de l'autophagie par CHQ ne semble pas diminuer la capacité clonogénique des cellules HOS-MNNG et U2OS, comparativement à la condition contrôle. En revanche, la capacité des cellules HOS semble diminuée suite à un traitement au JQ1. Seule la capacité clonogénique des cellules 143B semble être légèrement diminuée après un traitement CHQ. Le traitement au JQ1 semble également inhiber la capacité clonogénique des cellules 143B (Figure 24C). De plus, l'activité des caspases 3 et 7 dans les cellules HOS-MNNG et U2OS semble être augmentée d'un facteur 2 à 3 comparée à celle des cellules non-traitées. Dans les cellules HOS-MNNG, il semblerait que l'inhibition de l'autophagie induise une augmentation de l'activité des caspases plus importante que le traitement au JQ1. En effet, dans ces cellules, l'inhibition de l'autophagie par 3-MA ou Baf-A augmente respectivement de 8 et 3.5 l'activité des caspases 3 et 7. Dans les cellules U2OS, le traitement avec 3-MA ne semble pas induire d'apoptose puisque l'activité des caspases 3 et 7 est identique à celle des cellules non-traitées. En revanche, l'inhibition de l'autophagie avec Baf-A augmente 4,5 fois l'activité des caspases 3 et 7 (Figure 24D). Ainsi, de manière générale, l'inhibition de l'autophagie induit l'apoptose dans des lignées cellulaires d'OS. Afin de savoir si la combinaison du JQ1 avec des inhibiteurs de l'autophagie pourrait amplifier la réponse antitumoral dans les cellules d'OS et devenir une alternative thérapeutique dans le traitement de l'OS, les cellules ont été traitées avec le JQ1 combiné aux inhibiteurs de l'autophagie. Nos résultats montrent que, de manière générale, la combinaison du JQ1 avec CHQ, 3-MA ou encore Baf-A réduit de manière synergique la prolifération cellulaire, et ce pour des doses-effets de 50 %, 75 % ou 90 % présentant des $IC_{50} < 1$. Seule la combinaison du JQ1 avec la chloroquine à la dose-effet de 50 % semble avoir un effet antagoniste ($IC_{50} > 1$) sur la prolifération cellulaire des cellules HOS-MNNG (Figure 24A). Dans les cellules KHOS, l'association du JQ1 et de CHQ ou Baf-A montre un effet antagoniste sur la prolifération cellulaire à une doses-effet de 50 % ($IC_{50} > 1$), alors que cet effet est synergique pour des doses-effet de 75 % et 90 % ($IC_{50} < 1$). Pour des doses-effet de 50 %, 75 % et 90 % la combinaison du JQ1 avec 3-MA diminue la prolifération cellulaire de manière synergique (Figure 24B). La combinaison de JQ1 avec CHQ diminue la capacité clonogénique des cellules d'OS, comparativement à la capacité clonogénique des cellules tumorales non-traitées. La capacité clonogénique des cellules HOS-MNNG suite au traitement combiné de JQ1 et de la chloroquine semble être identique à celle obtenue après

un traitement à la chloroquine et plus importante qu'après un traitement au JQ1. Dans ces cellules, l'inhibition de l'autophagie ne semble pas potentialiser l'effet du JQ1 sur la capacité clonogénique des cellules. En revanche, la combinaison du JQ1 avec CHQ semble diminuer la taille des clones des cellules 143B, comparativement à la taille des cellules traitées avec du JQ1 ou non-traitées. De plus la capacité clonogénique des cellules U2OS semble être diminuée après un traitement combiné de JQ1 + CHQ comparativement aux cellules non-traitées, traitées au JQ1 seul ou à la CHQ seule (Figure 24C). Il semblerait donc que la combinaison du JQ1 avec des inhibiteurs de l'autophagie diminue la taille des clones ou diminue la capacité clonogénique des cellules d'OS. Les traitements combinés JQ1 + Baf-A ou JQ1 + 3-MA augmentent d'un facteur allant de 6 à 19 l'activité des caspases 3 et 7 dans les cellules HOS-MNNG et U2OS. De plus, l'activité des caspases 3 et 7 est plus importante suite à un traitement combiné de JQ1 et d'inhibiteurs de l'autophagie comparativement aux traitements seuls (Figure 24D). L'induction de l'apoptose dans les lignées d'OS est augmentée après un traitement combinant JQ1 à des inhibiteurs de l'autophagie.

L'inhibition de l'autophagie potentialise l'effet antitumoral du JQ1 in vivo

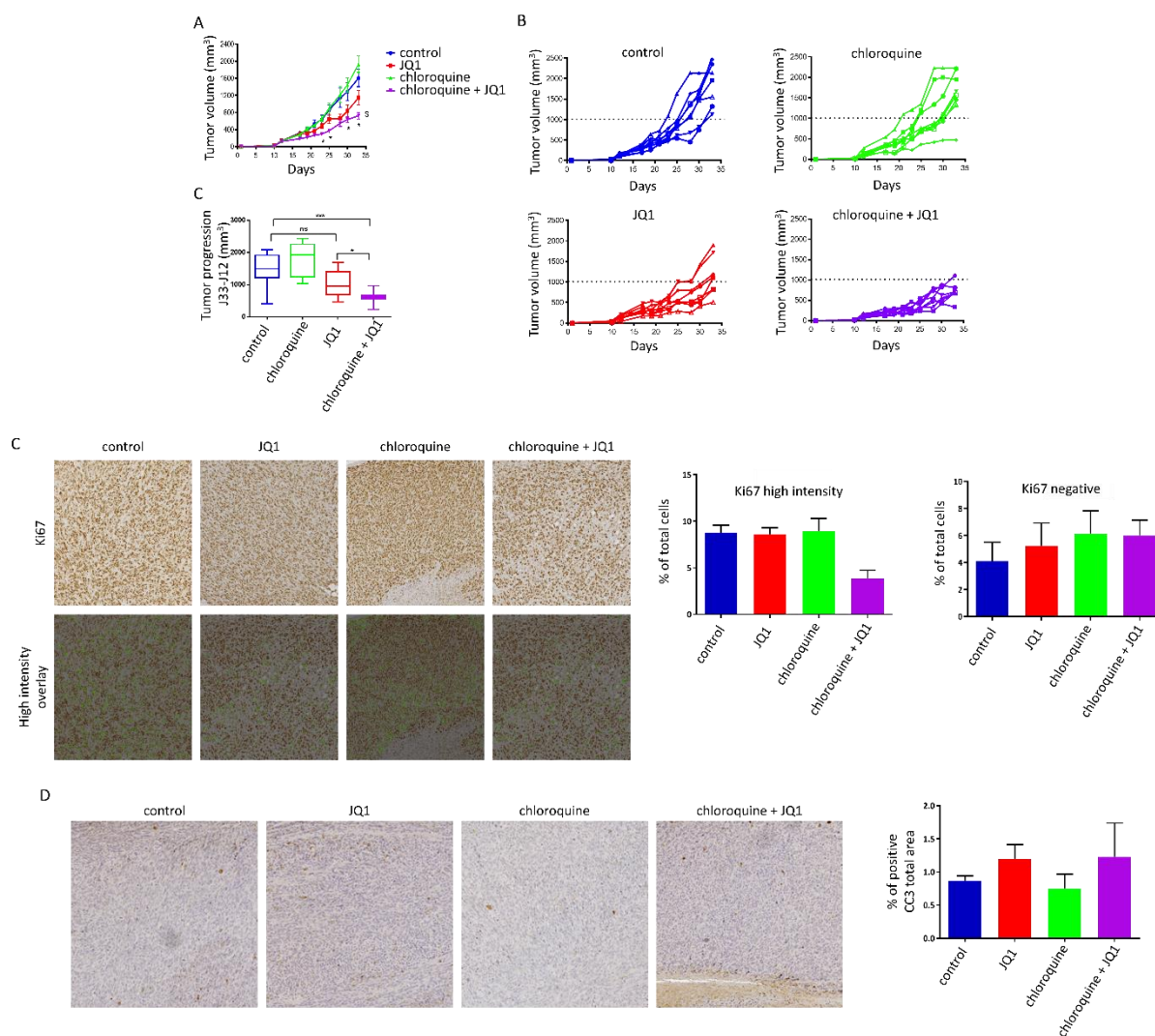


Figure 25 : L'inhibition de l'autophagie par la chloroquine potentialise l'effet antitumoral de JQ1 dans un modèle murin d'OS. Injection de 1,5M de cellules HOS en para-tibiale, et traitement en intra-péritonéale de JQ1 à 50mg/kg/jour et de CHQ à 25mg/kg/jour. 8 souris par groupe de traitement. Le volume tumoral est mesuré tous les 2/3 jours. **(A)** Evolution du volume tumoral moyen dans chaque groupe de traitement (les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM) (\$: effet significatif de l'interaction entre JQ1 et CHQ calculé par un test ANOVA 2 voies à J33, $p < 0.05$; * : test t non appariés du volume tumorale moyen du groupe « CHQ+JQ1 » versus le groupe « JQ1 »). **(B)** Volume tumoral individuel dans chaque groupe de traitement. L'incidence de tumeurs supérieure à 1000mm³ est indiquée pour chaque groupe. **(C)** Progression tumorale calculée entre le jour 12 et le jour 33 post-injection tumorale (test t non apparié, ns : $p < 0.05$, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$). **(D)** Expression de Ki67 évaluée par immunohistochimie dans les xénogreffes d'OS chez des souris. **(E)** Expression de la caspase-3 clivée évaluée par immunohistochimie dans les xénogreffes d'OS chez des souris. **(F)** Détection immunohistochimique des marqueurs d'autophagiques LC3 et p62.

Nous avons ensuite évalué la pertinence de la combinaison thérapeutique d'inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de l'autophagie, *in vivo*, dans un modèle murin d'OS. Le traitement de JQ1 seul diminue le volume tumoral moyen comparativement au groupe contrôle. Le traitement avec la chloroquine seule n'a pas d'effet sur le volume tumoral comparé au groupe de souris non traitées. La combinaison du JQ1 avec la chloroquine induit néanmoins une diminution significative du volume tumoral moyen, comparativement au volume tumoral moyen du groupe contrôle (Figure 25A). Au niveau individuel, une seule tumeur présentait un volume supérieur à 1 000 mm³ dans le groupe de souris traitées avec le JQ1 combiné à la chloroquine, alors qu'il y en avait 5/8 dans le groupe de souris traitées avec le JQ1 seul, 7/8 dans le groupe de souris non traitées et 8/8 dans le groupe de souris traitées avec la chloroquine seule (Figure 25B). De plus, la progression tumorale (J33-J12) a été comparée entre les différents groupes. Le traitement combiné de JQ1 avec la chloroquine ralentie significativement la progression tumorale comparativement aux groupes contrôle, chloroquine seule ou JQ1 seul. En effet, au jour 33, les volumes tumoraux moyens sont de 1605 mm³ pour le groupe contrôle, 1931 mm³ pour le groupe traité avec la chloroquine seule, 1147 mm³ pour le groupe traité avec le JQ1 seul et 725 mm³ pour le groupe traité avec la combinaison de JQ1 et de la chloroquine (Figure 25C). La médiane et l'écart interquartile de la progression tumorale sont respectivement de 1500 et 800 mm³ pour le groupe CT, 1900 et 1000 mm³ pour CHQ, 900 et 800 mm³ pour JQ1, et 600 et 200 mm³ pour JQ1 + CHQ. Seule la progression dans le groupe JQ1 + CHQ est statistiquement diminué par rapport au groupe CT. De plus, cette progression est également significativement inférieure au groupe JQ1 seul. Les valeurs des écarts interquartiles indiquent également que l'efficacité de la combinaison JQ1 + CHQ est moins variable entre individu que l'est 21 JQ1 seul. Ces résultats montrent que CHQ potentialise l'effet thérapeutique de JQ1 dans un modèle préclinique d'OS, et suggèrent que l'inhibition de l'autophagie permet d'augmenter la sensibilité des cellules tumorales à JQ1. Les analyses de marquage de Ki67 après seuillage des intensités de marquage (intensité négative, faible intensité, intensité intermédiaire, forte intensité) a permis de comparer les différentes populations de cellules tumorales en prolifération ou non. La combinaison JQ1 + CHQ diminue l'expression de Ki67 forte intensité comparativement aux groupes CT, JQ1 seul ou CHQ seule, suggérant une diminution prolifération tumorale. En effet, suite à un traitement de JQ1 associé à la chloroquine, le pourcentage total de cellules exprimant fortement Ki67 est diminué d'un facteur de 2,25 comparativement aux conditions sans traitement ou traitements seuls.

Discussion :

Dans notre étude, nous avons montré que JQ1 induit l'autophagie dans un modèle préclinique d'OS. En effet, après un traitement à JQ1, les marquages immunohistochimiques montrent une augmentation des marqueurs autophagiques LC3B et p62 dans le tissu tumoral comparativement aux tissus d'animaux non-traités. Cette même observation a également été faite dans un modèle murin de cancer de la vessie [562]. Nous avons ensuite montré que JQ1 induit l'autophagie *in vitro*. En effet, JQ1 augmente l'expression transcriptionnelle de SQSTM1 ainsi que l'expression protéique de LC3B-II dans les cellules d'ostéosarcome. De plus, les analyses d'immunofluorescence montrent également une surexpression du marqueur autophagique LC3B-II. L'induction de l'autophagie suite à un traitement JQ1 a également été montrée dans d'autres cellules tumorales mais aussi dans d'autres modèles pathologiques tels que dans des lésions de la moëlle épinière [600]. Dans des cellules cancéreuses de la vessie l'autophagie est induite via l'activation de la voie LKB1/AMPK, jouant un rôle dans la suppression tumorale [562]. L'induction de l'autophagie a limité la prolifération cellulaire, signifiant dans ce cas que l'autophagie joue un rôle antitumoral. A l'inverse, dans le cancer ovarien, l'induction de l'autophagie suite au traitement de JQ1 possède un rôle pro-survie [599]. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie pourrait limiter la survie des cellules tumorales. Dans des cellules cancéreuses colorectales, par exemple, l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA favorise l'apoptose [601]. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie pourrait potentialiser les effets antitumoraux du JQ1. Dans nos cellules d'OS, le ciblage de l'autophagie par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques tels que la chloroquine, la 3-méthyladénine et la bafilomycine potentialise de manière synergique les effets antitumoraux du JQ1 dans plusieurs lignées d'OS, montrés par une diminution de la viabilité et de la capacité clonogénique ainsi qu'une augmentation de l'apoptose dans les cellules d'OS. *In vivo*, la combinaison JQ1 + CHQ ralentit la progression tumorale dans un modèle préclinique murin d'OS. La combinaison de JQ1 avec la chloroquine limite la prolifération tumorale et induit l'apoptose. A notre connaissance aucune étude n'a pour le moment étudié la combinaison de traitement des inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de l'autophagie dans l'OS. Enfin, il a été montré que l'autophagie pouvait être un mécanisme potentiel dans la résistance des cellules tumorales aux inhibiteurs de protéines BET [599]. Il serait donc intéressant d'étudier si l'inhibition de l'autophagie peut limiter l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéine BET ou si cette inhibition est capable de lever la résistance des cellules tumorales et de les resensibiliser aux effets des traitements. Nos recherches suggèrent que la combinaison d'inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de l'autophagie pourraient être envisagée comme une approche thérapeutique pour l'OS.

3. Conclusion/Discussion

Cette première partie de thèse montre qu'un traitement avec l'inhibiteur de protéines BET nommé JQ1 induit l'autophagie dans l'OS *in vitro* et *in vivo*. De plus, les résultats jusqu'alors obtenus suggéraient que l'inhibition de l'autophagie, *in vitro* et *in vivo* potentialisait les effets anti-tumoraux de JQ1. Les expériences *in vitro* devront néanmoins être répétées afin de confirmer les premiers résultats obtenus. Dans un premier temps, l'estimation du flux autophagique par observation de l'accumulation du marqueur des autophagosomes LC3B-II par Western-blot et immunofluorescence devra être réalisée dans d'autres lignées d'OS car elles ont, pour le moment, été réalisées uniquement au sein de la lignée HOS-MNNG. Ces résultats permettront de confirmer l'induction de l'autophagie dans plusieurs lignées d'ostéosarcome. En ce qui concerne les tests de capacité clonogénique, pour les prochaines expériences la culture devra être arrêtée avant 14 jours afin d'éviter que les clones ne se détachent. De plus, les clones devront être comptés pour pouvoir interpréter plus finement l'effet du JQ1, de la chloroquine et de la combinaison de ces deux drogues sur les cellules d'OS. L'activité des caspases 3 et 7 devra également être évaluée dans la lignée d'ostéosarcome 143B. Néanmoins, les résultats obtenus jusqu'alors suggèrent un intérêt thérapeutique de la combinaison des inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de l'autophagie pour le traitement de l'ostéosarcome.

Une des limites à l'utilisation des inhibiteurs de l'autophagie est le manque de spécificité (action ubiquitaire). Comme beaucoup d'inhibiteurs, ces derniers ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et pourraient donc aussi affecter le niveau basal d'autophagie des cellules normales.

Les mécanismes en aval de l'induction de l'autophagie ont été identifiés et étudiés. En effet, l'amplification de ce processus biologique dans les cellules tumorales contribue à la croissance tumorale, à l'échappement à l'apoptose, au maintien de l'angiogenèse, à la dissémination métastatique, à la reprogrammation du microenvironnement tumoral, aux modulations du métabolisme, à la conservation de l'intégrité du génome et à l'échappement immunitaire [513]. En revanche, les mécanismes en amont de l'induction de l'autophagie restent peu connus. En effet, très peu d'études montrent par quel mécanisme JQ1 ou d'autres inhibiteurs de protéines BET induisent l'autophagie dans les cellules tumorales. Or, une meilleure connaissance et compréhension de ces mécanismes permettrait de proposer des approches thérapeutiques ciblant plus spécifiquement les cellules tumorales et limitant plus efficacement l'autophagie pro-survie. De plus, l'activation de l'autophagie pro-survie peut être une des causes de la résistance aux thérapies conventionnelles telles que la radiothérapie,

chimiothérapie, l'endocrinothérapie ou encore certaines thérapies ciblées. Il serait donc intéressant de savoir si, dans nos cellules d'OS, l'induction de l'autophagie induite par JQ1 est à l'origine de la résistance aux traitements, notamment aux inhibiteurs de BET. S'il s'avère que l'autophagie participe aux mécanismes de résistance aux BET inhibiteurs, il serait alors intéressant de voir si la thérapie combinée associant des inhibiteurs de protéines BET et des inhibiteurs de l'autophagie peut limiter l'acquisition de la résistance ou même lever cette résistance et resensibiliser les cellules tumorales aux traitements.

Chapitre II : L'autophagie, la surexpression de KRAS, la suractivation des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt/mTOR ainsi qu'une potentielle dérégulation du métabolisme sont des mécanismes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans l'ostéosarcome

1. Introduction

L'efficacité de la thérapie dite « épigénétique » peut, comme pour tout traitement, être limitée par l'apparition de mécanismes de résistance. Certains mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET ont été observés dans divers tumeurs, expliquant en partie le manque de réponse chez certains patients incluent dans des essais cliniques [423,602]. L'émergence de la résistance aux inhibiteurs de protéines à BET peut être due à une activation du processus autophagique au sein des cellules tumorales. En effet, les traitements anti-cancéreux, y compris les inhibiteurs de protéines BET, induisent l'induction de l'autophagie pro-survie, induisant la résistance des cellules tumorales aux traitements [603–607]. En effet, JQI induit l'autophagie dans un modèle de cellules de leucémie myéloïde résistantes à JQ1 [460]. Dans la partie précédente, nous avons montré que JQ1 induit l'autophagie dans les cellules d'OS. D'autres études décrivent que la résistance aux inhibiteurs de protéines BET est également due à une activation de récepteurs à tyrosines kinase et de voies de signalisation en aval telles que les voies MAPK et PI3K-Akt-mTOR. Par exemple, une étude décrit une reprogrammation adaptative d'un réseau de kinases dans le cancer de l'ovaire [458]. De plus, la suractivation des voies MAPK et PI3K-Akt-mTOR est décrite comme à l'origine de la résistance aux BETi dans les lymphomes [608] ou les neuroblastomes [484]. Néanmoins, aucun des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET mentionnés précédemment n'a pour le moment été décrit dans l'OS. Il est cependant nécessaire d'identifier et de comprendre les principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET qui pourraient se développer dans les OS afin de pouvoir les anticiper et les inhiber. L'objectif de cette partie de thèse est donc d'identifier et d'étudier les mécanismes moléculaires de la résistance aux inhibiteurs des protéines BET.

2. Résultats

a) Développement d'une lignée résistante à JQ1

La lignée d'ostéosarcome, HOS JQ1R, est résistante à l'effet antiprolifératif et apoptotique de JQ1.

Afin d'anticiper le développement de résistance aux BETi dans l'ostéosarcome, il est nécessaire de mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette résistance. Une lignée d'OS résistante à JQ1 (HOS JQ1R) a alors été développée. Pour ce faire, des cellules HOS-MNNG naïves (HOSn) ont été exposées à des doses croissantes de JQ1 jusqu'à ce qu'elles puissent proliférer avec 24 μM de JQ1, soit 13.6 fois leur IC50, étant de 1.761 μM . Cette lignée a été caractérisée par des tests de viabilité cellulaire, de clonogénicité et d'apoptose (Figure 26).

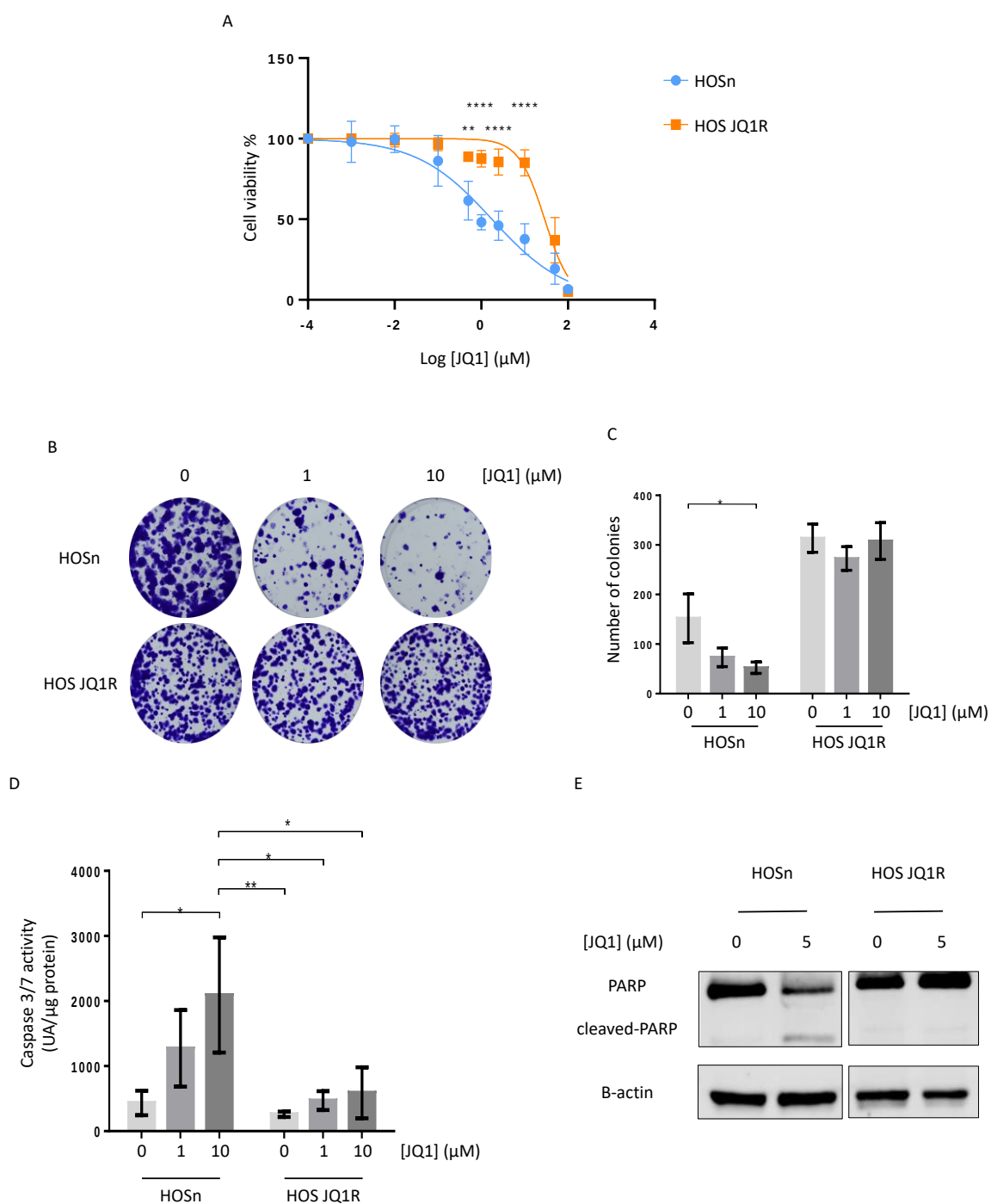


Figure 26 : La lignée HOS JQ1R est résistante au JQ1. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R ensemencées à raison de 2 500 et 3 500 cellules par puits, respectivement, traitées avec des concentrations croissantes de JQ1 (0 μM à 100 μM) pendant 72h, puis colorées au cristal violet afin d'évaluer la viabilité des cellules tumorales. L'IC₅₀ des cellules HOSn est de 1.761 μM et l'IC₅₀ des cellules HOS JQ1R est de 29.02 μM . Ces valeurs d'IC₅₀ ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Test clonogénique des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées avec 0, 1 ou 10 μM de JQ1 pendant 48h, puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans JQ1 pendant 14 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (B) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (C) (N=3). (D) Mesure de l'activité des

caspases-3/7 (AU/ μ g de protéines) dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées avec 0, 1 ou 10 μ M de JQ1 pendant 48h afin d'évaluer l'apoptose (: test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (E) Western blot réalisé pour évaluer l'apoptose par la détection de PARP clivé dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées ou non avec 5 μ M de JQ1 pendant 48h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3).*

Le traitement des cellules par JQ1 diminue significativement la viabilité des cellules HOSn, comparativement aux cellules HOS JQ1R. En effet, pour une concentration de 10 μ M, une diminution de 62 % de la viabilité des cellules HOSn est observée contre une diminution de seulement 15 % pour les cellules HOS JQ1R. L'IC₅₀ des cellules HOSn est de 1.761 μ M, tandis qu'elle est de 29.02 μ M pour les cellules HOS JQ1R. Une diminution de la viabilité des cellules HOSn est observée dès 0.1 μ M de JQ1, tandis que la viabilité cellulaire des cellules résistantes diminue à partir de 10 μ M de JQ1 (Figure 26A). De plus, la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R n'est pas affectée par le traitement avec 1 et 10 μ M de JQ1, alors qu'elle est diminuée pour les cellules HOSn. La capacité clonogénique des cellules HOSn est diminuée de 52 % avec un traitement de 1 μ M de JQ1 et de 66 % avec un traitement de 10 μ M de JQ1. Alors que celle des cellules HOS JQ1R diminue de manière non significative d'environ 13 % et 2 % après un traitement de 1 μ M et 10 μ M de JQ1, respectivement (Figure 26B et 26C). L'activité des caspases-3/7 des cellules HOSn augmente significativement après un traitement de 10 μ M de JQ1, alors qu'elle n'augmente que très légèrement dans les cellules HOS JQ1R. En effet, l'activité des caspases-3/7 dans les cellules HOSn augmente d'environ 840 UA/ μ g de protéines et d'environ 1650 UA/ μ g de protéines en présence de 1 μ M et de 10 μ M de JQ1, respectivement, alors que l'activité des caspase-3/7 n'excède pas une augmentation de 330 UA/ μ g de protéines dans les cellules HOS JQ1R traitées avec 10 μ M de JQ1 (Figure 26D). Ces résultats sont confirmés par l'expression de la protéine PARP clivée dans les cellules HOSn après un traitement de 5 μ M de JQ1, alors qu'elle est absente dans les cellules résistantes ayant reçu le même traitement (Figure 26E). Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirment la résistance des cellules HOS JQ1R à l'inhibiteur BET, JQ1.

La lignée HOS JQ1R est résistante à l'effet antiprolifératif des inhibiteurs des protéines BET mais reste sensible à celui des agents de chimiothérapie conventionnels.

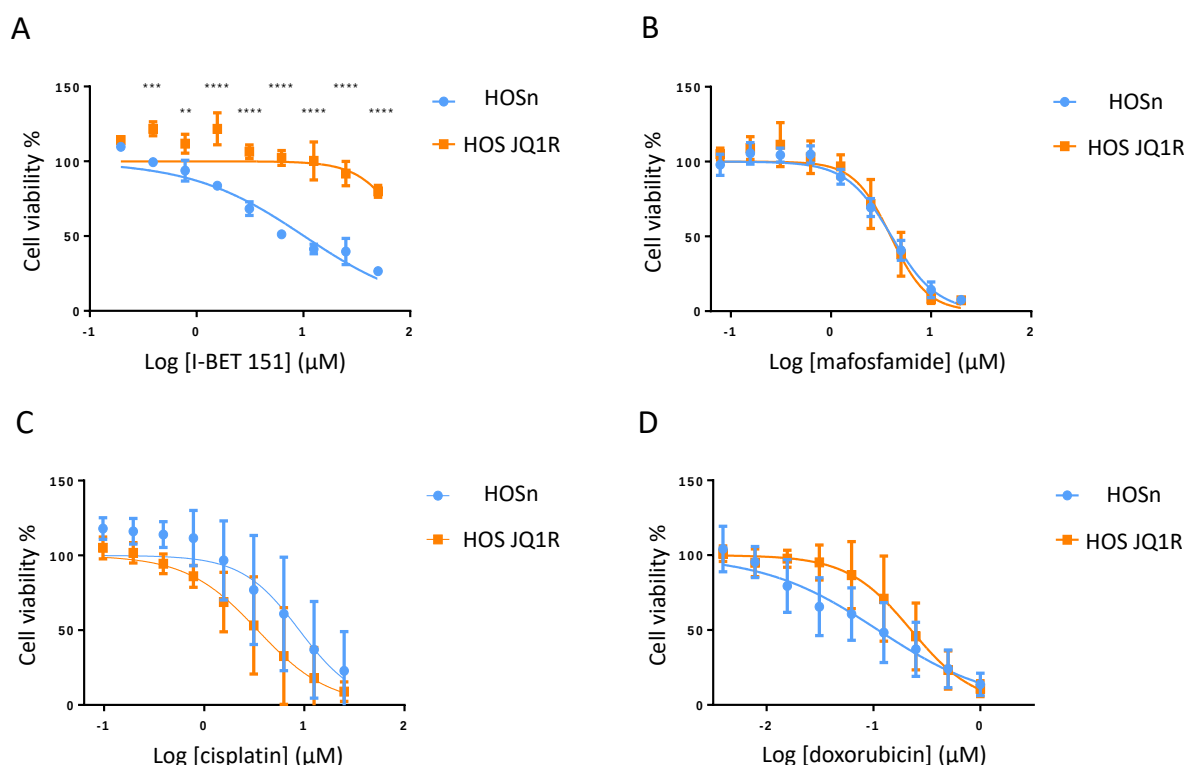


Figure 27 : Sensibilité des cellules HOSn et HOS JQ1R à l'I-BET 151 et aux agents de chimiothérapie conventionnels, mafosfamide, cisplatine et doxorubicine. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R ensemencées à raison de 2 500 et 3 500 cellules par puits, respectivement et traitées avec des concentrations croissantes d'I-BET 151 (195 nM à 50 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire. L'IC₅₀ des cellules HOSn est de 10.16 μ M, alors que l'IC₅₀ est de 96.26 μ M pour les cellules HOS JQ1R. Ces valeurs d'IC₅₀ ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-D) Sensibilité des cellules HOSn et HOS JQ1R aux agents de chimiothérapie conventionnels. Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R ensemencées à raison de 2 500 et 3 500 cellules par puits, respectivement et traitées avec des concentrations croissantes de (B) mafosfamide (78 ng/mL à 20 μ g/mL), (C) cisplatine (97 nM à 25 μ M), (D) doxorubicine (3,9 nM à 1 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3).

Le traitement des cellules tumorales par un autre inhibiteur des protéines BET, I-BET 151, diminue significativement la viabilité des cellules HOSn, comparativement à la viabilité des cellules HOS JQ1R. En effet, à une dose de 50 μ M d'I-BET 151, la viabilité des cellules HOSn est diminuée de 73.5 %, alors qu'elle n'est diminuée que de 20.4 % pour les cellules HOS JQ1R. L'IC₅₀ des cellules HOSn est de 10.16 μ M à 72h, tandis qu'elle est de 96.26 μ M pour les cellules HOS JQ1R (Figure 27A).

Les cellules HOS JQ1R sont aussi sensibles que les cellules HOSn aux effets antiprolifératifs d'agents de chimiothérapie conventionnels tels que le mafosfamide (Figure

27B), la cisplatine (Figure 27C) et la doxorubicine (Figure 27D). En effet, la viabilité des cellules HOSn et HOS JQ1R n'est pas significativement différente après un traitement avec l'un de ces agents de chimiothérapie. Les cellules HOS JQ1R présentent une résistance aux BETi, alors qu'elles restent sensibles aux agents de chimiothérapie conventionnels. Ces résultats montrent que les cellules résistantes, HOS JQ1R, présentent des mécanismes moléculaires spécifiques des inhibiteurs de protéines BET.

Afin d'identifier les modulations présentes entre les cellules naïves et résistantes aux BETi, et plus précisément au JQ1, le transcriptome des cellules HOS JQ1R a été analysé et comparé à celui des cellules HOSn par séquençage de l'ARN (RNA-sequencing, noté RNA-seq).

Les cellules HOSn et HOS JQ1R possèdent un profil transcriptomique différent.

D'après les analyses bio-informatiques issues du RNA-seq les cellules HOS JQ1R présentent un enrichissement des voies de signalisation et de processus biologiques comparativement aux cellules HOSn (Figure 28).

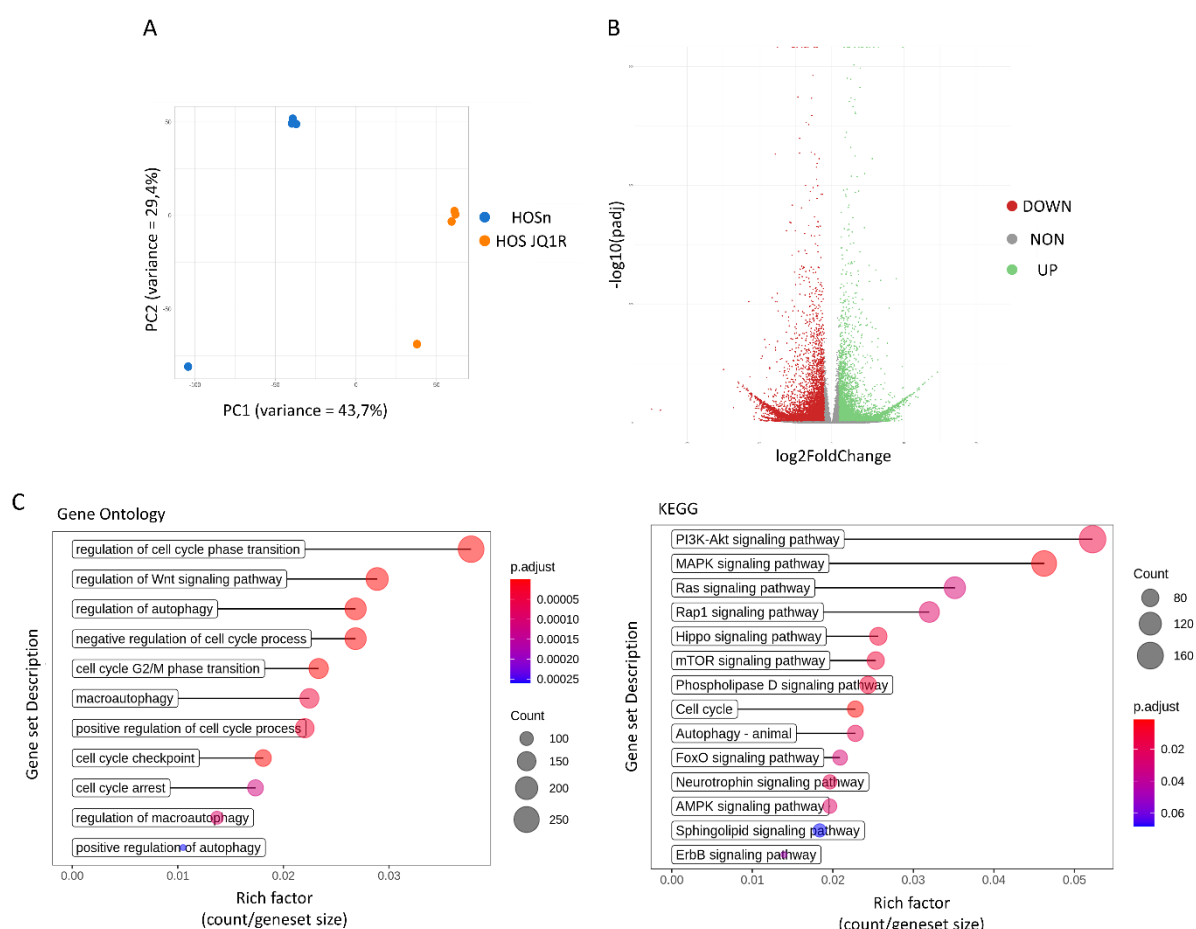


Figure 28 : Les cellules HOSn et HOS JQ1R sont deux lignées distinctes présentant une expression différentielle de gènes et de voies de signalisation et processus biologiques. (A) Analyse en composantes principales (ACP) issue des données RNA-seq réalisé sur 4 réplicats biologiques de chaque lignée. L'analyse a été réalisée sur les valeurs de comptage estimées par DESeq2 et corrigées avec une transformation stabilisante de la variance (vst). (B) Volcano plot des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules HOSn et HOS JQ1R dont les données sont issues du RNA-seq réalisé sur 4 réplicats biologiques de cellules HOSn et HOS JQ1R. Les transcrits sont différentiellement exprimés si la p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du $\log_2(\text{FoldChange})$ est supérieur à 1. (C) Analyse de surreprésentation des ontologies (processus biologiques de Gene Ontology à gauche et KEGG à droite) des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules HOSn et HOS JQ1R. Les données sont issues du RNA-seq réalisé sur 4 réplicats biologiques pour chaque lignée.

La première composante de l'analyse en composantes principales représente 43.7 % de la variance globale observée entre les échantillons (4 échantillons de la lignée HOSn et 4 échantillons de la lignée HOS JQ1R) et différencie nettement les deux lignées cellulaires, HOSn et HOS JQ1R. La deuxième composante, ayant une variance de 29.4 %, montre une variabilité intra-groupe. En effet, un des quatre réplicats biologiques est isolé par rapport aux trois autres (Figure 28A). De plus, l'analyse différentielle des données RNA-seq met en évidence une

expression différentielle des transcrits dans les deux lignées cellulaires, avec 3181 transcrits surexprimés (en vert, à droite de la Figure 28B) et 4762 sous-exprimés (en rouge, à gauche de la Figure 28B) dans les cellules HOS JQ1R, par rapport aux cellules naïves. Une analyse de l'enrichissement des voies de signalisation KEGG et des listes d'ontologie « Biological process » de Gene Ontology a été réalisée dans le but de déterminer si des gènes, provenant d'une même voie ou d'un même processus biologique, étaient identifiés significativement enrichis parmi les transcrits différentiellement exprimés. L'autophagie fait partie d'un des processus biologiques le plus significativement enrichi. De plus, d'autres voies pouvant interagir avec le processus de l'autophagie telles que « regulation of autophagy », « macroautophagy », « regulation of macroautophagy », « positive regulation of autophagy » ou encore « mTOR signaling pathway » sont également retrouvées parmi les termes de Gene Ontology les plus significativement enrichis (Figure 28C). L'analyse de l'enrichissement des voies de signalisation KEGG de Gene Ontology montre également que les cellules HOS JQ1R présentent une amplification de voies de signalisation telles que les voies PI3K/AKT/mTOR, MAPK ou encore RAS (Figure 28C). Ainsi, les cellules HOSn et HOS JQ1R présentent des différences transcriptomiques, avec, dans les cellules résistantes à JQ1, un enrichissement de processus biologiques tels que l'autophagie ou encore de voies de signalisation comme les voies MAPK ou PI3K/AKT/mTOR comparativement aux cellules HOSn.

b) L'inhibition de l'autophagie, suractivée dans les HOS JQ1R, potentialise l'effet du JQ1 *in vitro*

La lignée HOS JQ1R présente une expression différentielle des transcrits de l'autophagie comparée à la lignée HOSn.

Comme évoqué précédemment, l'inhibition de l'autophagie dans les cellules HOSn potentialise l'effet de JQ1 (PARTIE I). Ainsi, il serait intéressant d'inhiber ce processus biologique dans les cellules HOS JQ1R afin de les sensibiliser au JQ1. Les données issues du RNA-seq concernant l'autophagie ont été analysées plus en détails dans les cellules HOSn et HOS JQ1R (Figure 29).

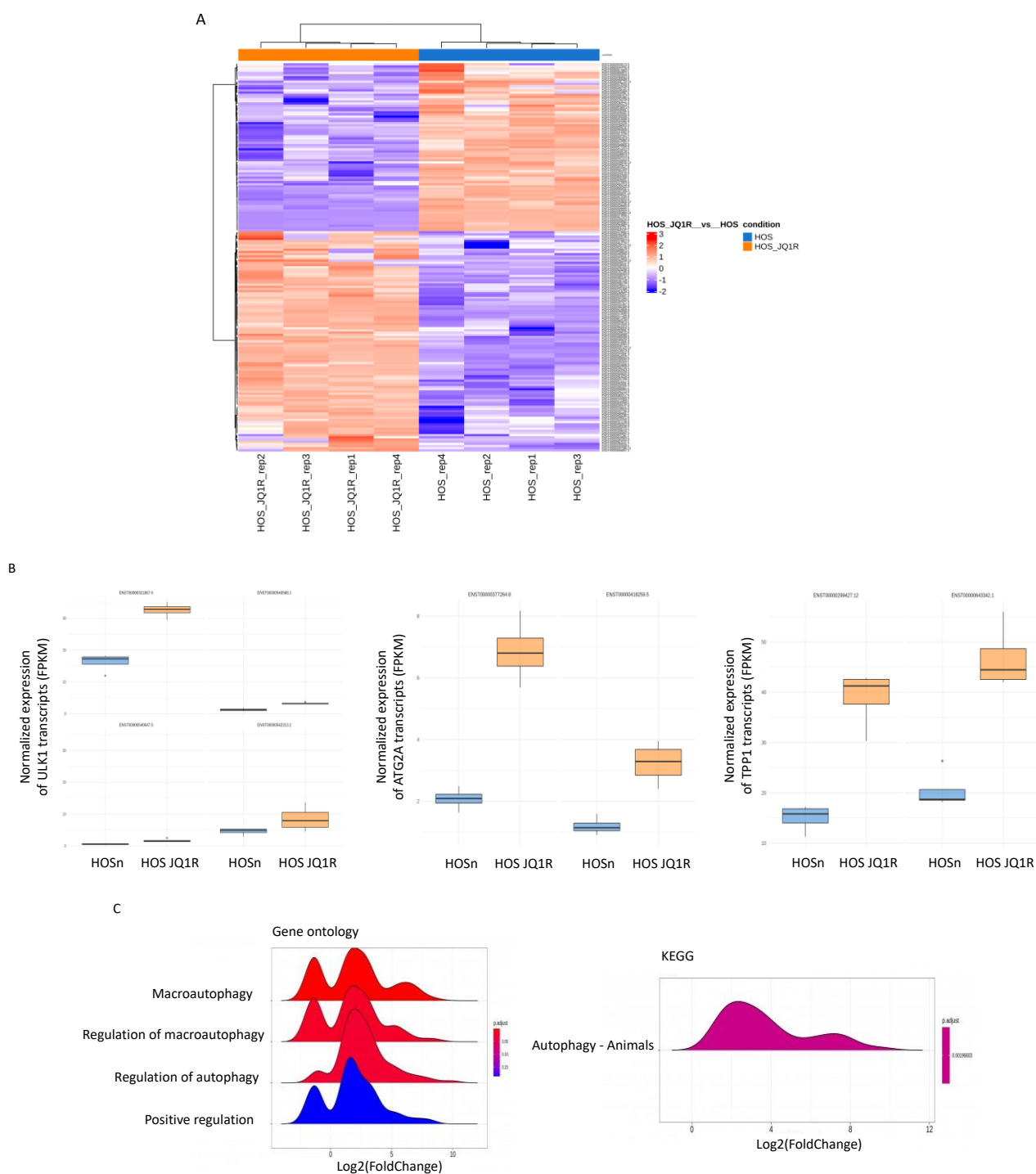


Figure 29 : Les transcrits de l'autophagie sont différenciellement exprimés dans les cellules HOS JQ1R. (A) Heatmap des transcrits différenciellement exprimés entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, qui sont également liés à l'autophagie (listés dans la base de données humaine KEGG). Les données sont issues du RNA-seq réalisé sur 4 répliquats biologiques de cellules HOSn et HOS JQ1R. Les transcrits sont considérés comme différenciellement exprimés si leur p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du Log2(FoldChange) est supérieure à 1. (B) Expression des transcrits de ULK1, ATG2A et TPP1 dans les cellules HOSn et HOS JQ1R, issue des données RNA-seq réalisé sur 4 répliquats biologiques de chaque lignée, exprimée en nombre de reads normalisé et représentée sous forme de Boxplot. (C) RidgePlot Gene Ontology et RidgePlot KEGG montrant la répartition des transcrits différenciellement exprimés entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, selon leur Log2(FoldChange) pour

chaque ontologie. Les données proviennent du RNA-seq réalisé sur 4 réplicats biologiques de HOS JQ1R. Les transcrits ayant un $\text{Log}_2(\text{FoldChange})$ supérieur à 0 sont surexprimés alors que ceux présentant un $\text{Log}_2(\text{FoldChange})$ inférieur à 0 sont sous-exprimés.

L'analyse des transcriptomes montre une expression différentielle des transcrits codant pour des gènes de l'autophagie entre les cellules naïves et résistantes au JQ1. En effet, 101 transcrits autophagiques sont surexprimés et 77 sont sous-exprimés dans les cellules HOS JQ1R comparés aux cellules HOSn (Figure 29A). Parmi ces transcrits, ULK1, ATG2A et TPP1 sont jusqu'à 2, 3.5 et 2.5 fois plus exprimés, respectivement, dans les cellules HOS JQ1R en comparaison aux cellules HOSn (Figure 29B). L'analyse de l'enrichissement des listes d'ontologie « Biological process » de Gene Ontology et des voies de signalisation KEGG (Figure 29C) montre que les gènes, provenant du processus biologique de l'autophagie, sont majoritairement surexprimés parmi les gènes différentiellement exprimés dans les cellules HOS JQ1R. En effet, une majorité des ontologies sélectionnées, faisant partie de l'autophagie, telles que la macroautophagie, la régulation de la macroautophagie ou encore la régulation positive de l'autophagie montre une surexpression des transcrits les composants (transcrits ayant un $\text{Log}_2(\text{FoldChange})$ supérieur à 0). D'après les données issues du RNA-seq, l'autophagie est donc amplifiée dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn.

L'autophagie, suractivée dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn, est induite par le JQ1 (Données issues du stage de Master 2 d'Alexandre Pelletier).

Les données issues de l'analyse du transcriptome ont montré une suractivation de l'autophagie dans les cellules résistantes. Dans le but de confirmer ces données, les expressions des gènes de l'autophagie tels que ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) et ATG2A (Autophagy-related protein 2 homolog A) ainsi que le gène du lysosome TPP1 (tripeptidyl peptidase-1) ont été étudiés par RT-qPCR. De plus, l'expression du marqueur des autophagosomes LC3B-II a été analysée par western blot et immunofluorescence (Figure 30). Ces études ont été réalisées dans le cadre d'un stage de master 2 réalisé par Alexandre Pelletier.

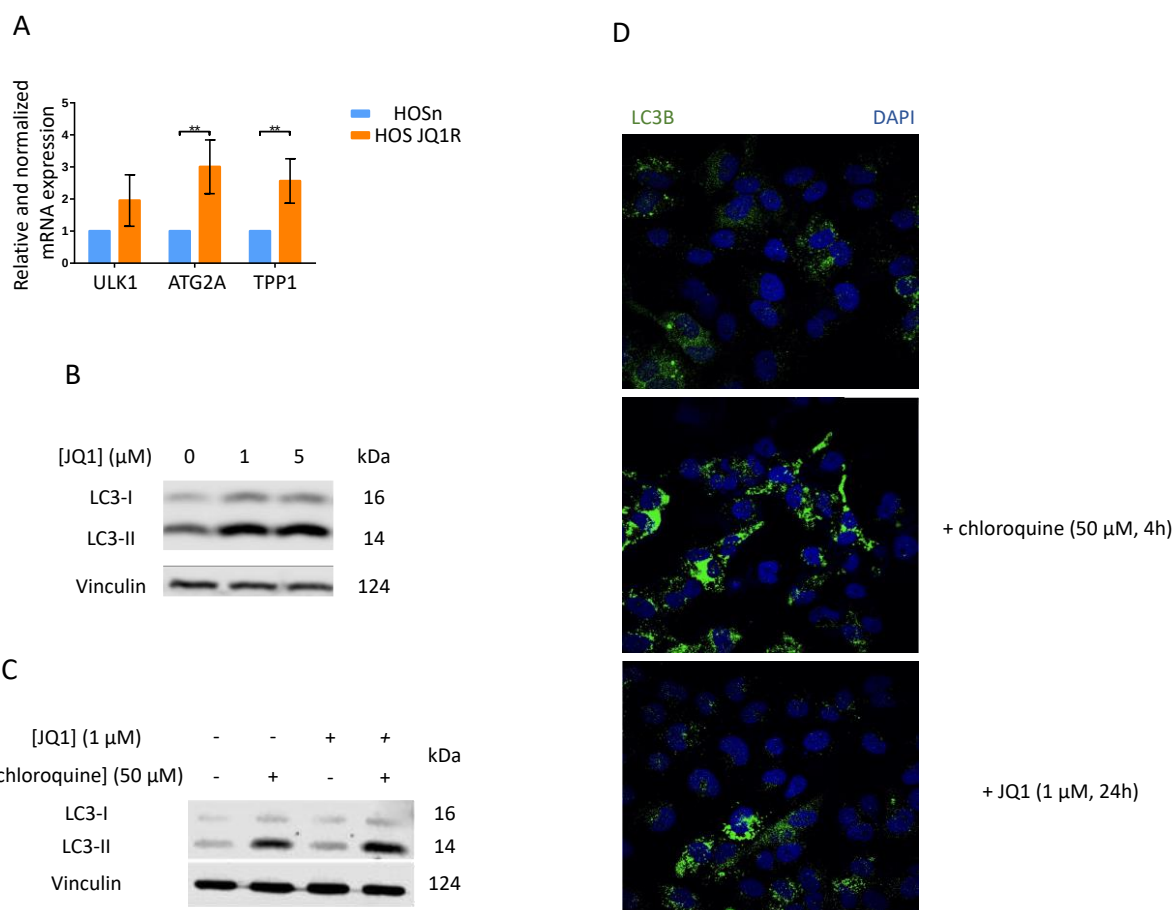


Figure 30 : Les cellules résistantes à JQ1 ont une forte activité autophagique, qui est amplifiée après un traitement au JQ1. (A) Expression transcriptionnelle des gènes de l'autophagie ULK1 et ATG2A, et du gène du lysosome TPP1, analysée par RT-qPCR dans les cellules HOS JQ1R par rapport aux cellules HOSn. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2- $\Delta\Delta C_t$, * : test statistique ANOVA 2 voies en comparaison multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B) Expression du marqueur d'autophagosome LC3-II évaluée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R en présence de 0, 1 ou 5 μM de JQ1 pendant 48h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=1). (C) Estimation du flux autophagique par western blot révélant l'accumulation du marqueur d'autophagosome, LC3-II, dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R traitées avec 0 ou 1 μM de JQ1 pendant 24h, sans ou avec 50 μM de chloroquine pendant 4h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=1). (D) Visualisation des "puncta" (structures positives LC3-II) représentant les autophagosomes/autolysosomes par marquage immunofluorescent LC3 (vert) et coloration DAPI des noyaux (bleu), dans les cellules HOS JQ1R traitées ou non avec 50 μM de chloroquine pendant 4h, ou avec 1 μM de JQ1 pendant 24h. Observation par microscopie confocale (grossissement x60) (N=1).

Comparativement aux cellules HOSn, les cellules HOS JQ1R présentent une surexpression de gènes impliqués dans l'autophagie, tels que ULK1, gène initiateur de l'autophagie, ATG2A, gène impliqué dans l'assemblage des autophagosomes et TPP1, gène permettant la dégradation des protéines capturées dans les lysosomes. En effet, les expressions de ULK1, ATG2A et TPP1 sont 2, 3 et 7,7 fois plus importantes dans les cellules HOS JQ1R

comparées aux cellules HOSn, respectivement (Figure 30A). Le traitement au JQ1 induit une augmentation de l'expression de la protéine LC3B-II. D'après le western blot réalisé sur les culots protéiques des cellules HOS JQ1R, le traitement avec 1 μ M ou 5 μ M de JQ1 augmente l'expression de la protéine LC3B-II comparativement aux cellules HOS JQ1R non traitées (Figure 30B). Ces observations sont également faites avec les marquages immunofluorescents de la protéine LC3B-II au sein des cellules HOS JQ1R. En effet, les cellules HOS JQ1R traitées avec 1 μ M de JQ1 présentent plus de structures LC3B positives (représentées par les punctas en vert), c'est-à-dire plus d'autophagosomes (Figure 30D – Acquisition du bas) que les cellules HOS JQ1R non traitées (Figure 30D – Acquisition du haut). En revanche, l'augmentation du taux autophagique ne signifie pas que les cellules possèdent une activité autophagique plus élevée. En effet, les cellules ayant une autophagie défectueuse peuvent présenter une accumulation d'autophagosomes. Le flux autophagique a alors été étudié dans les cellules traitées avec un inhibiteur de la fusion des autophagosomes et des lysosomes, la chloroquine. En présence de cet inhibiteur, une forte accumulation des punctas LC3B (structures LC3B positives) (Figure 30D – Acquisition du milieu) ou de la protéine LC3B-II est observée dans les cellules résistantes au JQ1 (Figure 30C).

Ainsi, les résultats obtenus dans la partie I concernant les cellules HOSn et les résultats obtenus avec les cellules HOS JQ1R montrent que les cellules résistantes au JQ1 ont une forte activité autophagique basale et que le JQ1 induit l'autophagie au sein des cellules HOSn et HOS JQ1R. L'élévation de l'activité autophagique pourrait être l'un des mécanismes responsables de l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans les cellules HOS JQ1R.

L'inhibition de l'autophagie dans les cellules HOS JQ1R par le ciblage de la protéine Atg7 ou par l'utilisation de la chloroquine potentialise l'effet du JQ1 (Données issues du stage de Master 2 d'Alexandre Pelletier).

Afin de déterminer si l'inhibition de l'autophagie dans les cellules HOS JQ1R les sensibilise au JQ1, en d'autres termes si l'autophagie joue un rôle dans la résistance au JQ1, les cellules HOS JQ1R ont été traitées avec de la chloroquine ou transfectées avec un siRNA ciblant Atg7, une enzyme effectrice essentielle de l'autophagie. Les effets de l'inhibition de l'autophagie sur les cellules HOS JQ1R ont été évalués par des expériences de viabilité cellulaire et d'apoptose par des mesures de l'activité des caspases 3 et 7 (Figure 31). Ces expériences ont été réalisées et analysées par Alexandre Pelletier lors de son stage de master 2.

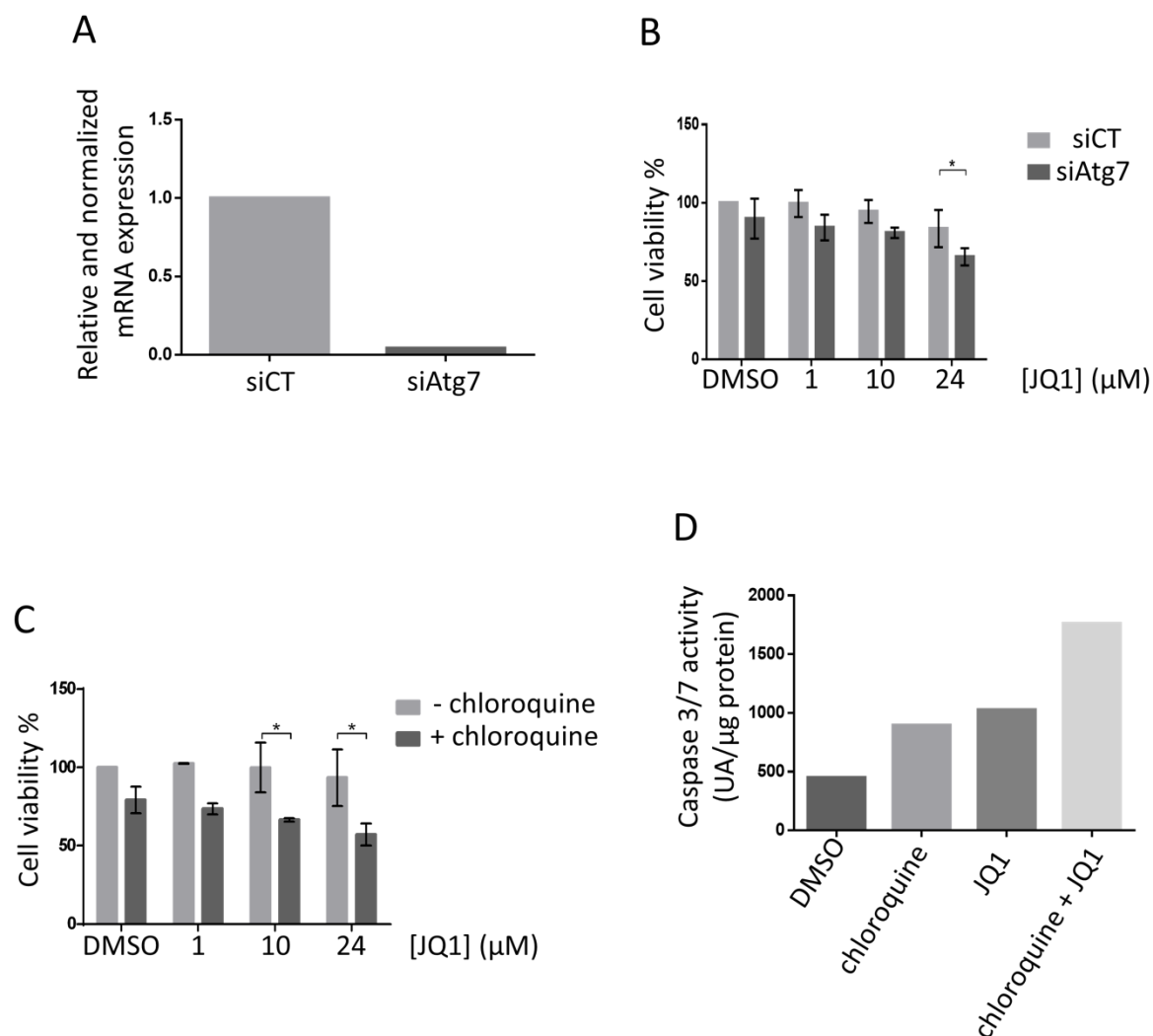


Figure 31 : L'inhibition de l'autophagie potentialise l'effet de JQ1 dans les cellules HOS JQ1R. (A) Expression transcriptionnelle du gène de l'autophagie, Atg7, analysée par RT-qPCR dans des cellules HOS JQ1Rensemencées en plaque 6 puits et transfectées avec 10 nM de siRNA contrôle (siCT) ou de siRNA ciblant Atg7 (siAtg7) pendant 48h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2- $\Delta\Delta$ Ct) (N=1). (B) Test de viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1Rensemencées à raison de 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits et transfectées avec 10 nM de siRNA contrôle (siCT) ou de siRNA ciblant Atg7 (siAtg7), puis traitées 24h plus tard avec 0, 1, 10 ou 24 μ M de JQ1 pendant 48h. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition DMSO siCT (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=4). (C) Test de viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1Rensemencées à raison de 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits et traitées avec 0, 1, 10 ou 24 μ M de JQ1, en présence ou en l'absence de 5 μ M de chloroquine pendant 72h. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition DMSO sans chloroquine (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=2). (D) Évaluation de l'apoptose par la mesure de l'activité

des caspases 3/7 (AU/ μ g de protéine) dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R traitées avec 5 μ M de JQ1 et/ou 5 μ M de chloroquine pendant 48h (N=1).

Dans un premier temps, une diminution de l'expression transcriptionnelle d'Atg7 est observée, validant ainsi l'efficacité de transfection du siAtg7 dans les cellules HOS JQ1R (Figure 31A). L'inhibition d'Atg7 semble potentialiser l'effet du JQ1 dans ces mêmes cellules puisque la transfection du siAtg7 dans les cellules HOS JQ1R diminue significativement la viabilité cellulaire en présence de 24 μ M de JQ1 comparativement à la transfection du siRNA control (siCT). En effet, la viabilité cellulaire diminue de 20 % dans les cellules HOS JQ1R transfectées avec le siAtg7 et traitées avec 24 μ M de JQ1 en comparaison avec les cellules transfectées avec le siCT et traitées avec la même concentration de JQ1 (Figure 31B). L'inhibition chimique de l'autophagie par l'utilisation de la chloroquine potentialise l'effet de JQ1 dans les cellules HOS JQ1R. En effet, la viabilité des cellules HOS JQ1R est réduite de 20 % en présence de chloroquine seule. Associée avec 10 μ M de JQ1, la chloroquine induit une diminution de la prolifération des cellules tumorales de 33 %, alors qu'un traitement avec seulement 10 μ M de JQ1 n'induit pas de diminution de la viabilité cellulaire (Figure 31C). De plus, un traitement chloroquine combiné à JQ1 induit l'apoptose, montrée par une augmentation l'activité des caspases 3 et 7, comparativement au traitement JQ1 seul ou de la chloroquine seule (Figure 31D). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules HOS JQ1R au JQ1.

c) Les cellules HOS JQ1R surexpriment KRAS et possèdent une éventuelle mutation de cette protéine

Dans le but d'identifier l'origine des modulations entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, les données du RNA-seq ont été de nouveau analysées. L'analyse du transcriptome a montré la suractivation de voies de signalisation, de processus biologiques comme l'autophagie ainsi que la surexpression de KRAS dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn (Figure 32). La suractivation du processus autophagique ainsi que la surexpression de KRAS dans les cellules HOS JQ1R comparées aux cellules HOSn a été validée *in vitro* (Figure 28C). Ainsi, la surexpression de KRAS pourrait être à l'origine des modulations observées dans les cellules HOS JQ1R. De plus, les analyses bio-informatiques issues du RNA-seq ont mis en évidence une mutation de KRAS (Figure 39).

Les cellules HOS JQ1R surexpriment KRAS et cette expression est amplifiée en présence de JQ1.

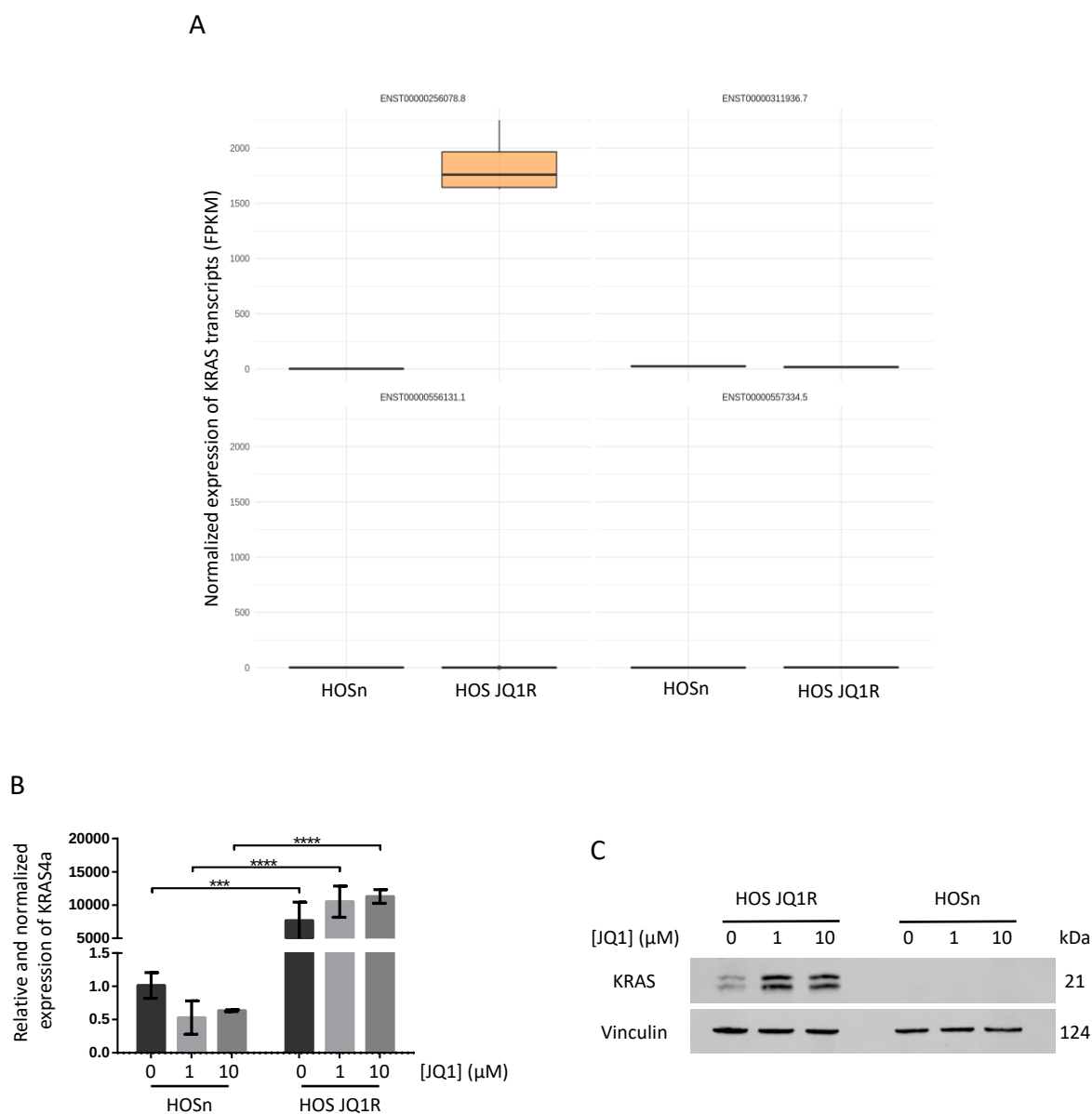


Figure 32 : Les cellules HOS JQ1R surexpriment la protéine KRAS et JQ1 amplifie cette expression. (A) Expression des transcrits de KRAS dans les cellules HOSn et HOS JQ1R obtenue par RNA-seq, réalisé sur 4 réplicats biologiques de chaque lignée, exprimée en nombre de reads normalisé et représentée sous forme de Boxplot. L'analyse a été réalisée sur tous les transcrits de KRAS connus. (B) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS (KRAS4a) analysée par RT-qPCR dans les cellules HOSn et HOS JQ1R en présence de 0, 1 ou 10 μ M de JQ1 pendant 48h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$, * : Test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) ($N=3$). (C) Expression protéique de KRAS

analysée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R en présence de 0, 1 ou 10 μ M de JQ1 pendant 48h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3).

La quantification du RNA-seq réalisée au niveau des transcrits montre une surexpression transcriptionnelle de KRAS dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn. Cette surexpression est le résultat d'une augmentation d'expression transcriptionnelle du variant « a » (KRAS4a). En effet, le niveau d'expression du transcrit KRAS4a dans les cellules HOS JQ1R est environ 1700 fois plus élevé que dans les cellules HOSn (Figure 32A). La surexpression transcriptionnelle du variant a de KRAS est confirmée par RT-qPCR au sein des cellules HOS JQ1R. En effet, les cellules HOS JQ1R présentent une surexpression transcriptionnelle de KRAS4a comparativement aux cellules HOSn traitées ou non avec du JQ1. Sans traitement au JQ1, le gène KRAS4a est 7650 fois plus exprimé dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn. Avec un traitement de 1 et 10 μ M de JQ1, cette augmentation est de 19800 et 17900, respectivement (Figure 32B). La surexpression de la protéine KRAS est également observée dans les cellules HOS JQ1R, alors que l'expression de cette protéine dans les cellules naïves est inexistante. De plus, dans les cellules HOS JQ1R, l'expression de la protéine KRAS augmente en réponse au JQ1. (Figure 32C).

Le ciblage de KRAS dans les cellules HOS JQ1R par siRNA ou shRNA semble diminuer leur viabilité cellulaire.

Afin de démontrer que la surexpression de KRAS pourrait jouer un rôle dans l'apparition du phénomène de résistance à JQ1, son ARN a été ciblé par des siRNA et des shRNA. La viabilité cellulaire et la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R ont ensuite été évaluées (Figure 33 et Figure 34).

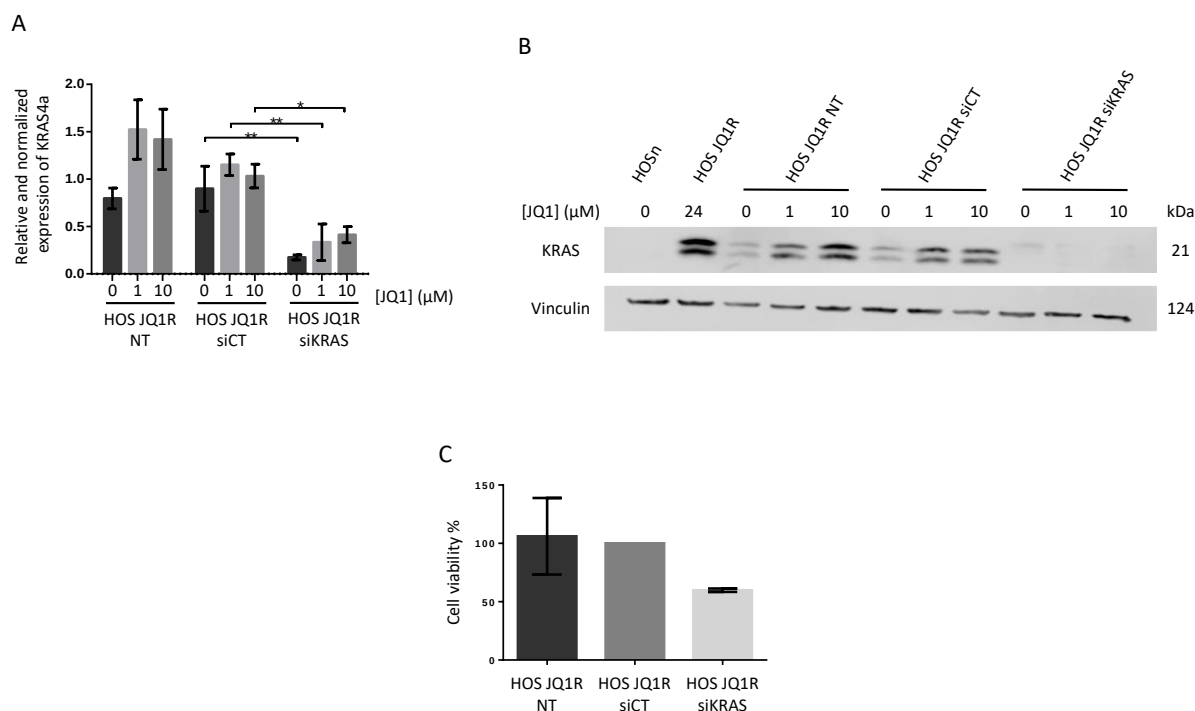


Figure 33 : Le ciblage de KRAS par transfection de siRNA dans la lignée cellulaire résistante au JQ1 diminue la viabilité cellulaire. (A) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS (KRAS4a) analysée par RT-qPCR dans des cellules HOS JQ1R transfectées ou non avec 10 nM de siRNA contrôle (siCT) ou de siRNA ciblant KRAS (siKRAS) pendant 6h et traitées avec 0, 1 ou 10 μM de JQ1 pendant 72h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, * : Test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B) Western blot révélant l'expression de la protéine KRAS dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R transfectées ou non avec 10 nM de siRNA contrôle (siCT) ou de siRNA ciblant KRAS (siKRAS) pendant 6h et traitées avec 0, 1 ou 10 μM de JQ1 pendant 72h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3). (C) Test de viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1R ensemencées à raison de 3 500 cellules par puits et transfectées ou non avec 10 nM de siRNA contrôle (siCT) ou de siRNA ciblant KRAS (siKRAS) pendant 6h. 72 heures après l'ensemencement, la viabilité cellulaire a été évaluée par une coloration au cristal violet. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition siCT DMSO (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N= 2).

L'efficacité de la transfection du siKRAS a été validée dans les cellules HOS JQ1R. En effet, la transfection du siKRAS diminue l'expression transcriptionnelle de KRAS4a de 81 %, 71 % et 59 % dans les cellules HOS JQ1R non-traitées ou traitées avec 1 ou 10 μM de JQ1, respectivement par rapport aux cellules HOS JQ1R transfectées avec le siCT (Figure 33A). La même observation est faite concernant l'expression protéique de KRAS. Les cellules transfectées avec le siKRAS n'expriment plus la protéines KRAS, même après un traitement avec 1 ou 10 μM de JQ1(Figure 33B). La transfection du siRNA ciblant KRAS dans les cellules HOS JQ1R semble diminuer la prolifération cellulaire. En effet, la viabilité de ces cellules

diminue de 40 % par rapport à la viabilité des cellules HOS JQ1R transfectées avec le siCT (Figure 33C).

Le ciblage de KRAS dans les cellules a également été réalisé avec des shRNA inducibles à la doxycycline, ayant pour avantage d'être plus stables que des siRNA.

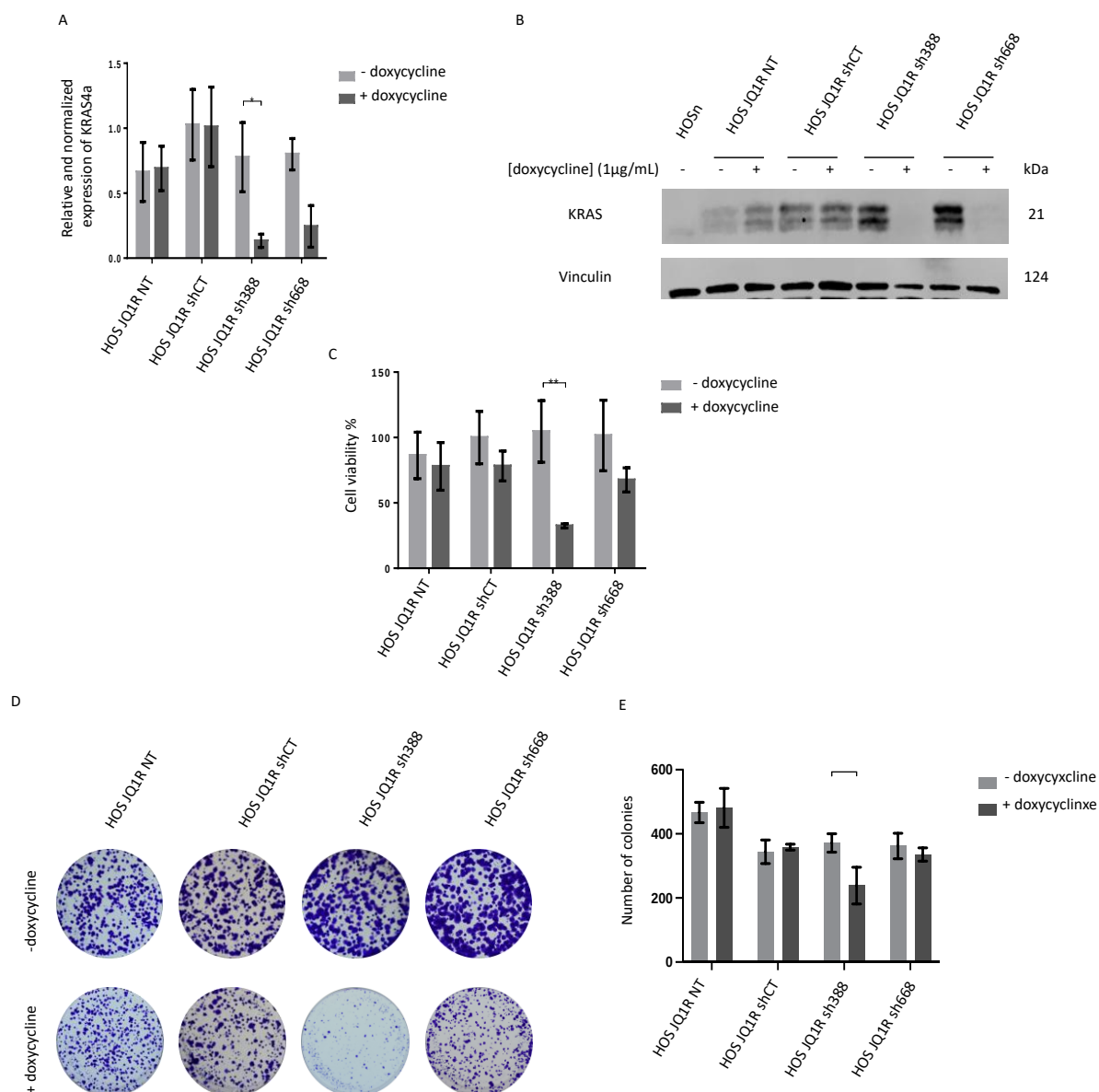


Figure 34 : Le ciblage de KRAS par transduction de shRNA dans la lignée cellulaire résistante au JQ1 diminue la viabilité cellulaire. (A) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS (KRAS4a) analysée par RT-qPCR dans des cellules HOS JQ1R transduites ou non avec un shRNA contrôle (shCT) ou des shRNA ciblant KRAS (sh388 et sh668) à une MOI de 1, en présence ou non de doxycycline (1µg/mL) pendant 96h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2-ΔΔCt, * : Test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B) Expression de la protéine KRAS dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R transduites avec un shRNA contrôle (shCT) ou des shRNA ciblant KRAS (sh388 et sh668) à une MOI de 1,

en présence ou non de doxycycline (1 µg/mL) pendant 96h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3). (C) Test de viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1R transduites ou non avec un shRNA contrôle (shCT) ou des shRNA ciblant KRAS (sh388 et sh668) à une MOI de 1, à raison de 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits et traitées ou non avec de la doxycycline (1 µg/mL) pendant 96h. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition shCT sans doxycycline (*: test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (D-E) Test clonogénique des cellules HOS JQ1R transduites ou non avec un shRNA contrôle (shCT) ou des shRNA ciblant KRAS (sh388 et sh668) à une MOI de 1, en présence ou non de doxycycline (1µg/mL) pendant 96h, puis comptées et ensemencées en plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu avec ou sans doxycycline pendant 14 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées au cristal violet, photographiées (D) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (E) (N=3).

Tout comme pour les siRNA, l'efficacité de la transduction des deux shKRAS a été validée dans les cellules HOS JQ1R. La transduction, puis l'induction par la doxycycline du sh388 ciblant KRAS diminue significativement de 83 % l'expression transcriptionnelle de KRAS4a. Le sh668 diminue également l'expression transcriptionnelle de KRAS4a de 70 % (Figure 34A). Ces résultats sont confirmés au niveau protéique par western-blot montrant une absence d'expression de la protéine KRAS dans les cellules HOS JQ1R transduites avec les sh388 et sh668 (Figure 34B). Il est à noter que l'induction à la doxycycline ne diminue pas l'expression transcriptionnelle et protéique de KRAS dans les cellules transduites avec le shCT (Figure 34A et Figure 34B). L'inhibition de KRAS par les shRNA dans les cellules HOS JQ1R diminue significativement la viabilité cellulaire de 72 % pour le sh388 et de 33 % pour le sh668 (Figure 34C). Cependant, l'induction à la doxycycline dans les cellules transduites avec le shCT semble avoir un effet sur la viabilité cellulaire, puisqu'elle diminue de 22 % la viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1R. De plus, la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R diminue de 36 % et 9 % après la transduction et l'induction des sh388 et sh668, respectivement (Figure 34D et Figure 34E). De manière générale, le traitement à la doxycycline diminue légèrement la taille des clones (Figure 34D).

L'ensemble de ces résultats montrent que le ciblage de l'expression de KRAS inhibe la prolifération et de la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R, suggérant une addiction des cellules tumorales à l'expression de KRAS, nécessaire à la survie des cellules.

Le ciblage de KRAS dans les cellules HOS JQ1R par un shRNA semble réguler les voies de signalisation et processus biologiques comme l'autophagie.

Afin de déterminer si l'activation des processus biologiques, comme l'autophagie, et voies de signalisation font partie des mécanismes moléculaires régulés par la surexpression de KRAS et sont responsables de la résistance à JQ1, le transcriptome des cellules HOSn (2 réplicats biologiques), HOS JQ1R (4 réplicats biologiques), HOS JQ1R transduites avec le shCT (6 réplicats biologiques) ou le sh388 (4 réplicats biologiques) a été étudié par la technique de 3'SRP (3' Seq-RNA profiling) (Figure 36 et Figure 37). Cette technique est moins sensible et moins coûteuse que la technique de RNA-seq.

Dans un premier temps, les données obtenues via la technique de 3'SRP concernant l'expression des transcrits de KRAS dans les cellules HOSn et les cellules HOS JQ1R transduites ou non avec le shCT ou le sh388 ont été analysées et comparées à celles obtenues par la technique de RNA-seq (Figure 35).

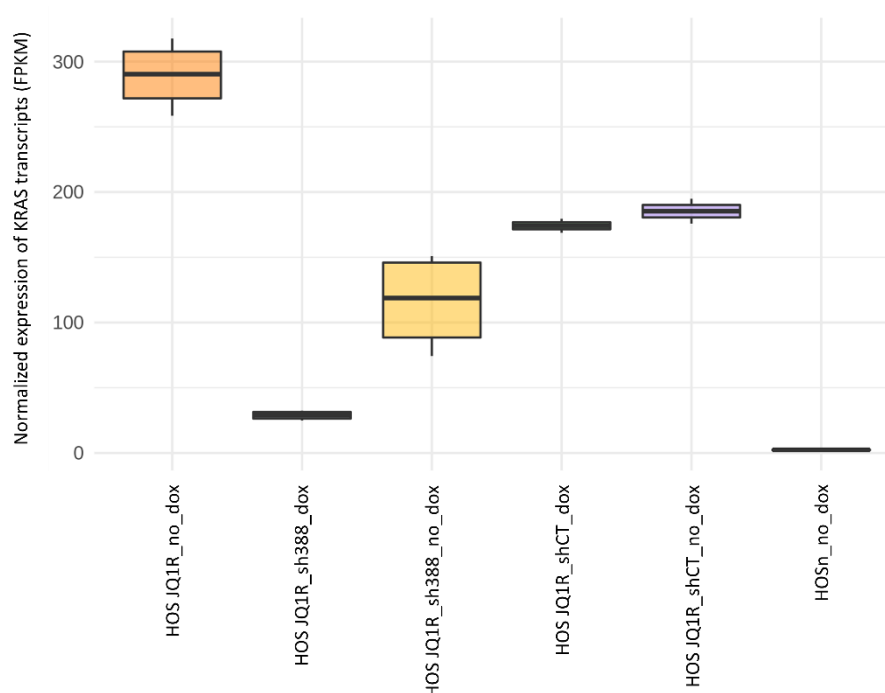


Figure 35 : Le ciblage de la protéine KRAS dans les cellules HOS JQ1R par transduction et induction de shRNA est confirmé par 3'SRP. Expression des transcrits de KRAS dans les cellules HOSn (HOSn_no_dox) et HOS JQ1R non transduites (HOS JQ1R_no_dox) et transduites avec le shCT (HOS JQ1R_shCT_dox et HOS JQ1R_shCT_no_dox) ou le sh388 (HOS JQ1R_sh388_dox et HOS JQ1R_sh388_no_dox) ciblant KRAS, exprimée en nombre de reads normalisé et représentée sous forme de Boxplot. L'analyse a été réalisée sur tous les transcrits de KRAS connus.

La quantification des transcrits de KRAS issue du 3'SRP confirme la surexpression de KRAS dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn. En effet, l'expression

normalisée des transcrits de KRAS est quasiment nulle pour les cellules HOSn, alors qu'elle est d'environ 300 pour des cellules HOS JQ1R. De plus, l'efficacité de la transduction du sh388 est validée par 3'SRP dans les cellules HOS JQ1R. En effet, la transduction, puis l'induction par la doxycycline du sh388, diminue d'environ 80 % l'expression transcriptionnelle de KRAS. La transduction et l'induction du shCT ne diminue que de 3 % l'expression transcriptionnelle de KRAS, confirmant le fait que transduire les cellules avec des shRNA et les traiter à la doxycycline, n'inhibe pas l'expression transcriptionnelle de KRAS (Figure 35). Tous ces résultats valident ce qui a été montré précédemment par les analyses du RNA-seq et les analyses *in vitro*, concernant l'expression de KRAS dans les HOSn et HOS JQ1R transduites ou non avec des shRNA ciblant KRAS.

Les transcrits différemment exprimés entre les cellules HOSn et HOS JQ1R transduites ou non avec des shRNA ciblant KRAS ainsi que l'enrichissement des voies de signalisation KEGG et des listes d'ontologie « Biological process » de Gene Ontology ont été analysés à partir des données provenant du 3'SRP.

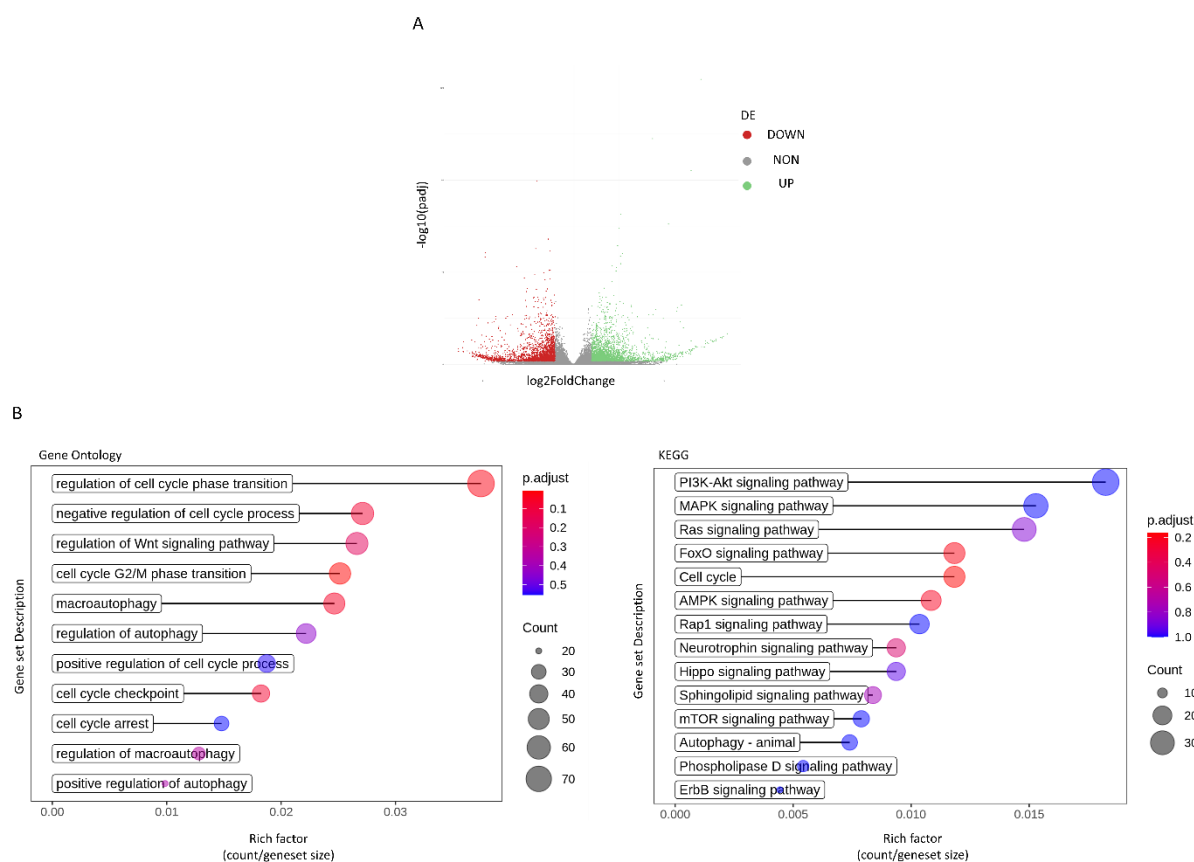


Figure 36 : Les cellules HOSn et HOS JQ1R présentent une expression différentielle de gènes, de voies de signalisation et de processus biologiques. (A) Volcano plot des transcrits différemment exprimés entre les cellules HOS JQ1R et HOSn dont les données sont issues du 3'SRP. Les transcrits sont différemment exprimés

si la p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du log2FoldChange est supérieur à 1. (B) Analyses de surreprésentation des ontologies (processus biologiques de Gene Ontology à gauche et KEGG à droite) des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules HOS JQ1R et les HOSn. Les données sont issues du 3'SRP.

Tout comme pour l'analyse du RNA-seq, l'analyse différentielle des données issues du 3'SRP met en évidence l'expression transcriptionnelle différentielle dans les deux lignées cellulaires, HOSn et HOS JQ1R. En effet, 3053 transcrits sont surexprimés (en vert, à droite de la Figure 36A) et 2448 sous-exprimés (en rouge, à gauche de la Figure 36A) dans les cellules HOS JQ1R, par rapport aux cellules HOSn. Une analyse de l'enrichissement des voies de signalisation KEGG et des listes d'ontologie « Biological process » de Gene Ontology a été réalisée. Des voies de signalisation comme les voies PI3K-Akt, MAPK ou encore RAS ainsi que des processus biologiques tels que l'autophagie sont amplifiés dans les cellules HOS JQ1R par rapport aux cellules HOSn. De plus, les termes de Gene Ontology « macroautophagy », « regulation of autophagy », « regulation of macroautophagy » mais aussi « positive regulation of autophagy » sont les plus significativement enrichis dans les cellules HOS JQ1R (Figure 36B). Ces observations sont similaires à celles mises en évidence par l'analyse transcriptomique issue du RNA-seq. Ainsi, des données de 3'SRP concernant les conditions où KRAS est inhibé par les shRNA inductibles peuvent être analysées.

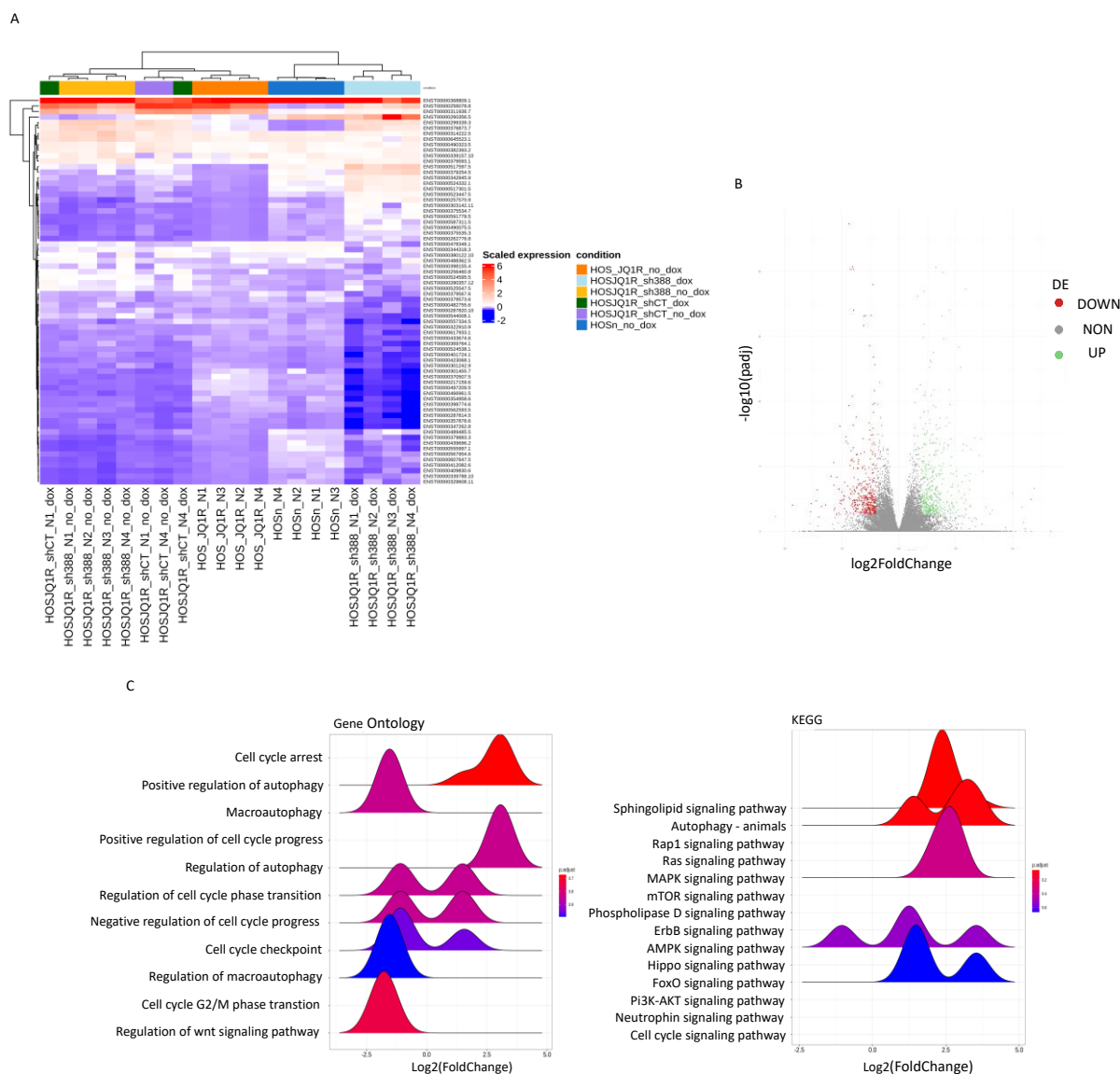


Figure 37 : La transduction et l'induction du sh388, ciblant KRAS, dans les cellules HOS JQ1R régulent certaines voies de signalisation et processus biologiques tels que l'autophagie. (A) Heatmap de l'expression des transcrits inversés par le sh388 ciblant KRAS. Les analyses ont été réalisées à partir des données issues du 3'SRP. Les transcrits sont considérés comme différentiellement exprimés si leur p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du Log2(FoldChange) est supérieure à 1. (B) Volcano plot des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 non induit et les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 induit par un traitement à la doxycycline. Les transcrits sont différentiellement exprimés si la p-value ajustée est inférieure à 0.05 et si la valeur absolue du log2FoldChange est supérieur à 1. (C) Ridgeplot Gene Ontology et RidgePlot KEGG montrant la répartition des transcrits différentiellement exprimés entre les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 non induit et les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 induit par un traitement à la doxycycline, selon leur Log2(FoldChange) pour chaque ontologie. Les données proviennent du 3'SRP. Les transcrits ayant un Log2(FoldChange) supérieur à 0 sont surexprimés alors que ceux présentant un Log2(FoldChange) inférieur à 0 sont sous-exprimés.

Les analyses bio-informatiques issues du 3'SRP montrent, qu'après avoir transduit et induit le sh388 avec un traitement à la doxycycline, les cellules HOS JQ1R ont un profil qui se rapproche des cellules HOSn. Sur la heatmap, 2 branches principales sont identifiées sur le dendrogramme et séparent bien un premier groupe incluant les cellules HOSn et les cellules HOS JQ1R dont l'expression du KRAS a été inhibée par l'induction du sh388 (condition HOS JQ1R_sh388_dox), d'un deuxième regroupant les conditions n'altérant pas l'expression de KRAS (HOS JQ1R_no_dox, HOS JQ1R_shCT_dox, HOS JQ1R_shCT_no_dox et HOS JQ1R_sh388_no_dox) (Figure 37A). Les données issues du 3'SRP montrent une expression transcriptionnelle différentielle après transduction et induction du sh388, avec 45 transcrits surexprimés (en vert, à droite de la Figure 37B) et 25 sous-exprimés (en rouge, à gauche de la Figure 37B) dans les cellules HOS JQ1R où KRAS est inhibé par le sh388 (Figure 37B). De plus, les analyses bio-informatiques issues du 3'SRP montrent que certains processus biologiques, tels que la macroautophagie ou les protéines qui régulent les protéines de l'autophagie (mais qui ne sont pas impliquées directement dans l'autophagie), sont sous-régulés dans les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 induit par la doxycycline (condition HOS JQ1R_sh388_dox). Ces résultats suggèrent que la surexpression de KRAS pourrait être à l'origine de la modulation du processus autophagique dans les cellules HOS JQ1R. L'autophagie est suractivée dans les cellules HOS JQ1R. La régulation positive de l'autophagie après inhibition de KRAS était attendue sous-régulée. Or les données de bio-informatiques montrent une sur-régulation de la régulation positive de l'autophagie (Figure 37C).

L'expression de la protéine LC3B-II dans les cellules HOSn et HOS JQ1R transduites ou non avec les shCT et sh388 a été analysée par western-blot.

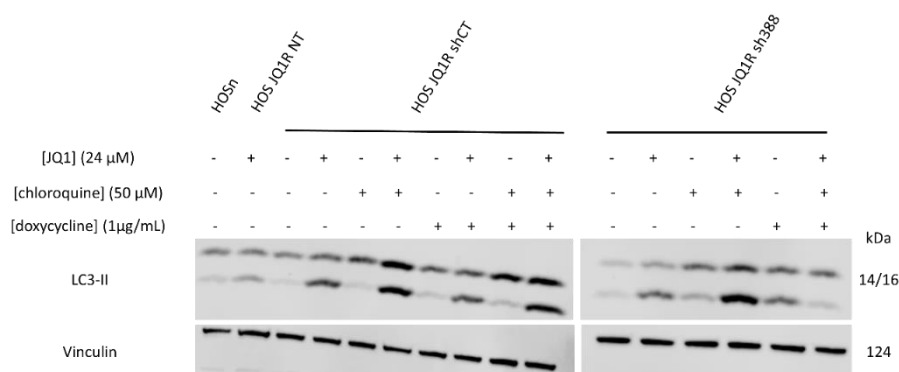


Figure 38 : Le ciblage de la surexpression de KRAS dans les cellules HOS JQ1R ne semble pas diminuer leur activité autophagique. Estimation du flux autophagique par western blot révélant l'accumulation du marqueur d'autophagosome, LC3-II, dans les lysats protéiques des cellules HOS JQ1R transduites avec un shRNA contrôle (shCT) ou un shRNA ciblant KRAS (sh388), en présence ou non de JQ1 (24 μ M), traitées ou non avec de la doxycycline (1 μ g/mL) pendant 96h, puis avec ou sans chloroquine (50 μ M) pendant 4h comparées aux cellules HOSn et HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3).

Le western-blot réalisé sur des cellules HOSn, HOS JQ1R non transduites ou transduites avec le shRNA contrôle (shCT) ou le shRNA ciblant KRAS (sh388) confirme certains résultats déjà obtenus auparavant comme le fait que les cellules HOS JQ1R présentent une activité autophagique plus importante que les cellules HOS naïves. Ce western blot atteste également que l'autophagie est amplifiée après un traitement au JQ1. En effet, l'expression de la protéine LC3B-II est augmentée dans les cellules HOS JQ1R transduites avec le shCT ou le sh388 et traitées avec 24 μ M de JQ1, comparée à ces mêmes cellules non traitées au JQ1 (Figure 38). De plus, l'expression de la protéine LC3B-II est légèrement augmentée dans les cellules HOS JQ1R transduites avec le shCT ou le sh388 et traitées avec 50 μ M de chloroquine (Figure 38). En revanche, cette augmentation ne semble pas être aussi prononcée que celle observée Figure 30 (Figure 38).

La transduction et l'induction du shCT n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine LC3B-II donc sur le flux autophagique dans les cellules HOS JQ1R transduites avec shCT (Figure 38). Il est à noter que le traitement à la doxycycline, nécessaire à l'induction des shRNA, semble augmenter très légèrement l'expression de la protéine LC3B-II dans les cellules HOS JQ1R transduites avec le shCT (Figure 38).

Le ciblage de KRAS dans les cellules HOS JQ1R, après induction du sh388 à la doxycycline, ne diminue pas l'expression de LC3B-II, comme attendu, mais au contraire l'augmente comparativement à la condition basale (HOS JQ1R transduite avec le sh388 sans traitement JQ1, chloroquine et doxycycline). En revanche, lorsque le ciblage de KRAS est combiné à un traitement au JQ1 et à la chloroquine, l'expression de la protéine LC3B-II est diminuée et semble atteindre le niveau basal observé dans les HOS JQ1R (Figure 38). L'interprétation de ces résultats est néanmoins difficile car l'expression de la protéine LC3B-II n'a pas pu être évaluée dans les cellules HOS JQ1R transduites avec le sh388 traitées à la doxycycline et à la chloroquine ou au JQ1, à cause d'une quantité insuffisante de protéines. De plus des conclusions ne pourront être données qu'après avoir réitérées plusieurs fois l'expérience.

L'ensemble de nos données suggère que le ciblage de KRAS dans les cellules HOS JQ1R par un shRNA permet de s'approcher d'un profil transcriptomique de cellules HOSn, suggérant alors que la surexpression de KRAS joue bien un rôle dans l'acquisition de la résistance au JQ1 (Figure 37). Néanmoins, l'analyse de l'autophagie réalisée à l'aide d'un western blot n'a, pour le moment, pas confirmé ces données (Figure 38).

En plus de la surexpression de la protéines KRAS, les données RNA-seq ont permis d'identifier une mutation du gène KRAS dans les cellules HOS JQ1R, qui pourrait elle aussi jouer un rôle dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET (Figure 39).

Les cellules HOS JQ1R présentent une mutation KRAS4a^{G12S}.

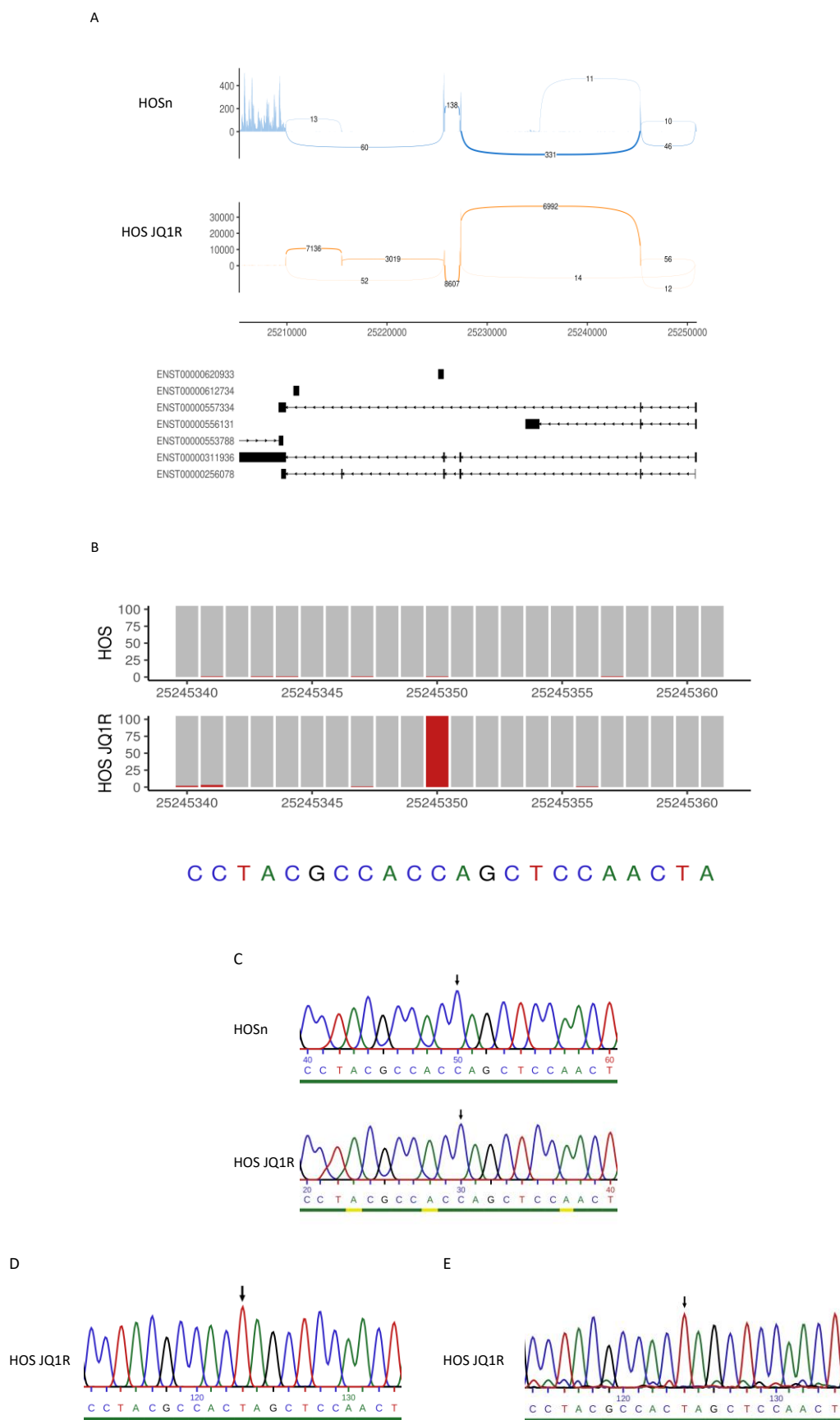


Figure 39 : Les données du RNA-seq montrent la présence d'une mutation de KRAS (KRAS^{G12S}) dans les cellules HOS JQ1R. (A) Graphique Sashimi de l'alignement génomique des données RNA-seq sur la région génomique de

KRAS. Les arcs représentent le nombre moyen de jonctions identiques entre les réplicats de la même condition. (B) Ratio du nombre de bases différentes du génome de référence (en rouge) selon la profondeur totale, sur une partie de l'exon 2 de KRAS. (C) Séquençage SANGER réalisé à partir de l'ADN génomique des cellules HOSn et des cellules HOS JQ1R avec un couple d'amorce designé sur les introns à proximité de l'exon 2 (noté 1 dans la partie 18 du matériels et méthodes) (N=2). (D) Séquençage SANGER réalisé à partir de l'ARNm des cellules HOS JQ1R rétro-transcrits en ADN. Le couple d'amorces utilisé pour ce séquençage a été designé sur les exons 1 et 3 (noté 2 dans la partie 18 du matériels et méthodes) (N=1). (E) Validation de la présence de la mutation KRAS^{G12S} sur l'ADN des cellules HOS JQ1R par séquençage SANGER réalisé à partir de l'ADN génomique cellules HOS JQ1R. Le design de ce couple d'amorces a été designé sur les l'exon 1 et 3. (noté 2 dans la partie 18 du matériels et méthodes) (N=1).

Les données provenant du RNA-seq mettent en évidence la présence de la mutation KRAS^{G12S} dans les cellules résistantes au JQ1. Les cellules HOSn et HOS JQ1R présentent des jonctions différentes entre les exons. Dans les cellules HOSn, la plupart des jonctions relient les exons 3 avec les exons 4b, relié à la partie 3'UTR. Dans les cellules HOS JQ1R, les jonctions majoritaires relient les exons 3, avec les exons 4a, puis les exons 4b. De plus, la partie 3'UTR des cellules HOS JQ1R est plus courte comparativement à celle des cellules HOSn (Figure 39A). La visualisation de l'alignement des « reads » sur le génome de référence avec l'integrative genomic viewer (IGV), révèle une mutation p.G12S (Figure 39B). Afin de confirmer la présence de cette mutation sur l'ADN, un séquençage de SANGER a été réalisé. Un premier séquençage a été réalisé à l'aide d'amorces désignées sur les introns à proximité de l'exon 2 et n'a pas permis de démontrer la présence de la mutation KRAS^{G12S} sur l'ADN des cellules HOS JQ1R (Figure 39C). Dans le but de vérifier si la mutation était bien présente sur l'ARNm comme le montre le RNAseq, l'ARNm des cellules HOSn et des cellules HOS JQ1R a été rétro-transcrits en ADN. Les produits de cette rétro-transcription ont alors été séquencés via la technique de Sanger avec, cette fois-ci des amorces se fixant au niveau des exons 1 et 3 du gène de KRAS. La mutation apparaît bien sur l'ADN des cellules HOS JQ1R (Figure 39B). Dans un troisième temps, ces mêmes amorces ont été utilisées directement sur le génome. Cela a alors permis l'amplification du gène KRAS4a muté G12S (Figure 39C). Ce séquençage, a en revanche montré l'absence d'introns dans la séquence du KRAS génomique. Une analyse plus approfondie de ce séquençage Sanger, a révélé que le KRAS séquencé n'était pas un KRAS humain mais un KRAS de rat et que ce KRAS présente bien la mutation G12S.

Il semblerait, que le développement de la lignée résistante au JQ1 ait finalement été réalisé à partir des cellules KHOS. En effet, les lignées HOS-MNNG, KHOS et 143B, disponibles au laboratoire, sont issues de la même patiente mais ont été immortalisées de manières différentes. La lignée HOS-MNNG est dérivée des cellules HOS par transformation avec 0,001 mg/mL de MNNG, une nitrosamine cancérigène. La lignée 143B a été générée par transformation des cellules HOS avec l'oncogène K-ras. Enfin, la lignée KHOS est dérivée de la lignée cellulaire HOS par transformation à l'aide du Kirsten murine sarcoma virus (Ki-MSV), présentant le KRAS muté G12S. Cependant, les cellules HOS-MNNG et les cellules KHOS n'expriment pas la protéine KRAS comme montré par western-blot (Figure 38), alors que les cellules 143B, exprime la protéine KRAS (Figure 38). De plus, ces 3 lignées sont sensibles à JQ1, même les cellules 143B qui, pourtant exprime KRAS. Il semblerait qu'il y ait eu une confusion entre les lignées HOS-MNNG et KHOS, qui sont difficilement distinguables même avec un profil STR (par exemple, leurs profils STR sont identique sur le site de l'ATCC), dans lequel elles diffèrent sur seul microstaellite. Par conséquent, la lignée d'ostéosarcome utilisée pour le développement de résistance était, non pas des cellules HOS-MNNG, mais des cellules KHOS, présentant un KRAS de rat muté G12S, retrouvé lors du deuxième séquençage de Sanger et pas à l'endroit attendu.

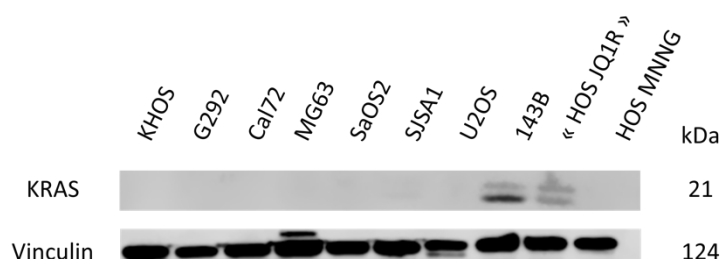


Figure 40 : Expression protéique de KRAS au sein des lignées d'ostéosarcomes présentes au laboratoire. Expression de la protéine KRAS analysée par western blot dans les lysats protéiques des cellules d'ostéosarcome. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3).

Les résultats jusqu'alors obtenus devront être confirmés en les cellules KHOS JQ1R comparant au bon contrôle, c'est-à-dire à des KHOS parentales, sensibles au JQ1. Cependant, cette lignée KHOS est sensible à JQ1 et n'exprime pas la protéine KRAS. Ce qui veut dire, que les cellules KHOS JQ1R ont subi des modulations moléculaires et notamment une activation de la voie KRAS, montrée par une sur-expression transcriptionnelle et protéique KRAS et une addiction vitale de cette voie, puisque l'inhibition de KRAS dans cette lignée réduit la viabilité cellulaire. Nous avons donc un modèle cellulaire artificiel de résistance à JQ1 probablement en

lien avec l'activation de KRAS, et qui est même spécifique aux BETi, puisque cette lignée KHOS JQ1R est également résistante à l'I-BET 151 mais reste sensible aux chimiothérapies conventionnelles.

Après avoir mis en évidence, par RNA-seq, la présence de la mutation KRAS^{G12S} dans les cellules KHOS JQ1R, une des hypothèses de travail était que la mutation KRAS^{G12S}, pouvait être une des causes de l'acquisition de la résistance au JQ1 dans les cellules KHOS JQ1R.

Transduction de plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S} dans des lignées d'ostéosarcome naïves au JQ1

Afin d'étudier le potentiel rôle de la mutation de KRAS dans l'acquisition de la résistance au JQ1, des cellules d'ostéosarcome sensibles au JQ1, HOSn et MG63, ont été transduites avec un plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}. Ces cellules ont également été transduites avec un plasmide de surexpression de la forme sauvage (Wide Type - WT) de KRAS. Ces deux plasmides de surexpression sont inductibles à la doxycycline. La transduction de ces deux plasmides dans les cellules HOSn et MG63 avaient pour but de déterminer si la surexpression de KRAS et/ou la présence la mutation de KRAS dans les cellules résistantes sont à l'origine des modulations observées entre les cellules sensibles et résistantes au JQ1. Les effets de la surexpression des plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S} ont été évalués par des tests de viabilité cellulaire (Figure 41).

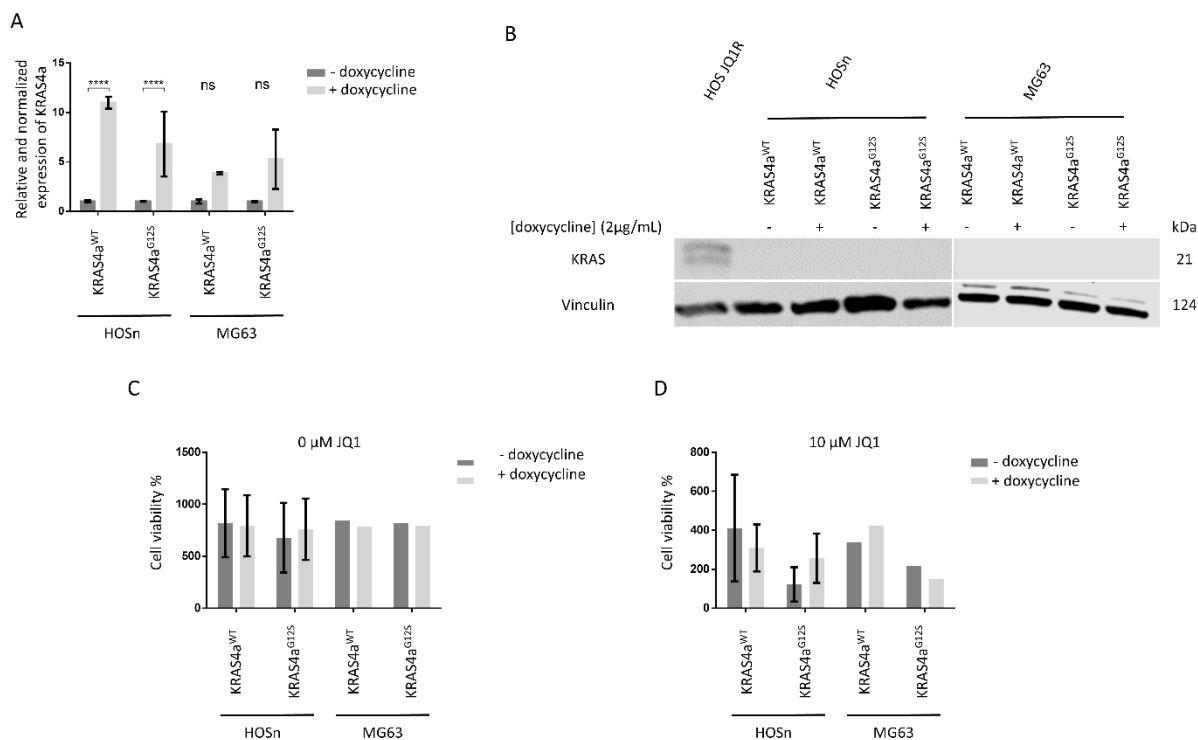


Figure 41 : Transduction des plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S} dans deux lignées d'ostéosarcome sensibles au JQ1 : HOSn et MG63. (A) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS (KRAS4a) analysée par RT-qPCR dans des cellules HOSn et MG63 transduites avec les plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} ou KRAS4a^{G12S}, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2-ΔΔCt, * : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur p≤0,05) (N=3 pour les HOSn et N=1 pour les MG63). (B) Expression de la protéine KRAS évaluée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOSn ou MG63 transduites avec les plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} ou KRAS4a^{G12S}, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h, comparées aux cellules HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3 pour les HOSn et N=1 pour les MG63). (C) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et MG63 transduites avec des plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} ou KRAS4a^{G12S}, ensemencées à raison de 2 500 cellules par puits en plaques 96 puits et traitées avec de la doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition KRAS4a^{WT} sans doxycycline au temps 0 (3heures d'ensemencement) (N=2 pour les HOSn et N=1 pour les MG63). (D) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et MG63 transduites avec des plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} ou KRAS4a^{G12S}, ensemencées à raison de 2 500 cellules par puits en plaque 96 puis et traitées avec de la doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h et 10 µM de JQ1 pendant 96h. Moyenne des pourcentages de viabilité par rapport à la condition KRAS4a^{WT} sans doxycycline au temps 0 (3heures d'ensemencement) (N=2 pour les HOSn et N=1 pour les MG63).

L'efficacité de transduction des deux plasmides de surexpression a été étudiée dans les cellules HOSn et MG63. L'expression transcriptionnelle de KRAS4a est 11 et 3,84 fois plus élevée dans les cellules HOSn et les MG-63, respectivement après la transduction et l'induction

par la doxycycline du plasmide de surexpression de KRAS4a^{WT} (Figure 41A). L'expression transcriptionnelle de KRAS4a est également augmentée de 6,8 et 5,3 dans les cellules HOSn et MG63, respectivement, suite à la transduction et l'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} (Figure 41A). Le western-blot, montre néanmoins, l'absence de l'expression de la protéine KRAS que ce soit dans les cellules HOSn ou MG63 transduites avec les plasmides de surexpression de la forme sauvage ou mutée de KRAS, et ce même après induction de l'expression du plasmide par un traitement à la doxycycline (Figure 41B). De plus, aucun de ces plasmides de surexpression n'a montré son efficacité biologique dans les cellules HOSn et MG63 après transduction et induction avec de la doxycycline (Figure 41C et 41D). En effet, sans traitement à JQ1, la transduction et l'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{WT}, n'augmente pas la viabilité cellulaire des cellules et la diminue même de 3 % pour les cellules HOSn et de 7 % pour les cellules MG63. La transduction et l'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, augmente la viabilité cellulaire des cellules HOSn de seulement 11 % et diminue celle des cellules MG63 de 3 % (Figure 41C). La viabilité des cellules HOSn et MG63 transduites avec les plasmides de surexpression de KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S} a été évaluée après un traitement avec 10 µM de JQ1. Si la surexpression de KRAS4a^{WT} ou la présence de la mutation KRAS4a^{G12S} jouent un rôle dans l'acquisition de la résistance à JQ1, les cellules alors traitées devraient résister au JQ1, donc avoir une viabilité cellulaire augmentée lors de l'induction des plasmides de surexpression. Contrairement à ce qui était attendu, la transduction et l'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{WT}, n'augmente pas la viabilité cellulaire des cellules HOSn et la diminue même de 25 %. La viabilité des cellules MG63 est quant à elle bien augmentée mais de manière non significative. La transduction et l'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, augmente la viabilité cellulaire des cellules HOSn de seulement 25 % et diminue celle des cellules MG63 de 31 % (Figure 41D). L'efficacité de la transduction et de l'induction des plasmides de surexpression semble très faible. En effet, l'expression transcriptionnelle de KRAS4a est multipliée au mieux par 6,8 (Figure 41A). De plus, la protéine KRAS n'est pas exprimée alors qu'elle devrait l'être après l'induction des plasmides de surexpression à la doxycycline (Figure 41B). Des expériences complémentaires ont été réalisées dans le but de mettre au point les conditions expérimentales optimales permettant la surexpression des protéines KRAS4a^{WT} et KRAS4a^{G12S}. Pour ce faire, le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} a été transfecté transitoirement dans une lignée cellulaire de rein HEK 293, connue pour être facilement transfectable. L'efficacité de transfection a été évaluée par RT-qPCR et western-blot (Figure 42).

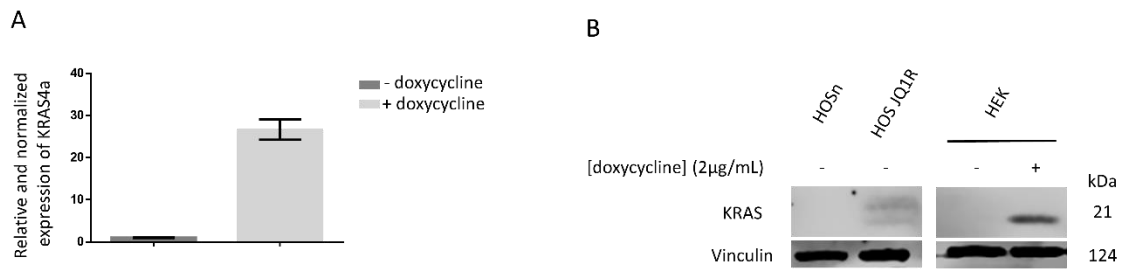


Figure 42 : Transfection transitoire du plasmide de surexpression $KRAS4a^{G12S}$ dans une lignée cellulaire de rein HEK 293. (A) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS ($KRAS4a$) analysée par RT-qPCR dans des cellules HEK 293 transfectées avec le plasmide de surexpression de $KRAS4a^{G12S}$, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2- $\Delta\Delta Ct$) (N=1). (B) Expression de la protéine KRAS dans les lysats protéiques des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec le plasmide de surexpression de $KRAS4a^{G12S}$, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 96h, comparée aux cellules HOSn et HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=2).

L'expression transcriptionnelle du variant a de KRAS est 27 fois plus élevée dans les cellules HEK après transfection et induction par la doxycycline du transgène $KRAS4a^{G12S}$ (Figure 42A). De plus, l'expression de la protéine KRAS est bien induite par le traitement à la doxycycline dans les cellules HEK transduites avec le plasmide de surexpression de $KRAS4a^{G12S}$ (Figure 42B).

Ces résultats montrent donc que le plasmide de surexpression de $KRAS4a^{G12S}$ a pu être transfecté dans les cellules HEK et que le traitement à la doxycycline induit l'expression transcriptionnelle et protéique de KRAS. Des expériences faisant varier le temps d'exposition à la doxycycline des cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de $KRAS4a^{G12S}$ ont alors été réalisées. Les expressions transcriptionnelles et protéiques de KRAS dans ces cellules ont été évaluées après un traitement de 5, 10 ou 15 jours à la doxycycline (Figure 43).

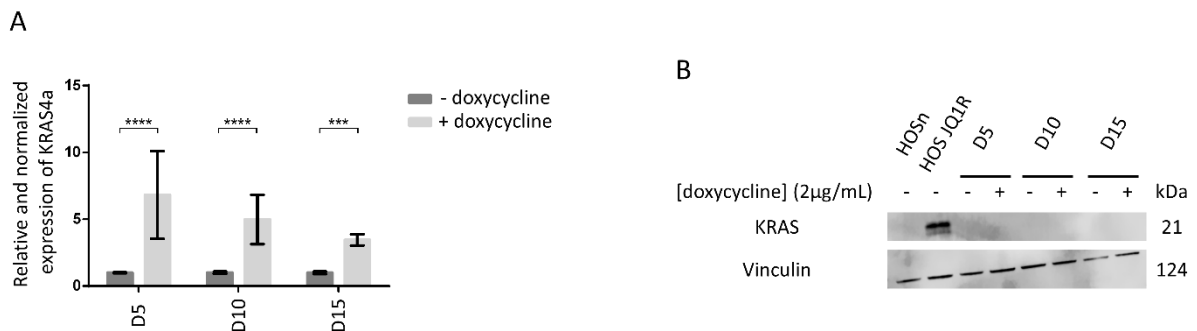


Figure 43 : Transduction et induction pendant 5, 10 ou 15 jours du plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} dans les cellules HOSn. (A) Expression transcriptionnelle du variant a de KRAS (KRAS4a) analysée par RT-qPCR dans des cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 5, 10 ou 15 jours. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode 2-ΔΔCt, * : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B) Expression de la protéine KRAS dans les lysats protéiques des cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 5, 10 ou 15 jours, comparées aux cellules HOSn et HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=3).

L'expression transcriptionnelle de KRAS4a est 6,8, 5 et 3,5 fois plus élevée dans les cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} et traitées pendant 5, 10 et 15 jours à la doxycycline, respectivement (Figure 43A). L'expression de la protéine KRAS n'est pas induite après 5, 10 et 15 jours de traitement à la doxycycline des cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} (Figure 43B).

L'augmentation du temps d'exposition à la doxycycline, donc l'augmentation du temps d'induction du plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, n'augmente pas l'expression transcriptionnelle de KRAS, et la diminue même. De plus, cette augmentation du temps de traitement n'induit pas non plus l'expression protéique de KRAS.

Un des objectifs de cette partie était de déterminer si la surexpression de KRAS et/ou la présence de la mutation KRAS^{G12S} dans les cellules résistantes sont à l'origine des modulations observées, telles que la suractivation de l'autophagie. L'expression des protéines LC3B-II et p62 ont ainsi été évaluées dans les cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} et traitées pendant 5,10 ou 15 jours avec de la doxycycline (Figure 44).

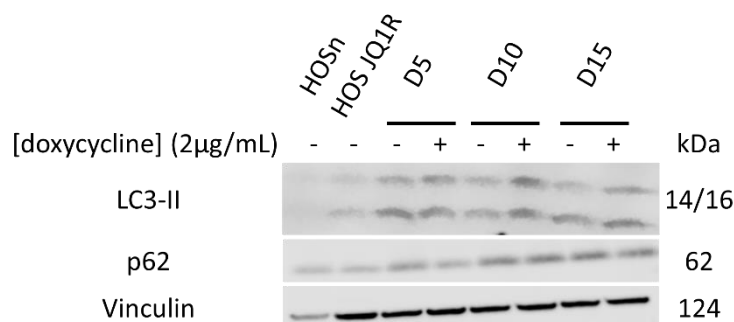


Figure 44 : Étude de l'autophagie par western blot révélant l'expression du marqueur d'autophagosome, LC3-II, ainsi que l'expression de la protéine p62, intervenant dans la reconnaissance des protéines ubiquitinylées, dans les lysats protéiques des cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} en présence ou non de doxycycline (2 µg/mL) pendant 5,10 ou 15 jours, comparées aux cellules HOSn et HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=1).

L'expression de la protéine LC3B-II semble être plus élevée dans les cellules HOSn transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S} que dans les cellules HOS JQ1R. Néanmoins, l'induction de l'expression de KRAS4a^{G12S} dans les cellules HOSn n'induit pas d'augmentation d'expression de la protéine LC3B-II, normalement attendue. De plus, aucune différence d'expression de la protéine p62 n'est visible entre les conditions plus ou moins doxycycline. L'augmentation de l'expression de la protéine p62 n'est donc pas le résultat de l'induction de l'expression de KRAS4a^{G12S}. Ces résultats, en plus du manque d'expression de KRAS dans les cellules transduites avec le plasmide de surexpression de KRAS4a^{G12S}, ne permettent pas de lier la suractivation de l'autophagie à la surexpression de KRAS ou à la présence de la mutation de KRAS4a^{G12S} (Figure 44).

L'autophagie n'est pas le seul mécanisme moléculaire suractivé dans les HOS JQ1R. En effet, d'après les analyses issues du RNA-seq, les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt/mTOR font partie des voies KEGG les plus enrichies.

d) Suractivation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT/mTOR

L'expression de protéines appartenant aux voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt/mTOR a été évaluée dans les cellules HOSn et HOS JQ1R (Figure 45).

Les cellules HOS JQ1R surexpriment des protéines de la voie MAPK et PI3K/Akt/mTOR

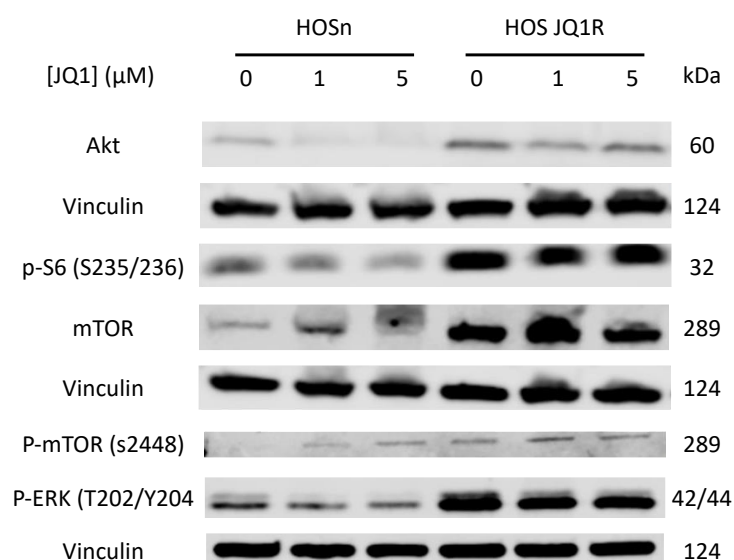


Figure 45 : Les cellules HOS JQ1R surexpriment p-ERK (une protéine de la voie MAPK) mais également Akt, mTOR, p-S6 (protéines de la voie PI3K/AKT/mTOR). Expression de protéines de la voie MAPK et PI3K/AKT/mTOR analysée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R en présence de 0, 1 ou 5 μM de JQ1 pendant 48h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=1).

La protéine p-ERK(T202/Y204), appartenant à la voie de signalisation MAPK, est surexprimée dans les cellules HOS JQ1R traitées ou non avec du JQ1, comparée aux cellules HOSn. Les protéines Akt, mTOR ainsi que p-S6, appartenant à la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, sont surexprimées dans les cellules HOS JQ1R, comparativement aux cellules HOSn, et ce en présence ou en absence de JQ1. Le western-blot réalisé a donc confirmé la surexpression de protéines clés des voies MAPK, PI3K/Akt/mTOR dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn. La suractivation de ces voies pourrait être ciblée afin d'induire une sensibilisation des cellules résistantes au JQ1 (Figure 45).

e) L'activité métabolique semble être augmentée dans la lignée d'ostéosarcome résistante au JQ1

L'expression de certains transcrits spécifiques, tels que le transcrit de l'enzyme LDH, ont été évalués à partir des données issues RNA-seq, réalisés sur 4 répliquats biologiques de chaque lignée cellulaire (HOSn et HOS JQ1R). Les expressions transcriptionnelles et

protéiques de LDHA ainsi que son activité dans les cellules HOSn et HOS JQ1R ont ensuite été analysées.

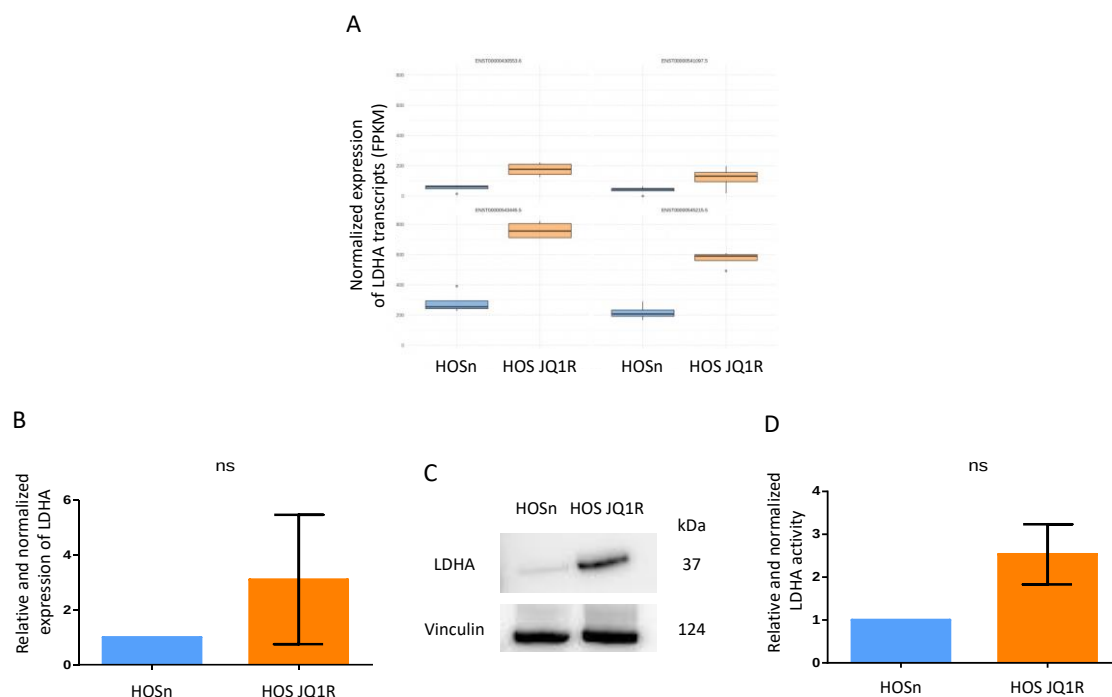


Figure 46 : L'expression et l'activité de la LDHA semble être augmentée dans les cellules HOS JQ1R comparées aux cellules HOSn. (A) Boxplot de l'expression des transcrits de LDH, dont les données sont issues du RNA-seq réalisés sur 4 réplicats biologiques de chaque lignée cellulaire. L'analyse a été réalisée sur tous les transcrits de LDH connus. (B) Expression transcriptionnelle d'une enzyme de la glycolyse, LDHA, analysée par RT-qPCR dans les cellules HOS JQ1R par rapport aux cellules HOSn. Moyenne des expressions relatives et normalisées (Méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, test de Mann withney, $p\text{-value} \leq 0,05$) ($N=2$). (C) Expression de la protéine LDHA analysée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge ($N=3$). (D) Évaluation de la glycolyse par mesure de l'activité LDHA dans les cellules HOS JQ1R par rapport aux cellules HOSn. (Test de Mann withney, valeur $p \leq 0,05$) ($N=3$). Les graphiques B, C et D sont issus des expériences réalisées par Mélanie Lavaud.

La quantification du RNA-seq réalisée au niveau des transcrits a montré une surexpression de la lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme impliquée dans la glycolyse, dans les cellules résistantes au JQ1 comparativement aux cellules HOSn. En effet, les cellules HOS JQ1R comptent 3 fois plus de transcrits de la LDH comparées aux cellules HOSn (Figure 46A). Au laboratoire, Mélanie Lavaud avait déjà montré la surexpression de la LDHA au niveau transcriptionnel et protéique dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn (Figure 46B et Figure 46C). Les cellules HOS JQ1R expriment 2 fois plus le gène de la LDHA

comparativement aux cellules HOSn (Figure 46B). D'après le western blot réalisé sur les culots protéiques des cellules HOS JQ1R et HOSn, l'expression de la protéine LDHA est augmentée dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn (Figure 30B). De plus, l'activité de cette enzyme semble être augmentée dans les cellules HOS JQ1R, puisqu'elle est environ 2,5 fois plus élevée que dans les cellules HOSn (Figure 46D).

Ces résultats montrent que les cellules résistantes au JQ1 semblent avoir une activité métabolique amplifiée comparée aux cellules naïves, suggérant un rôle du métabolisme dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET.

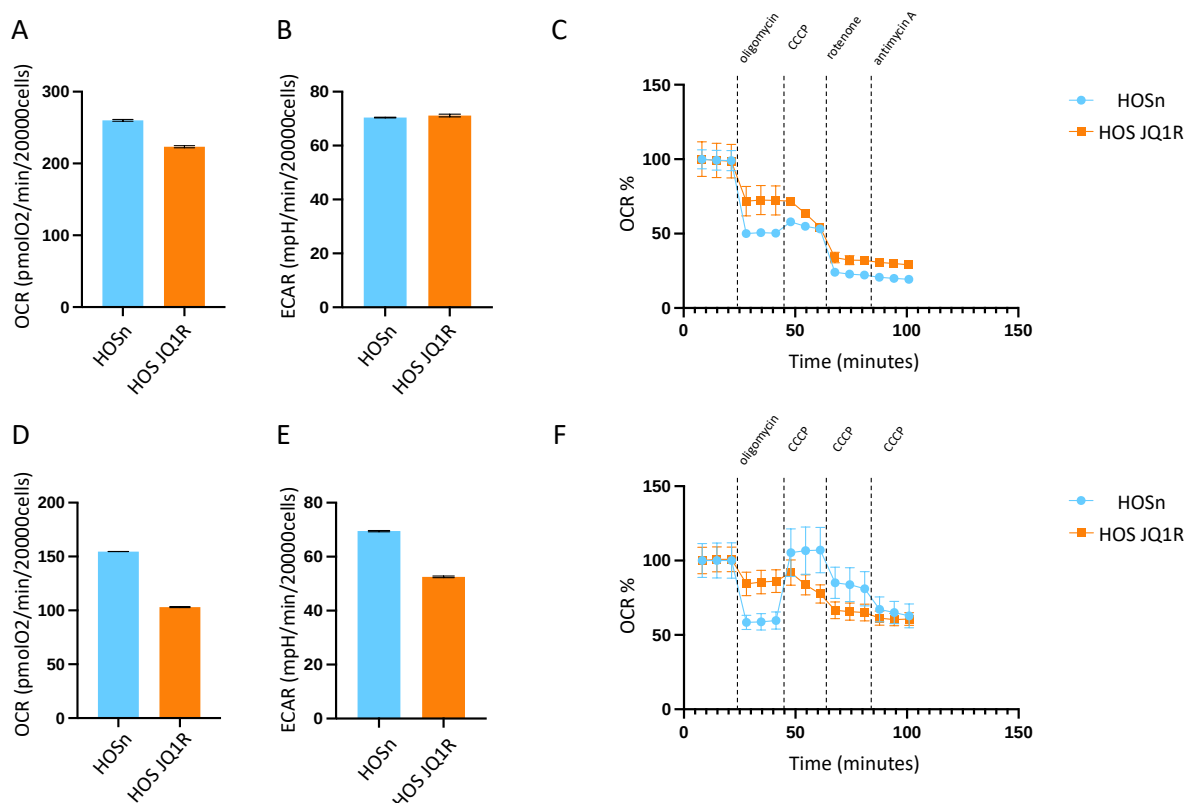


Figure 47 : Profil respiratoire mitochondrial des cellules HOSn et HOS JQ1R. (A) taux de consommation d'oxygène basal (OCR) en pmolO₂/min/20000cells et (B) taux d'acidification extracellulaire basal (ECAR) en mpH/min/20000cells des cellules HOSn et HOS JQ1R (C) taux de consommation d'oxygène (OCR) en % des cellules HOSn et HOS JQ1R incubées 30 minutes avant l'expérience dans un milieu sigma complétement avec 25 mM de glucose, 4 mM de glutamine et 1,25 mM de pyruvate, puis injecté consécutivement avec de l'oligomycine (1 μ M), du CCCP (1,5 μ M), de la rotenone (1 μ M) et de l'antimycine A (1 μ M). (D) taux de consommation d'oxygène basal (OCR) en pmoles/min/20000cells et (E) du taux d'acidification extracellulaire basal (ECAR) en mpH/min/20000cells dans les cellules HOSn et HOS JQ1R (F) taux de consommation d'oxygène en % dans les cellules HOSn et HOS JQ1R incubées 30 minutes avant l'expérience dans un milieu sigma complétement avec 25 mM de glucose, 4 mM de glutamine et 1,25 mM de pyruvate et injectées consécutivement avec de l'oligomycine (1

μM), puis trois concentrations différentes de CCCP (0,15 μM , 0,15 μM et 0,2 μM). (A-F) Les valeurs OCR et ECAR sont représentées sous forme de moyenne $\pm$ SD ($N=1$).

Dans le but de comparer le métabolisme énergétique des cellules HOSn et HOS JQ1R, le taux de consommation d'oxygène (OCR), indicateur de la respiration mitochondriale, et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR), indicateur de la glycolyse, ont été mesurés à l'aide de la technologie Seahorse. Après avoir déterminé les densités cellulaires optimales, une expérience de Seahorse a été réalisée en suivant le protocole standard d'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Un μM d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase-complexe V de la mitochondrie), suivi de 1 μM de CCCP (agent découplant), 1 μM de roténone (inhibiteur du complexe I de la mitochondrie) et enfin 1 μM d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la mitochondrie) ont été injectés dans le milieu de culture des cellules (Figure 47A, 47B et 47C). La respiration basale et la glycolyse basale ne semblent pas être différentes entre les cellules HOSn et HOS JQ1R (Figure 47A et 47B). En effet, l'OCR des cellules HOSn et HOS JQ1R sont de 260 et 220 pmol O₂/min/20000cells, respectivement (Figure 47A). Le taux d'acidification (ECAR) est quasiment similaire entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, puisqu'elle est de 154 mpH/min/20000cells pour les cellules HOSn et de 103 mpH/min/20000cells pour les cellules HOS JQ1R (Figure 47B). Les données issues de la mesure de l'OCR permettent de rendre compte de la respiration basale mais aussi de la respiration liée à l'ATP et de la fuite de proton, de la capacité maximale respiratoire et enfin de la capacité de réserve. La respiration liée à l'ATP et la fuite de protons peuvent être mesurées après l'injection de l'oligomycine. Ces valeurs semblent légèrement différentes entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, puisque l'OCR des cellules HOSn est d'environ 50 % et celle des cellules HOS JQ1R de 72 %. La respiration maximale ainsi que la capacité de réserve évaluées après l'injection CCCP n'ont cependant pas pu être déterminée. En effet, après l'injection du CCCP, là où une augmentation de la valeur de l'OCR devrait être observée, l'OCR des cellules HOSn et HOS JQ1R chute drastiquement. L'injection de CCCP à une concentration de 1 μM serait trop élevée, entraînant la mort des cellules (Figure 47C).

La concentration de CCCP injecté a dû être mise au point. Dans le second essai, 1 μM d'oligomycine, suivi de 3 injections de CCCP aux concentrations de 0,15 μM , 0,15 μM et enfin 0,2 μM de CCCP ont été injectés dans le milieu de culture des cellules (Figure 47D, 47E et 47F). Pour ce deuxième essai, la différence de respiration basale dans les cellules HOSn et HOS JQ1R est plus prononcée que pour le premier essai. En effet, l'OCR des cellules HOSn est d'environ 155 pmolO₂/min/20000cells alors qu'elle est de 103 pmolO₂/min/20000cells pour

les cellules HOS JQ1R. Dans cet essai, les cellules HOSn semblent donc avoir une respiration basale plus importante que les cellules HOS JQ1R (Figure 47D). Dans cet essai, le taux d'acidification (ECAR) est légèrement différent entre les cellules HOSn et HOS JQ1R, puisqu'il est de 69 mpH/min/20000cells pour les cellules HOSn et de 52 mpH/min/20000cells pour les cellules HOS JQ1R (Figure 47E). La respiration liée à l'ATP et la fuite de protons ne semblent être différentes entre les cellules, puisque l'OCR des cellules HOSn est d'environ 59 pmolO₂/min/20000cells et celle des cellules HOS JQ1R de 78 pmolO₂/min/20000cells. Cette fois-ci, l'injection de 0,15 μ M de CCCP a augmenté l'OCR dans les cellules HOSn d'environ 47 pmolO₂/min/20000cells mais ne semblent pas augmenter celle des cellules HOS JQ1R. Ces résultats correspondant à l'effet maximal avant une diminution après les autres injections qui laisse supposer que la concentration de CCCP devient trop importante et que les cellules meurent (Figure 47F). A une dose de 0,15 μ M de CCCP, la dose maximale est atteinte. Cela signifie que l'oligomycine induit une inhibition plus faible de la respiration au sein des cellules HOS JQ1R donc que ces cellules semblent moins utiliser leurs mitochondries pour produire de l'ATP comparées aux cellules HOSn. De plus, l'effet du CCCP est quasiment nul sur les cellules HOS JQ1R alors qu'il est maximal sur les cellules HOSn, montrant que les cellules résistantes au JQ1 ont peu de réserve (comme le NADH) à utiliser pour maintenir l'activité de la chaîne respiratoire. Les résultats alors obtenus laissent penser que même si la consommation d'oxygène est similaire entre les 2 lignées, HOSn et HOS JQ1R, les adaptations des mitochondries dans les cellules HOS JQ1R sont beaucoup moins flexibles du point de vue de l'activité métabolique. De plus, ces adaptations mitochondriales pourraient se traduire par une activité des complexes I et II différente entre les cellules HOSn et les HOS JQ1R.

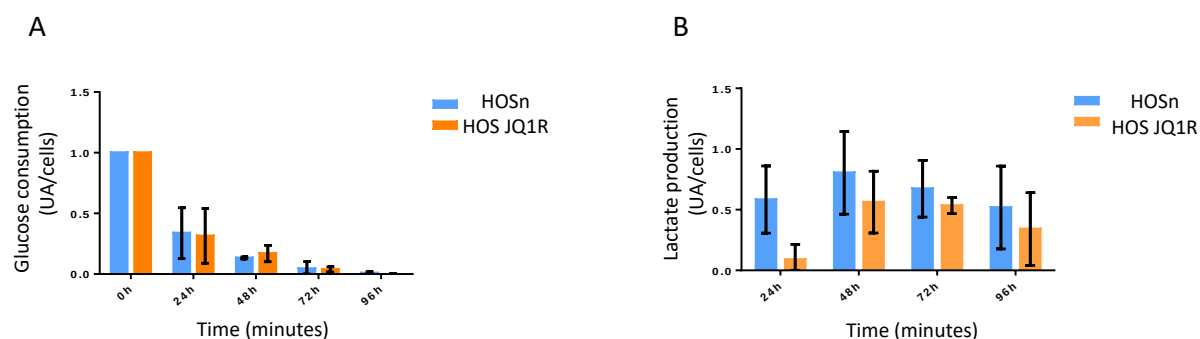


Figure 48 : Consommation de glucose et production de lactate dans les cellules HOSn et HOS JQ1R. (A) Mesure de la consommation de glucose et (B) mesure de la production de lactate par les cellules HOS et HOS JQ1R après

24, 48, 72 et 96h de culture dans du milieu en faible teneur en glucose, complétement de 10 % de SVF. Normalisation par rapport au nombre de cellules par puits (N=1).

En parallèle, les consommations de glucose et de lactate au sein des cellules HOS JQ1R et HOSn ont été mesurées après 24, 48, 72 et 96 heures de culture (Figure 48A et 48B). La consommation de glucose ne semble pas être différente entre les deux lignées cellulaires. En effet, après 24 heures d'ensemencement, les cellules HOSn ont consommé 66.24 % du glucose et les cellules HOS JQ1R en ont consommé 38.53 %. A 48 heures, 86.73% et 83.08 % de glucose sont consommés par les cellules HOSn et HOS JQ1R. Après 72 heures d'ensemencement, aucune différence de consommation de glucose n'est observée entre les cellules HOSn et HOS JQ1R. 95.51 % de glucose est consommé par les cellules HOSn et 96.14 % par les cellules HOS JQ1R. A 96 heures, les cellules HOS JQ1R ont consommé la quasi-totalité du glucose (99.94 %) et les cellules HOSn en ont consommé 99.22 % (Figure 48A). En ce qui concerne la sécrétion de lactate, étonnamment, les cellules HOSn semblent sécréter plus de lactate comparé aux cellules HOS JQ1R. En effet, après 24 heures d'ensemencement les cellules HOSn ont sécrété 6.5 fois plus de lactate que les cellules HOS JQ1R. A 48, 72 et 96 heures, la tendance reste la même puisque la quantité de lactate sécrétée par les cellules HOS JQ1R est 1,4, 1,3 et 15 fois plus importante que celle sécrétée par les cellules HOS JQ1R, respectivement (Figure B).

Ces mesures, n'ayant été réalisées qu'une seule fois, devront être réitérées.

3. Conclusion/Discussion

Les inhibiteurs de protéines BET, notamment JQ1, ont montré leur efficacité anti-tumorale dans les ostéosarcomes [330–333,448,609], ou d'autres sarcomes de l'enfant, tels que le rhabdomyosarcome ou le sarcome d'Ewing [610]. L'émergence de mécanismes de résistance, présentés et décrits dans l'introduction générale de ma thèse, peuvent néanmoins limiter l'efficacité anti-tumorale de ces inhibiteurs. Le deuxième objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans l'ostéosarcome. Dans ce but, un modèle de cellules d'ostéosarcome résistante au JQ1 a été développé au sein du laboratoire. Par des analyses de haut débit (RNA-seq), des voies de signalisation ainsi que des processus biologiques amplifiés dans les cellules résistantes au JQ1

comparativement aux cellules naïves, pouvant expliquer l'acquisition de résistance dans les HOS JQ1R ont été identifiées.

Dans un premier temps, l'autophagie a été identifiée comme étant un processus biologique amplifié dans les cellules HOS JQ1R. Il a déjà été démontré que les thérapies anti-tumorales induisent l'activation de l'autophagie, favorisant la survie des cellules tumorales [611–613] et donc la résistance des cellules tumorales aux traitements [603–607]. Les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1 présentent une augmentation de l'expression de gènes autophagiques ainsi qu'une augmentation du flux autophagique après le traitement au JQ1. Tout comme dans notre modèle, d'autres équipes ont pu montrer une induction de l'autophagie suite à un traitement au JQ1, notamment dans des cellules de cancer ovarien [599]. La cible de JQ1, BRD4, est un répresseur transcriptionnel de l'autophagie [614,615]. La fixation de BRD4 sur les promoteurs des gènes de l'autophagie et le recrutement d'une méthylase des marques H3K9me2 sont à l'origine de la répression. Dans les cellules HOS JQ1R, l'inhibition de l'autophagie à l'aide de chloroquine ou de siATG7 sensibilise les cellules au JQ1. En effet, après inhibition de l'autophagie et traitement au JQ1, les cellules présentent une diminution de la prolifération ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. Dans un modèle de cellules de leucémie myéloïdes aigues résistantes au JQ1, l'inhibition de l'autophagie induite par JQ1 a augmenté l'apoptose des cellules induite par JQ1 [460]. Ainsi, l'autophagie pourrait jouer un rôle de protection contre les effets anti-tumoraux de JQ1 et son ciblage sensibiliserait les cellules tumorales aux traitements anti-cancéreux ; proposant alors une alternative thérapeutique pour les patients mauvais répondeurs aux traitements conventionnels ou aux thérapies ciblées.

Les études menées sur les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1 ont montré une surexpression de la protéine KRAS, notamment le variant a. Ce phénomène de surexpression de KRAS4a dans les cellules tumorales a déjà été démontré [616]. Dans notre modèle de résistance, le ciblage de KRAS par siRNA ou shRNA a montré une inhibition de la prolifération cellulaire des cellules résistantes. La surexpression de KRAS jouerait un rôle dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET et son inhibition sensibiliserait les cellules tumorales à ces inhibiteurs. De plus, il a été montré que KRAS4a induit une transformation oncogénique, responsable de l'activation de la voie de signalisation MAPK [616]. Or l'activation de cette voie de signalisation induit la croissance et la prolifération cellulaire. Nos données issues du RNA-seq et nos résultats de western-blot ont montré que les cellules HOS JQ1R ont une suractivation de la voie MAPK. La surexpression de KRAS activerait alors des voies de signalisation, qui serait à l'origine de la résistance au JQ1. Un modèle de souris de

carcinome pulmonaire muté KRAS a montré que la surexpression de KRAS4a est nécessaire à l'initiation de la tumorigenèse et à la croissance tumorale [617]. Les GTPases, telles que KRAS, sont des oncogènes très souvent retrouvés mutés dans le cancer humain. En effet, KRAS est altéré dans 1 cancer sur 6 [618]. Les mutations de KRAS stimulent certains processus cellulaires tumoraux tels que la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou encore la résistance à l'apoptose. Dans le cancer, la mutation de KRAS la plus retrouvée est une substitution de la glycine en position 12 [619]. Cette mutation induit un défaut d'hydrolyse du GTP (Guanosine-5'-triphosphate) par la GEP (Guanine nucleotide exchange factor), entraînant une activation constitutive de KRAS. KRAS muté est fréquemment retrouvée dans les cancers du côlon [620], du pancréas [621], de la prostate [622] ou encore du poumon [623]. La mutation KRAS^{G12S} est présente dans 0,35% des cas de cancers, dont les cancers du côlon, du poumon, colorectaux mais aussi endométrial [624]. L'implication de la mutation KRAS^{G12S} a été mise en évidence, par exemple, dans le cancer du poumon à petites cellules. En effet, les cellules mutées KRAS^{G12S} sont résistantes aux anti-EGFR [625], signifiant que la mutation KRAS^{G12S} serait en partie responsable de la résistance aux traitements. L'efficacité des inhibiteurs de protéines BET a été montrée dans les cancers du poumon [626] ou dans l'adénocarcinome du canal pancréatique [627] mutants KRAS. Paradoxalement, les mutations de KRAS ont été identifiées comme biomarqueurs potentiels de la résistance intrinsèque aux BETi [628]. La résistance au GSK525762, un inhibiteur de protéines BET, du cancer colorectal est associé à la présence de mutation de KRAS [628]. Les mutations de KRAS conférant une résistance aux inhibiteurs de protéines BET sont intrinsèques et sont initiatrices du cancer tels que le cancer ovarien [458]. L'implication de cette mutation dans le développement de la résistance n'a jamais été décrite dans l'ostéosarcome. Dans notre lignée d'ostéosarcome résistante au JQ1, les résultats du RNA-seq ont montré la présence de la mutation KRAS^{G12S}, comparativement aux cellules HOSn. Néanmoins, comme décrit dans les résultats, il s'agissait d'un KRAS viral de rat muté G12S, indiquant que les cellules utilisées n'étaient pas des cellules HOS-MNNG mais des cellules KHOS. Les cellules KHOS, porteuses de la mutation KRAS G12S, n'expriment pas KRAS au niveau protéique et sont sensibles au JQ1, ce qui suggère une activation de cette voie, peut être facilitée par la présence de la mutation G12S du KRAS de rat, dans la mise en place de la résistance à JQ1. En effet, cette protéine KRAS semble très active rendant les cellules tumorales addictes puisque l'inhibition du KRAS dans les cellules devenues résistantes au JQ1 induit la mort cellulaire, alors que le traitement siKRAS ou shKRAS, par exemple, n'entraîne aucun effet sur les cellules parentales d'ostéosarcome. De plus, l'ajout de JQ1 sur cette lignée résistante amplifie ces phénomènes notamment par l'augmentation de l'expression de KRAS.

Dans cette lignée « HOS JQ1R », JQ1 a tout de même un effet, puisque la voie de KRAS ainsi que les voies de signalisation MAPK, PI3K-Akt-mTOR sont activées dans les cellules rendues résistante aux inhibiteurs BET.

Le métabolisme est décrit comme un processus permettant aux cellules cancéreuses de survivre, de s'adapter dans des environnements complexes, de favoriser la dissémination métastatiques et de développer une résistance aux traitements anti-cancéreux [629]. L'augmentation des besoins énergétiques associée à un taux plus élevé de la prolifération cellulaire est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules cancéreuses opèrent des modifications métaboliques telles qu'une augmentation de l'absorption de glucose et/ou une activité anormale de la lactate déshydrogénase (LDH) [630]. En effet, une glycolyse élevée est une des caractéristiques du métabolisme du cancer. Cette glycolyse dépend des enzymes métaboliques, telle que la lactate déshydrogénase A (LDHA), qui facilite le processus glycolytique en convertissant le pyruvate en lactate. De nombreuses recherches démontrent que la LDHA a une expression aberrante dans de nombreux cancers, ce qui est associé à la progression maligne [631]. La LDHA est sur-régulée dans les lignées cellulaires d'ostéosarcome en comparaison avec des ostéoblastes normaux [632]. La LDHA est une enzyme centrale dans la prolifération tumorale et la croissance maligne. Cette enzyme est également requise pour le maintien et la progression tumorale mais aussi l'apparition de métastases [633]. Les taux sériques de LDHA sont également fréquemment augmentés chez les patients atteints de cancers. De plus, ce taux est corrélé à de mauvais résultats cliniques ainsi qu'à une résistance au traitement [630]. Dans l'ostéosarcome, l'augmentation de la LDHA est associée à un taux de survie sans maladie plus faible. De plus, la LDHA sérique peut être un biomarqueur pronostique pour les patients atteints d'ostéosarcome [634]. Dans l'ostéosarcome, la protéine LDHA peut être mise en relation avec la résistance au traitement. En effet, dans des lignées d'ostéosarcome, la LDHA restaure le métabolisme du glucose et augmente la résistance des cellules au cisplatine [635]. Dans le cancer du sein résistants au tamoxifène, la LDHA en association avec Beclin-1 induit l'autophagie pro-survie. L'inhibition de la LDHA a réduit l'autophagie pro-survie [636]. Dans notre modèle, le traitement au JQ1 induit l'autophagie pro-survie au sein des cellules HOSn et HOS JQ1R. Cela pourrait être intéressant d'étudier l'association LDHA et Beclin-1 dans ces cellules et de cibler par exemple LDHA afin de diminuer l'autophagie induite par le traitement JQ1. L'autophagie pro-survie est induite de façon plus importante dans les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1 que dans les cellules naïves. De plus, les cellules HOS JQ1R surexpriment les protéine LDHA. Ce niveau plus élevé de LDHA pourrait expliquer l'induction de l'autophagie dans les HOS JQ1R puisque ces

cellules présentent un flux autophagique plus important que les cellules naïves. L'inhibition combinée de la LDHA et de l'autophagie pourrait resensibiliser les cellules HOS JQ1R au JQ1. Il a été démontré que les changements métaboliques produits dans les cellules par l'augmentation de la LDHA sont dirigés par mTOR dans des cellules de sein non cancéreuses. La régulation de la LDHA par mTOR est suivie d'une reprogrammation du métabolisme cellulaire, montrant une dépendance accrue à la glycolyse plutôt qu'aux réactions oxydatives. L'activation de la LDHA pilotée par mTOR provoque des signes de progression tumorale dans une lignée cellulaire épithéliale issue de glande mammaire [637]. Dans le carcinome hépaocellulaire, il a été montré que l'expression de LDHA est induite par mTORC1 et l'inhibition pharmacologique de la signalisation mTORC1 par la rapamycine a diminué le niveau de LDHA et la capacité glycolytique des lignées. Dans notre modèle, les analyses d'expression protéique ont montré que les HOS JQ1R expriment très fortement la protéine mTOR. Or, cette protéine pourrait être à l'origine de la régulation de la LDHA, qui est également surexprimée dans les cellules HOS JQ1R, comparativement aux cellules naïves. Il serait intéressant de déterminer, si l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR dans les cellules HOS JQ1R pourrait diminuer l'expression de la LDHA et la glycolyse et ainsi diminuer la progression tumorale. Il serait également intéressant de voir si l'inhibition de mTOR resensibiliserait les cellules HOS JQ1R au JQ1. Il se pourrait aussi que la suractivation des voies de signalisation dans les HOS JQ1R, notamment la voie PI3K/AKT/mTOR, soit à l'origine de la surexpression et de la sur-activité de la LDHA, qui induirait l'autophagie pro-survie dans les HOS JQ1R. Dans ce cas, il pourrait être possible d'utiliser des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR dans le but d'inhiber la surexpression de la LDHA et de resensibiliser les cellules HOS JQ1R au JQ1. Aux vues de tous ces résultats, la LDHA ainsi que tous les éléments permettant son activation pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles dans la prise en charge du cancer et plus particulièrement dans le traitement des patients résistants aux traitements.

Chapitre III : Le ciblage de la voie des MAP kinases pourrait resensibiliser les cellules d'ostéosarcome résistantes à JQ1

1. Introduction

Même si les inhibiteurs de protéines BET présentent en pré-clinique une certaine activité anti-tumorale dans différents cancers, leur efficacité en clinique reste limitée [302]. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors développées dans le but d'augmenter les effets anti-tumoraux des inhibiteurs BET. La combinaison d'inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs des voies de signalisation suractivées dans certaines cellules tumorales [638,639], fait partie des nouvelles stratégies thérapeutiques à l'étude.

Dans des cellules tumorales thyroïdiennes, la combinaison du JQ1 et du trametinib, un inhibiteur de la protéine MEK, bloque la prolifération cellulaire, alors que le JQ1 ou le trametinib seuls n'ont que des effets partiels. Le traitement combiné inhibe l'expression de MYC plus efficacement que les traitements avec les drogues seules. La combinaison de traitement diminue ainsi l'expression des régulateurs pro-survie et augmente celle des régulateurs pro-apoptotiques pour induire l'apoptose de manière synergique. Alors que le traitement unique n'inhibe que partiellement la croissance tumorale dans des modèles précliniques, le traitement combiné réduit la croissance tumorale de plus de 90 % [583].

De plus, dans certains cancers, l'émergence de résistance aux inhibiteurs des protéines BET, limitant leurs effets anti-tumoraux, est décrite [360]. Afin d'anticiper cette résistance, l'équipe d'Anastasia Wyce a étudié les biomarqueurs d'activité de l'inhibiteur clinique d'I-BET-762 (GSK525762) dans différentes lignées cellulaires cancéreuses et a démontré que les mutations de la protéine KRAS peuvent être considérées comme des biomarqueurs de résistance. Cette équipe a également montré que les cellules, mutées ou non KRAS, traitées avec l'I-BET 762 présentent une surexpression de la protéine p-ERK1/2, suggérant que l'activation de la voie de signalisation MAPK peut également être un des mécanismes à l'origine de l'acquisition de résistance aux BETi. Ces données justifient alors la combinaison des inhibiteurs BET avec des inhibiteurs de la voie MAPK, tels que des inhibiteurs de la protéine MEK. La combinaison de ces deux types d'inhibiteurs entraîne des effets synergiques sur la croissance et la survie dans des modèles mutants de la voie RAS ainsi que dans un sous-ensemble de lignées cellulaires dépourvues de mutations de la voie RAS [628]. Dans un modèle de mélanome présentant une suractivation de la voie de signalisation des MAPK médiant la résistance à l'inhibition des protéines BET, un traitement combiné associant des inhibiteurs de protéines MEK, dont le trametinib et le binimetinib, avec des inhibiteurs de protéines BET, tels que I-BET et PLX2853, diminue la viabilité cellulaire et augmente l'apoptose de manière synergique. L'inhibition des protéines BET et MEK diminue l'expression des protéines telles que p-ERK, MYC, Bcl-xL et

augmente l'expression de BIM. De même, le traitement combiné inhibe la croissance tumorale *in vivo* de manière plus importante comparativement à l'inhibition de BET ou de MEK seuls [640].

L'association des inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de la voie de signalisation MAPK peut contre-carrer d'autres résistance, notamment la résistance des cellules tumorales aux inhibiteurs de MAPK. Au sein de cellules de mélanome NRAS-mutant, résistantes aux inhibiteurs de MAPK, la co-inhibition des protéines BET et MEK réduit de manière synergique la croissance des cellules. Ce même traitement combiné prolonge également la survie des animaux porteurs de tumeurs réfractaires aux inhibiteurs de MAPK et à l'immunothérapie [581]. Dans un autre modèle de mélanome présentant une résistance à un inhibiteur de BRAF, le vemurafenib, l'ajout du JQ1 sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le vemurafenib. Chez des souris C57BL/6 atteintes de mélanome résistant au vemurafenib, le co-traitement de vemurafenib et de JQ1 empêche la formation de métastases pulmonaires [641].

Dans la partie précédente, nous avons montré que les cellules résistantes au JQ1 présentent une surexpression de la protéine KRAS ainsi qu'une suractivation de la voie de signalisation MAPK. Ainsi, cibler certaines protéines activées par KRAS et appartenant à la voie des MAPK dans les cellules HOS JQ1R pourrait resensibiliser ces cellules au JQ1. De plus, l'inhibition de cette voie de signalisation dans les cellules HOSn pourrait également potentialiser les effets du JQ1. Afin de vérifier ces hypothèses, les cellules HOSn et HOS JQ1R ont été traitées avec cinq inhibiteurs de la voie des MAPK : le salirasib, un inhibiteur de RAS ; le sorafenib, un inhibiteur de RAF ; le binimetinib, le trametinib et le cobimetinib, des inhibiteurs de MEK. Ces recherches ont fait l'objet d'un stage de Master 2 réalisé par Juliette Rousseau que j'ai pu encadrer.

2. Résultats

Les cellules HOS JQ1R sont sensibles à un inhibiteur de RAS et la combinaison de cet inhibiteur au JQ1 a un effet synergique sur les cellules HOS JQ1R.

Dans un premier temps, la combinaison du JQ1 avec un inhibiteur de la protéine RAS, le salirasib a été étudiée. L'efficacité de cette combinaison a été évaluée à l'aide de tests de viabilité cellulaire, de clonogénicité et de synergie.

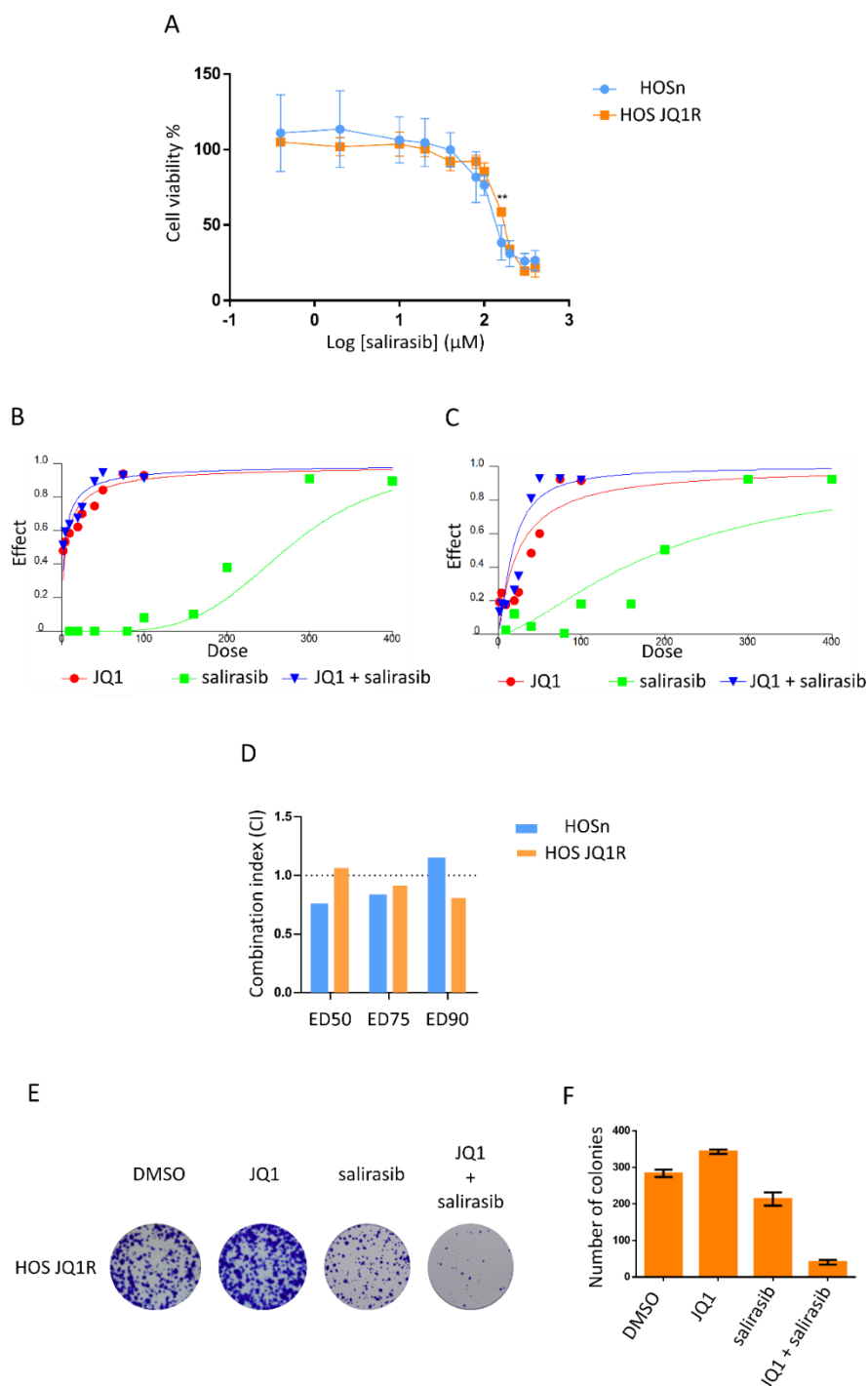


Figure 49 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine Ras, le salirasib. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R, ensemencées à 2 500 et 3 500 par puits, respectivement, et traitées

avec des concentrations croissantes de salirasib (0 à 400 μM) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire. (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Tests de combinaison du traitement de JQ1 avec le salirasib (ratio 1 : 4) sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn (ensemencées à 2 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (B) et HOS JQ1R (ensemencées à 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (C) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. Les courbes dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn (N=3). (D) Test de synergie de JQ1 avec le salirasib (ratio 1 : 4), sur la viabilité des HOS JQ1R et HOSn pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay (N=1). (E-F) Test clonogénique des cellules HOS JQ1R prétraitées pendant 48h avec 10 μM de JQ1, combiné ou non avec 150 μM de salirasib puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 10 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (E) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (F) (N=1).

L'IC₅₀ du Salirasib obtenu pour les cellules HOS JQ1R est de 199,9 μM et de 192,5 μM pour les cellules HOSn (Figure 49A). Des tests de combinaison de l'inhibiteur de RAS, le salirasib, avec du JQ1 ont été réalisés dans le but de potentialiser les effets du JQ1 et de sensibiliser les cellules HOS JQ1R au JQ1. Pour des doses-effet de 50 %, 75 % et 90 %, les indices de combinaison des cellules HOSn sont de 0,75 ; 0,84 et 1,14 respectivement. Dans les cellules HOS JQ1R, ces indices de combinaison sont de 1,06 ; 0,91 ; 0,81 (Figure 49B, 49C et 49D). La combinaison de JQ1 avec du salirasib diminue la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R de 86 %, alors que cette capacité clonogénique est diminuée de 25 % par le traitement du salirasib seul (Figure 49E).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les cellules HOSn et HOS JQ1R sont sensibles au salirasib, inhibiteur de RAS. Dans les cellules HOSn, les tests de synergie montrent que la combinaison de JQ1 au salirasib a un effet synergique à des doses-effet de 50 % et de 75 %, puisque les indices de combinaison sont inférieurs à 1. Dans les cellules HOS JQ1R, la combinaison du JQ1 avec le salirasib est synergique à des doses-effet de 75 % et 90 % puisque les indices de combinaison sont inférieurs à 1 (Tableau XII). De plus, la combinaison de JQ1 avec du salirasib diminue la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R de manière plus importante comparativement au traitement avec le salirasib seul. Ces mêmes expériences sont à réaliser dans les cellules HOSn afin de confirmer l'effet synergique de JQ1 et Salirasib sur ces cellules. L'ensemble des résultats suggèrent que la combinaison de JQ1 avec du salirasib est plus intéressante que l'utilisation des traitements seuls dans les cellules d'ostéosarcome résistantes ou non aux BETi.

Les cellules HOS JQ1R sont sensibles à un inhibiteur de RAF et la combinaison de cet inhibiteur au JQ1 a un effet synergique sur les cellules HOS JQ1R.

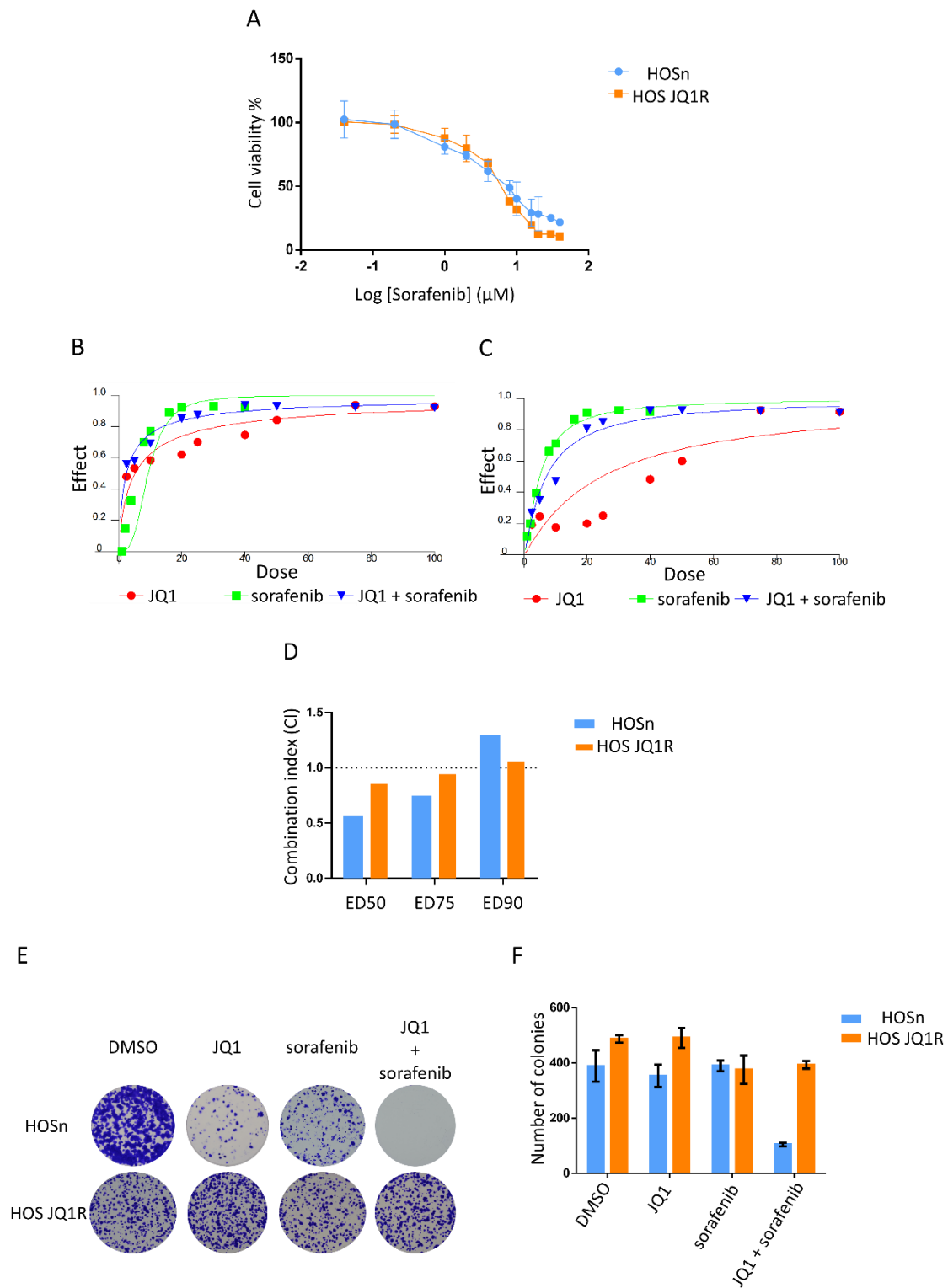


Figure 50 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine Raf, le sorafenib. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R, ensemencées à 2 500 et 3 500 par puits, respectivement, et traitées avec des concentrations croissantes de sorafenib (0 à 40 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire. (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Tests de combinaison du traitement de JQ1 avec le cobimetinib (ratio 5 : 2) sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn (ensemencées à 2 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (B) et HOS JQ1R (ensemencées à 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (C) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. Les courbes dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn (N=3). (D) Test de synergie de JQ1 avec le sorafenib (ratio 5 : 2), sur la viabilité des cellules HOSn et HOS JQ1R pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay (N=1). (E-F) Test clonogénique des cellules HOSn et HOS JQ1R prétraitées pendant 48h avec 10 μ M de JQ1, combiné ou non avec 6 μ M de sorafenib puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 10 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (E) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (F) (N=1).

Les tests de prolifération montrent que l'IC₅₀ du Sorafenib est de 5,436 μ M pour les cellules HOS JQ1R et de 7,154 μ M pour les cellules HOSn (Figure 50A). Dans le but de potentialiser les effets du JQ1 et de sensibiliser les cellules HOS JQ1R au JQ1, des tests de combinaison d'un inhibiteur de la protéine RAF, le sorafenib, avec du JQ1 ont été réalisés. Les indices de combinaison des cellules HOSn obtenus via les tests de synergie sont de 0,55 ; 0,74 et 1,29 pour des doses-effet de 50 % ; 75 % et 90 %, respectivement. En ce qui concerne les cellules HOS JQ1R, les indices de combinaisons obtenus pour des doses-effet de 50 % ; 75 % et 90 % sont de 0,86 ; 0,94 et 1,04, respectivement (Figure 50B, 50C et 50D). La combinaison de JQ1 avec le sorafenib diminue la capacité clonogénique des cellules HOSn de 73 %, comparativement à la condition traitée avec le sorafenib seul ou JQ1 seul où la capacité clonogénique est diminuée de 19 % et 29 %, respectivement. Dans les cellules HOS JQ1R, la combinaison de JQ1 avec le sorafenib diminue la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R de 19 %, et le traitement par le sorafenib seul entraîne une diminution de la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R de 23 % (Figure 50E et 50F).

L'ensemble de ces résultats montrent que les cellules HOSn et HOS JQ1R sont sensibles et répondent de manière similaire au sorafenib. D'après les tests de synergie réalisés sur les cellules HOSn et HOS JQ1R, la combinaison du JQ1 avec le sorafenib a un effet synergique à des doses-effet de 50 % et de 75 % puisque les indices de combinaison sont inférieurs à 1. Dans les cellules HOSn, ces résultats sont confirmés par les tests de capacité clonogénique. En

revanche, dans les cellules HOS JQ1R, le sorafenib seul semble diminuer de manière plus importante la capacité clonogénique comparé à sa combinaison avec le JQ1.

Les cellules HOS JQ1R sont sensibles aux inhibiteurs de MEK et la combinaison de ces inhibiteurs avec du JQ1 a un effet synergique sur les cellules HOS JQ1R.

Enfin, la voie MAPK a été ciblée dans les cellules HOSn et HOS JQ1R avec des inhibiteurs ciblant la protéine MEK (Binimetinib, Cobimetinib et Trametinib). L'efficacité de combinaison du JQ1 avec ces inhibiteurs a été évaluée par des tests de viabilité cellulaire, de clonogénicité, de synergie ou encore d'apoptose. En ce qui concerne les tests de clonogénicité, les photographies ainsi que les comptages de clones des contrôles DMSO et JQ1 seront les mêmes. Les expériences ayant été réalisées le même jour, les différents traitements ont été faites sur des plaques distinctes.

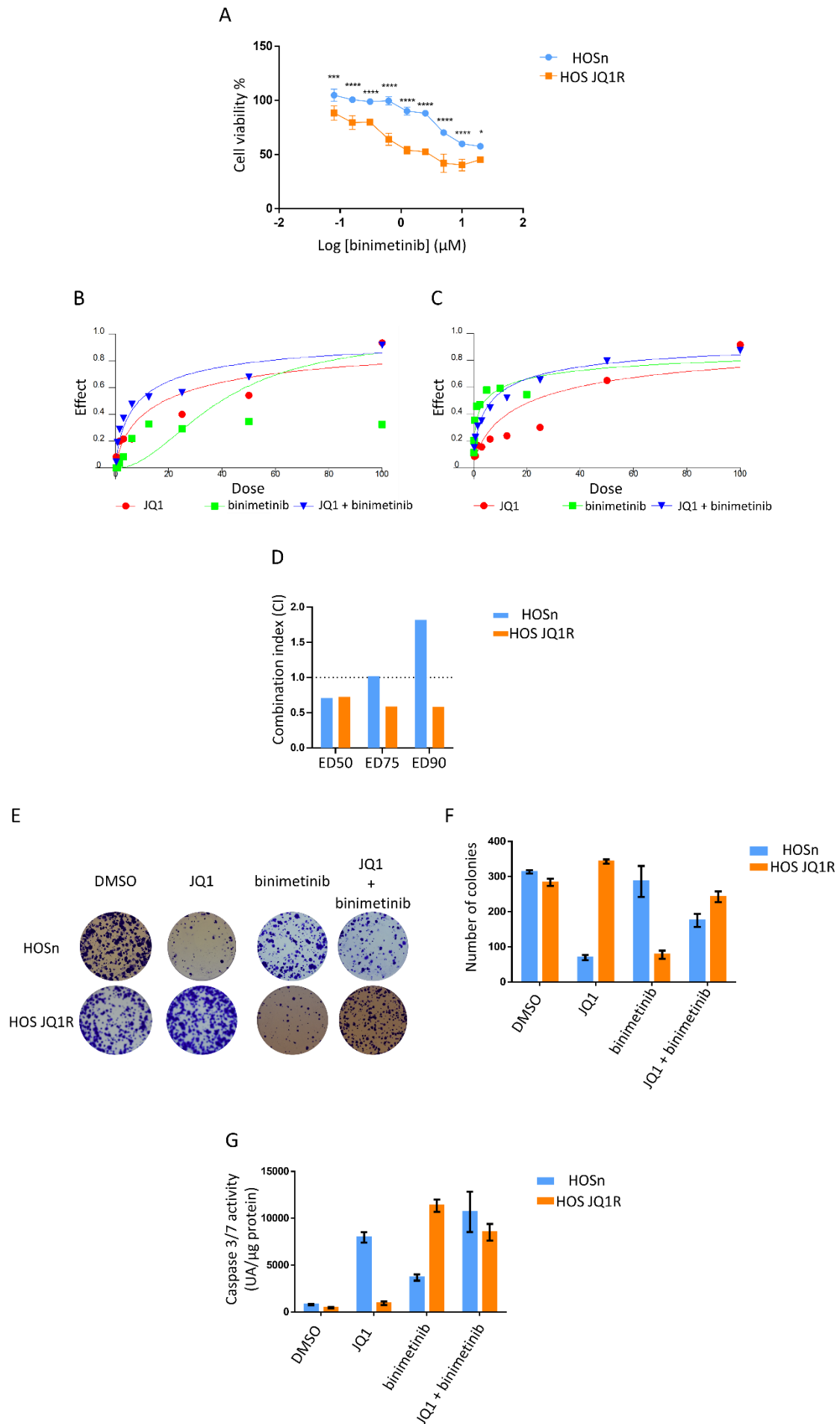


Figure 51 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le binimetinib. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R, ensemencées à 2 500 et 3 500 par puits, respectivement, et traitées avec des concentrations croissantes de binimetinib (0 à 100 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Tests de combinaison du traitement de JQ1 avec le binimetinib (ratio 1 : 1) sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn (ensemencées à 2 500 cellules/puits en plaque 96 puits) (B) et des cellules HOS JQ1R (ensemencées à 3 500 cellules/puits en plaque 96 puits) (C) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. Les courbes dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn (N=3). (D) Test de synergie de JQ1 avec le binimetinib (ratio 1 : 1), sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay (N=1). (E-F) Test clonogénique des cellules HOSn et HOS JQ1R prétraitées pendant 48h avec 10 μ M de JQ1, combiné ou non avec 10 μ M de binimetinib puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 10 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (E) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (F) (N=2). (G) Évaluation de l'apoptose par la mesure de l'activité des caspases 3/7 (AU/ μ g de protéine) dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées ou non avec 10 μ M de JQ1 combiné ou non avec 10 μ M de binimetinib pendant 48h (N=1).

L'IC50 de binimetinib, déterminée à l'aide des tests de viabilité, est de 2,878 μ M pour les cellules HOS JQ1R alors qu'elle est de 18,25 μ M pour les cellules HOSn (Figure 51A). De plus, la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R est diminuée de 72 % suite à un traitement au binimetinib alors que la capacité clonogénique des cellules HOSn n'est diminuée que de 9 % (Figure 51E et 51F). La combinaison de JQ1 et de binimetinib diminue la viabilité cellulaire des cellules HOSn de 46 %. L'inhibition de JQ1 seul diminue de 32 % de la viabilité cellulaire des cellules HOSn (Figure 51B). Pour des doses-effet de 50 % ; 75 % et 90 %, les indices de combinaison des cellules HOSn sont de 0,70 ; 1,02 ; 1,82, respectivement (Figure 51D). Dans les cellules HOS JQ1R, le traitement combiné de JQ1 avec le binimetinib diminue la viabilité cellulaire de 37 %, alors que le traitement par binimetinib seul diminue la viabilité des cellules HOS JQ1R de 48 % (Figure 51C). Les indices de combinaison des cellules HOS JQ1R sont de 0,73 ; 0,59 et 0,59 pour des doses doses-effet de 50 % ; 75 % et 95 %, respectivement (Figure 51D). Dans les cellules HOSn, la combinaison de JQ1 avec l'inhibiteur de MEK diminue la capacité clonogénique de 44 %, alors qu'elle diminue de seulement 9 % suite au traitement par l'inhibiteur de MEK seul. Dans les cellules HOS JQ1R, la capacité clonogénique diminue de 72 % en présence de binimetinib seul. La combinaison de JQ1 avec le binimetinib diminue de 14 % (Figure 51E et 51F). Dans les cellules HOSn, l'activité des caspases 3/7 est 4 fois plus élevée dans la condition « JQ1 + binimetinib », comparativement à

l'utilisation du binimetinib seul. Dans les cellules HOS JQ1R, l'activité des caspases 3/7 après un traitement combiné du JQ1 avec le binimetinib est de 8500 UA/ μ g de protéines alors qu'elle est de 11000 UA/ μ g après un traitement au binimetinib seul (Figure 51G).

D'après les tests de viabilité cellulaire et de capacité clonogénique, les cellules HOS JQ1R sont plus sensibles au binimetinib que les cellules HOSn.

L'ensemble des résultats montre que, dans les cellules HOSn, la combinaison de JQ1 avec le binimetinib est plus efficace que le traitement avec le binimetinib seul. En effet, dans ces cellules, la diminution de la viabilité cellulaire est plus importante suite au traitement combiné de JQ1 et de binimetinib, comparativement au traitement par JQ1 seul et au binimetinib seul. La diminution de la capacité clonogénique des cellules HOSn est plus importante suite au traitement combiné de JQ1 et binimetinib que binimetinib seul. Dans ces cellules, la combinaison de traitement semble être synergique pour une dose-effets de 50 % (IC <1), additif pour une dose-effet de 75 % (IC=1) et antagoniste pour une dose-effet de 95 % (IC>1) (Tableau XII). De plus, l'apoptose est plus importante dans les cellules HOSn traitées par JQ1 combiné au binimetinib en comparaison à l'utilisation du binimetinib seul.

A l'inverse, dans les cellules HOS JQ1R, le traitement avec le binimetinib seul entraîne plus d'effet sur la viabilité cellulaire et la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R comparativement à la combinaison binimetinib + JQ1. Cependant, la combinaison du JQ1 et du binimetinib est tout de même synergique pour toutes les doses-effets testées (50 %, 75 % et 90 % ; IC<1)) (Tableau XII). Néanmoins, l'activité caspase 3/7 induite par la combinaison binimetinib + JQ1 semble moins importante comparativement au binimetinib seul.

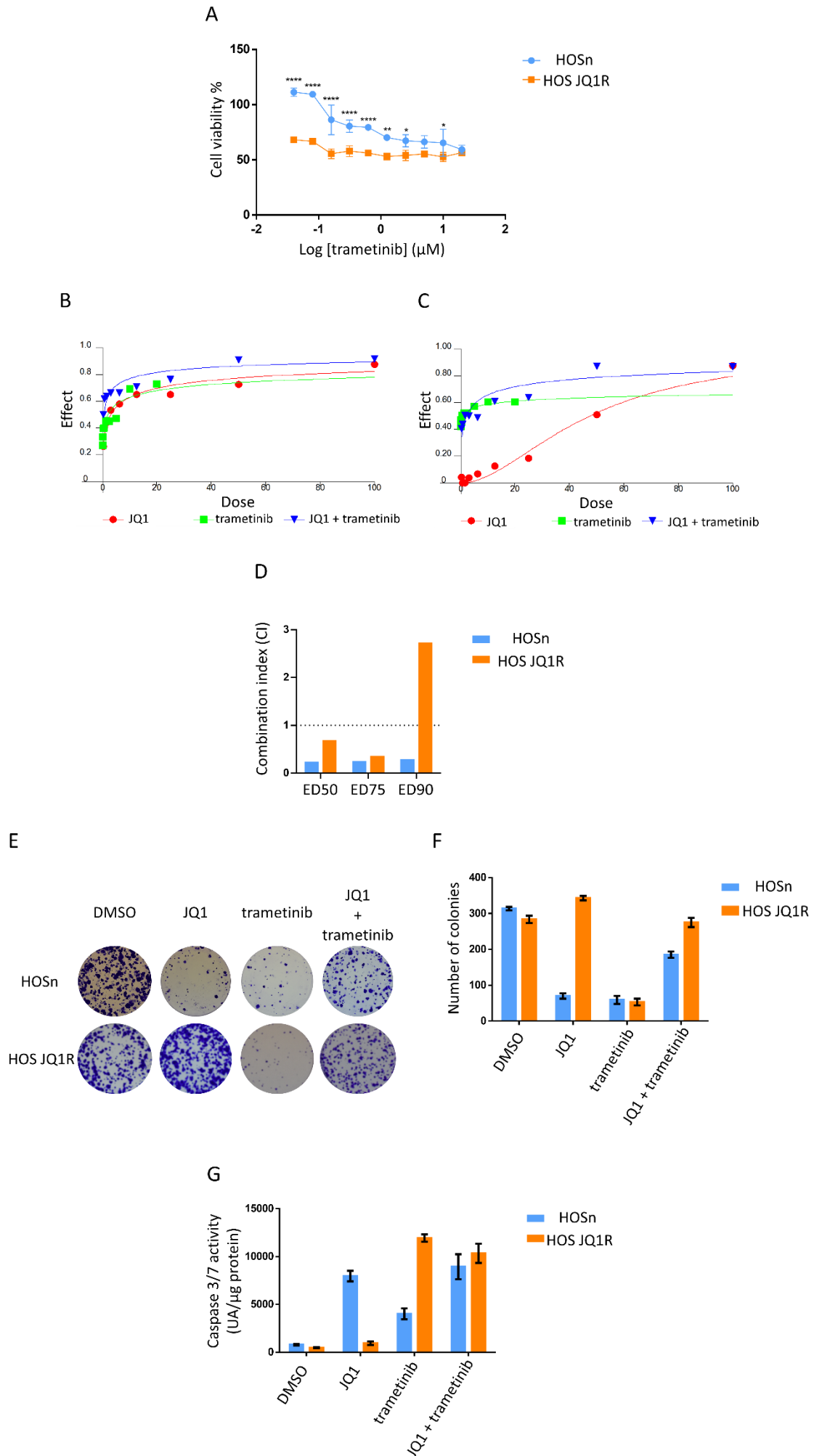


Figure 52 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le trametinib. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R, ensemencées à 2 500 et 3 500 par puits, respectivement, et traitées avec des concentrations croissantes de trametinib (0 à 20 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire. (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Tests de combinaison du traitement de JQ1 avec le trametinib (ratio 5 : 1) sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn (ensemencées à 2 500 cellules/puits en plaque 96 puits) (B) et HOS JQ1R (ensemencées à 3 500 cellules/puits en plaque 96 puits) (C) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. Les courbes dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn (N=3). (D) Test de synergie de JQ1 avec le trametinib (ratio 5 : 1), sur la viabilité des cellules HOSn et HOS JQ1R pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay (N=1). (E-F) Test clonogénique des cellules HOSn et HOS JQ1R prétraitées pendant 48h avec 10 μ M de JQ1, combiné ou non avec 0,5 μ M de trametinib puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 10 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (E) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (F) (N=1). (G) Évaluation de l'apoptose par la mesure de l'activité des caspases 3/7 (AU/ μ g de protéine) dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées ou non avec 10 μ M de JQ1 combiné ou non avec 0,5 μ M de trametinib pendant 48h (N=1).

Les tests de viabilité montrent que l'IC₅₀ du trametinib est de 3,489 μ M pour les cellules HOS JQ1R, alors qu'elle est de 13,71 μ M pour les cellules HOSn (Figure 52A). Suite au traitement par le trametinib, la capacité clonogénique des deux lignées diminue de 81 % (Figure 52E et 52F). Dans les cellules HOSn, la combinaison JQ1 + trametinib diminue la viabilité cellulaire de 50 %. JQ1 seul diminue la viabilité cellulaire des cellules HOSn de 14 % (Figure 52B). Les indices de combinaison des cellules HOSn, obtenus par les tests de synergie, sont de 0,22 ; 0,23 et 0,26 pour des dose-effets de 50 %, 75 % et 90 %, respectivement (Figure 52D). Le traitement JQ1 + trametinib diminue la viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1R de 59 %. Dans ces cellules, le trametinib seul diminue la viabilité cellulaire de 61 % contre 50 % après la combinaison JQ1 + trametinib (Figure 52C). Les résultats des tests clonogéniques, montrent que le trametinib seul diminue de 81 % la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOS JQ1R traitées avec la combinaison JQ1 + trametinib, montrant une diminution de 3 %. La capacité clonogénique des cellules HOSn diminue de 81 % après un traitement combiné JQ1 + trametinib. Le trametinib seul diminue de 41 % la capacité clonogénique de ces mêmes cellules (Figure 52E et 52F). Comparativement à l'utilisation du trametinib seul dans les cellules HOSn, l'activité des caspases 3/7 est 1,6 fois plus élevée pour la condition JQ1 + trametinib. L'activité enzymatique des caspases 3/7 est de

12000 UA/ μ g de protéines après traitement par trametinib seul et 10000 UA/ μ g de protéines après traitement combiné JQ1 + trametinib (Figure 52G).

Les tests de viabilité montrent que cellules HOS JQ1R sont plus sensibles au trametinib que les cellules HOSn. En revanche, les tests de capacité clonogénique montrent une diminution de la capacité clonogénique quasiment identique entre les deux lignées. Dans les cellules HOSn, la combinaison de traitement JQ1 et trametinib est plus efficace que JQ1 seul. Dans ces cellules, la combinaison de traitement montre des effets synergiques pour des doses-effets de 50 %, 75 % et 90 % ($IC < 1$) (Tableau XII). De plus, l'inhibition de la capacité clonogénique est plus élevée dans les cellules HOSn traitées avec JQ1 + trametinib comparativement aux cellules HOSn traitées avec trametinib seul. Enfin, l'apoptose est plus importante dans les cellules HOSn traitées par la combinaison JQ1 + trametinib, comparé au trametinib seul. Dans les cellules HOS JQ1R, le trametinib seul entraîne plus d'effet sur la viabilité cellulaire que la combinaison JQ1 + trametinib. La combinaison JQ1 + trametinib est synergique pour des dose-effets de 50 % et 75 % ($IC < 1$) et antagoniste pour une dose-effets de 90 % ($IC > 1$) (Tableau XII). La capacité clonogénique de ces cellules est diminuée de manière plus importante après un traitement avec le trametinib seul qu'après un traitement du trametinib combiné au JQ1. De plus, l'induction de l'apoptose dans les cellules HOS JQ1R traitées avec le trametinib combiné ou non au JQ1 est plus importante que celle induite après traitement avec le trametinib seul.

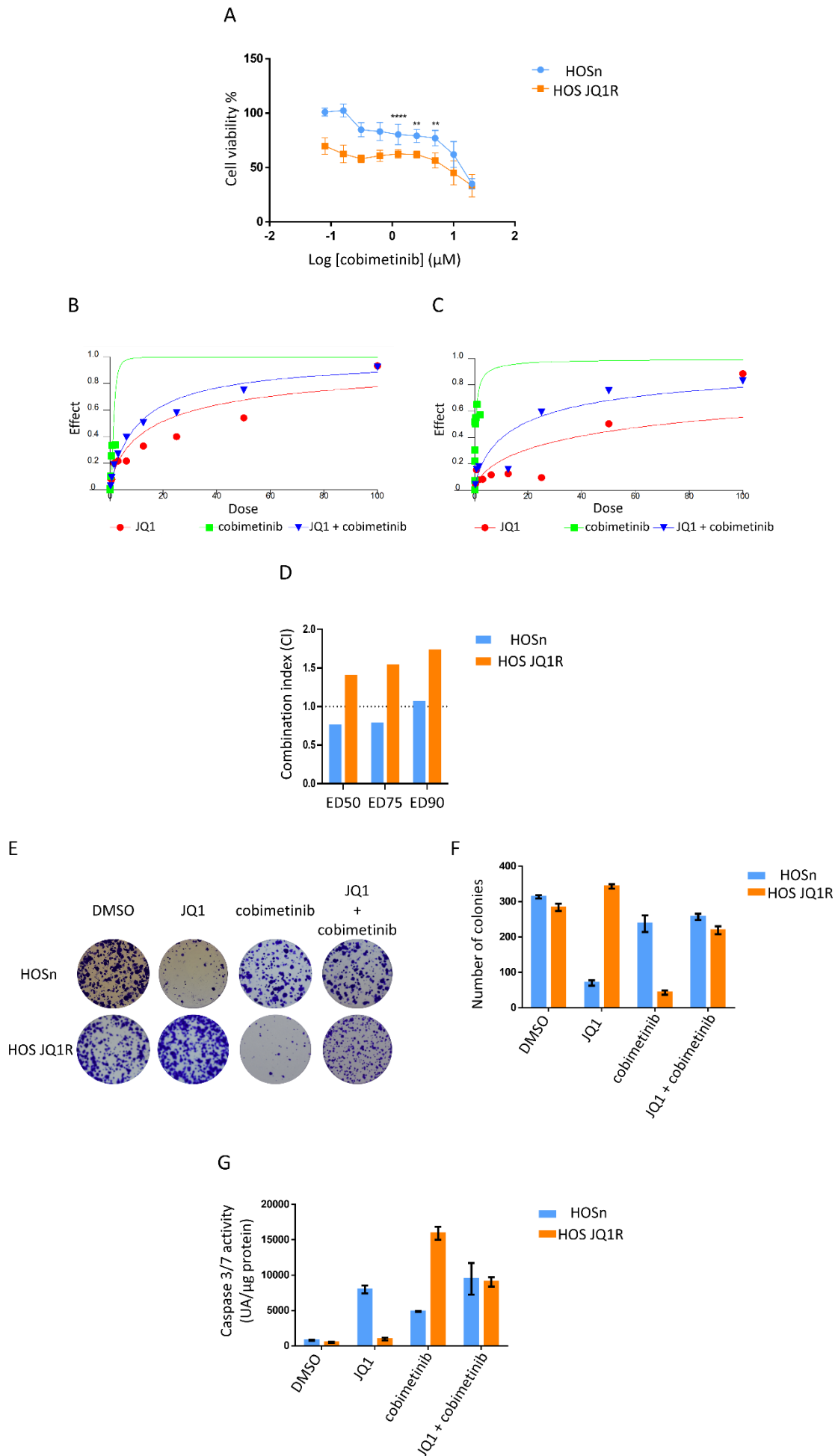


Figure 53 : Inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur de la protéine MEK, le cobimetinib. (A) Test de viabilité cellulaire des cellules HOSn et HOS JQ1R, ensemencées à 2 500 et 3 500 par puits, respectivement, et traitées avec des concentrations croissantes de cobimetinib (0 à 40 μ M) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet pour évaluer la viabilité cellulaire. (* : test statistique ANOVA 2 voies en comparaisons multiples, valeur $p \leq 0,05$) (N=3). (B-C) Tests de combinaison du traitement de JQ1 avec le cobimetinib (ratio 50 : 1) sur la viabilité cellulaire des cellules HOSn (ensemencées à 2 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (B) et HOS JQ1R (ensemencées à 3 500 cellules par puits en plaque 96 puits) (C) pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. Les courbes dose-effet ont été générées par le logiciel Calcsyn (N=3). (D) Test de synergie de JQ1 avec le cobimetinib (ratio 50 : 1), sur la viabilité des HOS JQ1R et HOSn pendant 72h, suivi d'une coloration au cristal violet. L'indice de combinaison (IC) est calculé à différentes efficacités (dose-effet) (ED50, ED75, ED90) selon la méthode de Chou-Talalay (N=1). (E-F) Test clonogénique des cellules HOSn et HOS JQ1R prétraitées pendant 48h avec 10 μ M de JQ1, combiné ou non avec 2 μ M de cobimetinib puis comptées et ensemencées dans une plaque 6 puits à 1 000 cellules par puits et incubées dans un milieu sans traitement pendant 10 jours. Les colonies cellulaires ont été colorées avec du cristal violet, photographiées (E) et comptées à l'aide du logiciel Fiji (F) (N=1). (G) Évaluation de l'apoptose par la mesure de l'activité des caspases 3/7 (AU/ μ g de protéine) dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R traitées ou non avec 10 μ M de JQ1 combiné ou non avec 2 μ M de cobimetinib pendant 48h (N=1).

Les IC₅₀ obtenus après le traitement au cobimetinib, sont de 0,6691 μ M pour les cellules HOS JQ1R et de 2,117 μ M pour les cellules HOSn (Figure 53A). Après un traitement au cobimetinib, la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R diminue de 85 % alors qu'une diminution de 24 % est observée pour les cellules HOSn (Figure 53E et 53F). La combinaison du JQ1 et du cobimetinib diminue la viabilité cellulaire des cellules HOSn de 51% (Figure 53B). La viabilité cellulaire des cellules HOS JQ1R diminue de 29 % après un traitement JQ1 + cobimetinib. Le cobimetinib seul diminue la viabilité cellulaire de 49 % contre 29 % après combinaison avec JQ1 (Figure 53C). Pour des doses-effets de 50 %, 75 % et 90 %, les indices de combinaison des cellules HOSn sont de 0,75 ; 1,40 et 1,82, respectivement. Pour les cellules HOS JQ1R, ces indices sont de 1,40 ; 1,53 et 1,73 à des doses-effets de 50 %, 75 % et 90 %, respectivement (Figure 53D). La capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R diminue de 85 % suite à un traitement cobimetinib seul et de 23 % suite à un traitement combiné JQ1 + cobimetinib. Dans les cellules HOSn, la combinaison de JQ1 avec l'inhibiteur de MEK diminue la capacité clonogénique de 18 %, contre 25 % suite au traitement avec cobimetinib seul (Figure 53E et 53F). Après un traitement cobimetinib seul, l'activité des caspases 3/7 dans les cellules HOS JQ1R est 16000 UA/ μ g de protéines contre 8500 UA/ μ g de protéines après traitement avec ces deux inhibiteurs. Comparativement à l'utilisation d'un inhibiteur de MEK seul dans les cellules

HOSn, l'activité des caspases 3/7 est 7 fois plus élevée pour la condition JQ1 + cobimetinib (Figure 53G).

Les tests de viabilité cellulaire et de capacité clonogénique montrent que les cellules HOS JQ1R sont plus sensibles au cobimetinib, troisième inhibiteur de MEK testé, que les cellules HOSn.

Les tests de synergie mettent en évidence que JQ1 combiné au cobimetinib diminue la viabilité des cellules HOSn. Le calcul des ED50, ED75 (IC<1) montre que les effets de la combinaison JQ1 + cobimetinib semblent synergiques sur la viabilité des cellules HOSn. A une dose-effet de 90 %, l'effet de la combinaison de traitement semble plutôt additif (IC=1) (Tableau XII). La capacité clonogénique des cellules HOSn est inhibée de façon plus importante suite au traitement de cobimetinib seul comparativement au traitement combiné JQ1 + cobimetinib. L'apoptose des cellules HOSn, est plus importante suite au traitement combiné JQ1 + cobimetinib comparativement au cobimetinib seul.

Les résultats des tests de synergie montrent également que le traitement cobimetinib seul entraîne plus d'effet sur la viabilité des cellules HOS JQ1R que le traitement combiné JQ1 + cobimetinib. Le calcul des ED50, ED75 et ED90 (IC>1) montre que les effets de la combinaison JQ1 + cobimetinib ne semblent pas synergiques sur la viabilité des cellules HOS JQ1R mais antagonistes (Tableau XII). Les résultats des tests clonogéniques, montrent une diminution de la capacité clonogénique des cellules HOS JQ1R en présence de cobimetinib seul comparativement aux cellules HOS JQ1R traitées par la combinaison JQ1 + cobimetinib. L'apoptose induite dans les cellules HOS JQ1R est plus importante après traitement cobimetinib seul, qu'après traitement combiné JQ1 + cobimetinib.

Tableau XII : Tableau récapitulatif des effets de la combinaison de JQ1 avec différents inhibiteurs de la voie de signalisation MAPK : salirasib (inhibiteur de RAS), sorafenib (inhibiteur de RAF), binimetinib, trametinib et cobimetinib (inhibiteurs de MEK) dans les cellules HOSn et HOS JQ1R.

	HOSn			HOS JQ1R		
	ED50	ED75	ED90	ED50	ED75	ED90
Salirasib+JQ1	Synergique	Synergique	Antagoniste	Antagoniste	Synergique	Synergique
Sorafenib+JQ1	Synergique	Synergique	Antagoniste	Synergique	Synergique	Antagoniste
Binimetinib+JQ1	Synergique	Additif	Antagoniste	Synergique	Synergique	Synergique
Trametinib+JQ1	Synergique	Synergique	Synergique	Synergique	Synergique	Antagoniste
Cobimetinib+JQ1	Synergique	Synergique	Synergique	Antagoniste	Antagoniste	Antagoniste

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires des inhibiteurs de la voie des MAPK sur les cellules HOSn et HOS JQ1R, des analyses protéiques de cette voie de signalisation ont été réalisées.

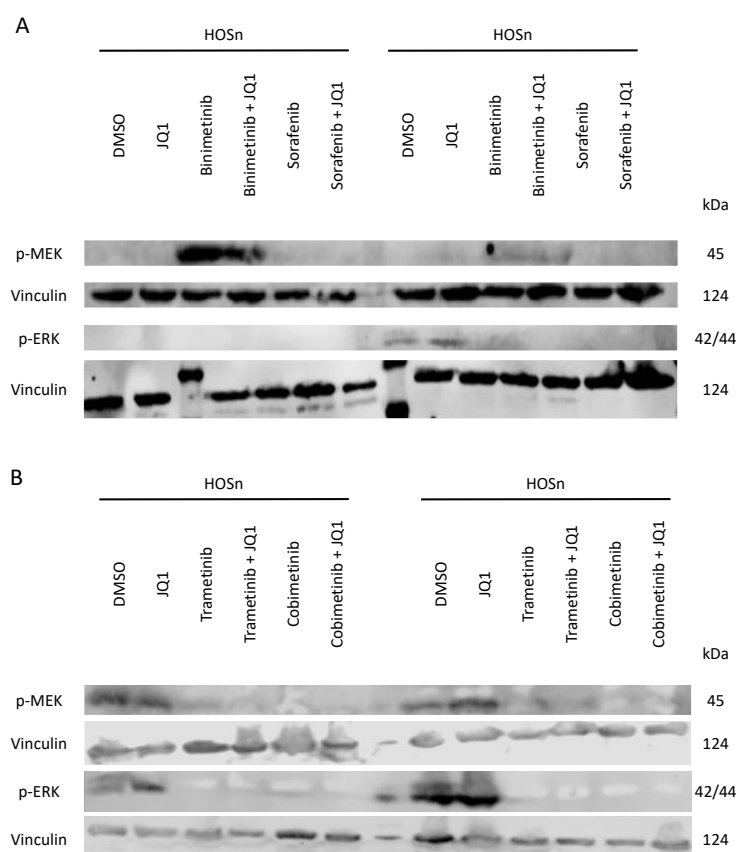


Figure 54: Effet de la combinaison des inhibiteurs de la voie MAPK et du JQ1 sur l'expression des protéines de la voie MAP kinases. Expression de p-MEK et p-ERK analysée par western blot dans les lysats protéiques des cellules HOSn et HOS JQ1R en présence de binimetinib (10 μ M), trametinib (0,5 μ M), cobimetinib (2 μ M) ou sorafenib (6 μ M) en combinaison ou non avec du JQ1 (24 μ M) pendant 48h. La vinculine a été utilisée comme contrôle de charge (N=1).

Dans un premier temps, les western blot confirment la surexpression de p-ERK dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn en condition contrôle. Cependant, la surexpression de p-MEK dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOSn en condition contrôle n'est pas observée (Figure 54). Des analyses supplémentaires devront être réalisées en optimisant les conditions de western blot. Après traitement JQ1, les expressions de p-ERK et de p-MEK sont augmentées dans les cellules HOS JQ1R par rapport à la condition contrôle, suggérant une suractivation de la voie des MAPK suite au traitement JQ1 (Figure 54).

Ces analyses par western-blot montrent que les niveaux d'expression protéiques de p-ERK et p-MEK sont impactés par les différents traitements. En effet, l'utilisation du binimetinib (inhibiteur de MEK) augmente l'expression de p-MEK dans les cellules HOS JQ1R et diminue l'expression de p-ERK par la suite. Les deux autres inhibiteurs de MEK, le cobimetinib et le trametinib, semblent agir directement sur la phosphorylation de MEK puisqu'il n'y a pas d'expression de p-MEK, ni de p-ERK dans les conditions traitées avec ces inhibiteurs. Ces analyses d'expression protéique montrent également que le traitement sorafenib (inhibiteur de RAF) bloque la cascade de signalisation des MAPK. En effet, aucune expression de p-MEK et de p-ERK n'est observée après traitement par le sorafenib seul ou combiné à JQ1 suite au blocage de RAF comparativement aux conditions traitées par JQ1 où des expressions de p-ERK et de p-MEK sont observées (Figure 54).

3. Conclusion/Discussion

Précédemment, il a été évoqué le potentiel rôle de l'activation des voies de signalisation telles que la voie des MAPK. La suractivation des voies de signalisation comme la voie MAPK est généralement associée à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la résistance aux médicaments. Les cellules de leucémie myéloïde aigue présentent par exemple une suractivation de la voie des MAPK, entraînant la résistance à la doxorubicine. L'implication des voies de signalisation suractivées dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET a déjà été démontrée [608], notamment dans le cancer colorectal [443]. Afin de limiter ou de contre-carrer l'apparition de résistance, le traitement avec des inhibiteurs de protéines BET peut être combiné avec des inhibiteurs de voies suractivées, notamment la voie MAPK.

Les cellules HOSn et HOS JQ1R ont été traitées avec des inhibiteurs puissants et sélectifs de MEK 1/2, approuvés par la Food and Drug Administration depuis ces dix dernières années (binimetinib, cobimetinib et trametinib). Les traitements binimetinib, cobimetinib et trametinib ont été approuvés dans le mélanome muté BRAF en association avec un inhibiteur de BRAF (encorafenib, vemurafenib et dabrafenib respectivement) [642–644]. Nos résultats mettent en évidence une efficacité plus importante des inhibiteurs de MEK (MEKi) sur la capacité proliférative et clonogénique des cellules HOS JQ1R que sur les cellules HOS naïves, démontrant une sensibilité accrue des cellules HOS JQ1R aux MEKi. L'efficacité de ces MEKi confirme l'addiction des cellules HOS JQ1R à la voie des MAPK.

L'association entre la surexpression de KRAS et la résistance à JQ1 suggère que le ciblage de la voie des MAPK sensibiliserait les cellules HOS JQ1R aux BETi. Les MEKi combinés à JQ1 montrent que la combinaison diminue la viabilité des cellules HOS JQ1R, par rapport au traitement JQ1 seul. La réponse synergique de la combinaison des BETi avec des MEKi a été montrée dans plusieurs cancers dont le cancer ovarien [645] et le mélanome [581]. La combinaison d'un BETi (HMBA, JQ1 ou I-BET-762) avec du trametinib augmente l'apoptose des cellules du gliome de rat et d'humain, comparativement au traitement par le BETi seul [582]. La combinaison du GSK525762 (BETi) avec un inhibiteur de MEK inhibe de manière synregique la croissance tumorale dans de nombreux modèles précliniques présentant une mutation KRAS [628]. Ces données suggèrent l'intérêt de cibler les protéines BET et la voie des MAPK dans les modèles surexprimant KRAS. De manière surprenante, un effet antagoniste a été observée dans les HOS JQ1R après combinaison des MEKi avec JQ1, alors que nous nous attendions à observer un effet synergique de la combinaison de JQ1 avec les MEKi sur la prolifération des cellules HOS JQ1R. En effet, les MEKi seuls entraînent une diminution plus importante de la capacité proliférative et clonogénique des cellules HOS JQ1R, par rapport à la combinaisons avec JQ1. La première hypothèse qui peut être émise est que le traitement JQ1 combiné à un MEKi pourrait stimuler la capacité proliférative des cellules HOS JQ1R et bloquer l'effet du MEKi. La deuxième hypothèse se base sur le fait qu'il existe une activation compensatrice de la voie Pi3K/AKT/mTOR après le traitement par JQ1 combiné à l'inhibition de MEK. Dans la littérature, il a été montré que la voie PI3K/AKT/mTOR et la voie des MAPK, initialement décrites comme des voies de signalisation linéaires, présentent des points de convergence et sont interconnectées à plusieurs niveaux. Il existe de nombreux « cross-talk » de régulation entre ces 2 voies notamment au niveau de PI3K et de RAS [646]. Or les analyses protéiques des cellules HOS JQ1R ont mis en évidence une suractivation de la voie Pi3K/AKT/mTOR. La voie Pi3K/AKT/mTOR est un mécanisme clé contrôlant la survie, la division et le métabolisme cellulaire [646]. L'activation de cette voie, suite au traitement par JQ1, pourrait compenser l'inhibition de la voie des MAPK par le MEKi. Les analyses protéiques réalisées afin d'analyser l'impact moléculaire de la combinaison de JQ1 et des MEKi, montrent que le traitement binimetinib augmente la phosphorylation de MEK et inhibe la cascade de signalisation en aval. Dans des lignées cellulaires de neuroblastome, le traitement binimetinib augmente également la phosphorylation de MEK et inhibe la phosphorylation de ERK [647]. Après traitement avec trametinib ou cobimetinib, les cellules HOS JQ1R n'expriment pas MEK-phosphorylé et ERK-phosphorylé. Il a été montré que le cobimetinib se lie spécifiquement à MEK1 et inhibe son activité catalytique, ce qui inhibe la phosphorylation

et l'activation de ERK [648]. Dans des modèles de xénogreffes de mélanome métastatique, le traitement trametinib inhibe la phosphorylation de MEK1 et de ERK [649]. D'autres effecteurs de la voie des MAPK : RAS et RAF ont été ciblés dans les cellules d'ostéosarcome. Les traitements par salirasib (inhibiteur de RAS) ou par sorafenib (inhibiteur de RAF) semble diminuer la viabilité des cellules HOSn et HOS JQ1R, sans différence de sensibilité entre les deux lignées. Ces éléments suggèrent la présence d'un cross-talk au niveau de cette voie de signalisation, déjà décrit en clinique dans le mélanome. Les BRAFi de type I ont été développés avec succès dans les mélanomes mutés BRAF mais bien souvent, une réactivation de la voie des MAPK a entraîné le développement de résistance [650]. À ce jour, l'utilisation d'inhibiteurs de RAS n'est pas en première ligne comparativement aux autres inhibiteurs de la voie MAPK jugés plus efficaces. D'après les IC déterminés par les tests de synergie et les résultats des tests clonogéniques, il semblerait que la combinaison du JQ1 avec le salirasib ait un effet synergique sur les cellules HOS JQ1R. Les tests de synergie montrent que la combinaison sorafenib + JQ1 semble avoir un effet synergique dans les cellules HOSn et HOS JQ1R. Cependant, les tests clonogéniques après traitement par sorafenib en combinaison avec JQ1 ne montrent pas d'effet synergique de la combinaison des traitements dans les cellules HOS JQ1R. Cet effet synergique est quant à lui confirmé dans les cellules HOS naïves par les tests clonogéniques. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour s'assurer de la pertinence de ces données.

Discussion générale et perspectives

Depuis les années 1970 où la chimiothérapie néoadjuvante et postopératoire a été associée à la chirurgie, la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome s'est nettement améliorée. En effet, le taux de survie à 5 ans est maintenant de 75 % pour les patients atteints d'ostéosarcome localisé, par rapport à 20 % avant les années 1970 [127,171]. Depuis, le taux de survie a cessé d'évoluer. De plus, 30 à 50 % des patients atteints d'ostéosarcome localisé au moment du diagnostic rechutent, dont 80 % avec des tumeurs aux poumons et 9 % au niveau de sites osseux [132]. Les patients présentant des métastases, principalement pulmonaires, au moment du diagnostic ont, quant à eux, un taux de survie à 5 ans qui diminue de façon drastique pour atteindre seulement 20 %. Ces patients ont également une fréquence plus élevée de rechute (80 %). Dans le but d'améliorer la prise en charge thérapeutique et de limiter les rechutes des

patients atteints d'ostéosarcome, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire. Ainsi, de nombreuses cibles thérapeutiques, telles que les protéines à bromodomaine et domaine extra-terminal sont actuellement étudiées pour le traitement de cancers. Depuis les années 2010, de nombreux inhibiteurs de protéines BET ont été développés.

Dans l'ensemble, les résultats des études pré-cliniques ont montré des effets prometteurs des inhibiteurs de protéines BET et suggèrent que l'utilisation de ces inhibiteurs pourrait être une option thérapeutique efficace, notamment dans la prise en charge des patients ayant développé des résistances aux traitements. Les BETi ont montré leur efficacité dans des lignées radorésistantes, chimiorésistantes ou encore résistantes à l'hormonothérapie ou aux thérapies ciblées. Les BETi pourraient donc présenter une alternative thérapeutique et être proposés en seconde intention chez des patients ayant développés des résistances aux traitements conventionnels. De nombreux inhibiteurs de protéines à BET ont montré des effets anti-prolifératifs dans le traitement de cellules tumorales résistantes aux traitements conventionnels et ont même permis, dans certains cas, de surmonter cette résistance. Le PROTAC MZ1 a, par exemple, induit une diminution de la protéine cible BRD4 et un effet anti-prolifératif dans des cellules de cancer du sein triple négatif résistantes à la radiothérapie [438]. Le traitement d'explants dérivés de patients atteints de cancer de la prostate ou de xénogreffes avec des inhibiteurs de protéines BET, tels que JQ1, améliore l'efficacité de la radiothérapie en bloquant la réparation de l'ADN et permet de surmonter la radorésistance [651]. Le PROTAC, ARV-771, a détourné la résistance acquise par des cellules de liposarcome à la trabectedine, anticancéreux alcaloïde [652]. L'ABBV-075 a montré une puissante activité anti-proliférative dans plusieurs modèles de cancer de prostate résistants à l'anti-androgène de deuxième génération l'enzalutamide [653,654]. Un essai clinique mené chez des patients souffrant d'un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration évalue la sécurité, la tolérance, la pharmacocinétique ainsi que la pharmacodynamique du GS-5829 en monothérapie et en association avec l'enzalutamide (NCT02607228). Un autre PROTAC, l'ARV-825 a montré son efficacité anti-tumorale, notamment en induisant des niveaux élevés d'apoptose, dans les cellules de leucémies myéloïdes résistantes au ruxolitinib, un inhibiteur de tyrosine kinase [655]. En effet, l'ARV-825 a inhibé c-Myc, CDK4 et Cycline D1, formant le complexe CDK4/CyclineD1, impliqué dans l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et ainsi dans la division et prolifération cellulaire. L'ARV-825 a réduit l'expression des gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl-xL et XIAP, et, à l'inverse a augmenté l'expression des gènes pro-apoptotiques comme NOXA et CDKN1A/p21 [436]. Dans le cancer ovarien, la résistance au palbociclib, un inhibiteur de CDK 4/6, protéines régulant le cycle cellulaire. L'inhibiteur

bivalent des protéines BET, l'AZD5153, en inhibant les protéines liées au cycle cellulaire et à la voie MAPK/PI3K-AKT, a inversé la résistance au palbociclib [656]. Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs de protéines BET permet de surmonter la résistance à la radiothérapie, à la chimiothérapie, à l'hormonothérapie ou encore aux thérapies ciblées comme les inhibiteurs de tyrosine kinase. De plus, les nouvelles molécules capables d'inhiber et dégrader les protéines BET, les PROTAC, ont récemment montré leur efficacité dans des lignées de cancer du sein triple négatif sensibles mais aussi résistantes aux inhibiteurs de BET. En effet, les PROTAC MZ1 et ARV-825 ont diminué le niveau d'expression protéique de BRD4 et induit un effet anti-prolifératif des cellules de cancer du sein triple négatif sensibles et résistantes à JQ1 [438].

Même si les inhibiteurs BET ont montré leur efficacité dans de nombreuses études pré-cliniques, les premiers résultats cliniques jusqu'alors obtenus ne montrent que très peu de bénéfices lorsque ces molécules inhibitrices sont utilisées en monothérapie. Ce manque d'efficacité peut s'expliquer par la mise en place de modifications moléculaires au sein des cellules tumorales, leur permettant de survivre et parfois même de résister aux inhibiteurs de protéines BET. Tout comme Luan et al. ou encore Li et al. l'ont montré dans des cellules de cancer ovarien ou de cancer de la vessie [562,599], j'ai pu mettre en évidence, *in vivo* et *in vitro* que JQ1 induit l'autophagie dans des cellules d'ostéosarcome. J'ai également montré que l'inhibition, *in vitro*, de l'autophagie par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques tels que la chloroquine, la 3-méthyladénine et la bafilomycine potentialise l'effet antitumoral de JQ1. De plus, la combinaison JQ1 + chloroquine ralentit la progression tumorale et augmente la survie dans un modèle préclinique d'ostéosarcome. Mes données sont donc la preuve de concept que les inhibiteurs de protéines à BET peuvent être combinés à l'inhibition de l'autophagie comme approche thérapeutique dans l'ostéosarcome. L'induction de l'autophagie est un processus biologique faisant partie des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines BET décrit dans la littérature. Afin d'étudier l'implication de l'autophagie dans la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans les cellules d'ostéosarcome, nous avons développé au laboratoire une lignée d'HOS résistantes au JQ1. Nous avons mis en évidence que les cellules d'ostéosarcome résistantes au JQ1 présentent une suractivation des voies de signalisation telles que les voies PI3K/Akt/mTOR ou MAPK, également décrites dans d'autres cancers comme étant à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET. Différentes études ont montré le rôle que pouvait jouer la voie MAPK dans l'acquisition de la résistance notamment aux inhibiteurs de protéines BET [423]. Tout comme dans mon projet de thèse, la combinaison d'inhibiteurs BET avec des inhibiteurs des protéines RAF, RAS et MEK a montré son efficacité dans différents cancers. En effet, la combinaison de l'ARV-771 avec le sorafenib, inhibiteur de la protéine

RAF, déjà utilisé en clinique dans le cancer du foie, inhibe de manière synergique la croissance des cellules de carcinome hépatocellulaire [488]. La combinaison des inhibiteurs I-BET726 ou I-BET762, avec l'inhibiteur de MEK, le trametinib, a montré un effet synergique *in vitro* dans la grande majorité des lignées cellulaires de neuroblastomes, mais a montré une activité anti-tumorale limitée *in vivo* [657]. De plus, l'utilisation de JQ1 combiné au trametinib induit une régression significative de xénogreffes sous-cutanées de cellules de cancer colorectal [443]. Dans le cancer ovarien, l'association du JQ1 avec des inhibiteurs de MEK, PD0325901 ou trametinib, a diminué la prolifération ainsi que la survie des cellules tumorales, et s'est avérée plus efficace que chaque drogue seule [459]. La combinaison des inhibiteurs de protéines BET avec des inhibiteurs de MEK a également été décrite comme ayant un effet synergique dans des cellules présentant des mutations de la protéine RAS. La surexpression des protéines BET dans le mélanome mutant NRAS est associée à une faible survie des patients. L'association des inhibiteurs de protéines BET, JQ1 ou OTX-015, avec un inhibiteur de MEK, PD901, a inhibé de façon synergique la croissance du mélanome NRAS-mutant et a prolongé la survie de souris porteuses de tumeurs réfractaires aux inhibiteurs de MAPK et à l'immunothérapie [658]. La combinaison de l'I-BET 151 et du PD0325901, un inhibiteur de MEK a diminué de manière synergiques la croissance et la survie cellulaire dans des modèles mutants de KRAS ainsi que dans un sous-ensemble de lignées cellulaires sans mutations de KRAS, contrairement au traitement avec l'I-BET 151 seul ou le PD0325901 seul [489]. Un essai clinique de phase I, retiré avant d'être actif, devait évaluer l'innocuité, la pharmacocinétique, la pharmacodynamique ainsi que l'activité clinique du GSK525762 et du trametinib chez des sujets atteints de tumeurs solides (NCT03266159). Un essai clinique de phase I/II en cours de recrutement incluant des patients atteints de sarcomes réfractaires/non résécables évaluera l'effet du selumetinib, molécule inhibitrice des protéines MEK1 et MEK2, en association avec l'AZD5153, un inhibiteur bivalent des protéines BET et le durvalumab, anticorps anti-PDL1 (NCT05253131). Les trois inhibiteurs de MEK, binimetinib, cobimetinib et trametinib, utilisés dans mon projet de thèse ont déjà montré de bons résultats dans d'autres modèles et ont même été approuvés dans le mélanome muté BRAF en association avec des inhibiteurs de BRAF (encorafenib, vemurafenib et dabrafenib) [642–644].

L'activité anti-tumorale des inhibiteurs de protéines BET a aussi été renforcée par le co-traitement avec des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation telles que la voie PI3K/Akt/mTOR. La stabilisation de la protéine BRD4, malgré un traitement avec un inhibiteur de protéine BET, l'augmentation de l'activation des protéines PI3K ou encore AKT peuvent réguler la suractivation de cette voie [456,484,485]. Ainsi, la combinaison d'inhibiteurs de protéines BET et d'inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR a été évaluée dans différents cancers et a montré des résultats prometteurs. Le traitement combiné du CPI-0610 avec des inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K tels que l'alpelisib (inhibiteur de PI3K), le MK2206 ou l'ipatasertib (inhibiteurs d'Akt) a montré un effet synergique sur des organoïdes tumoraux obtenus directement auprès de patients atteints de cancer ovarien [659]. Dans un modèle murin de xénogreffe de cancer de la prostate, la combinaison de l'inhibiteur de protéines BET, JQ1, et de l'inhibiteur d'AKT, le GDC-0068 (Ipatasertib) a réduit la croissance tumorale [456]. Dans des cellules de sarcome d'Ewing, l'inhibition du récepteur à l'IGF1 combiné avec des inhibiteurs de protéines BET a augmenté de manière synergique la sensibilité, *in vitro* et *in vivo*, des cellules de sarcomes aux inhibiteurs de BET [485].

La suractivation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est à l'origine de la surexpression de la protéine mTOR. Or l'activation aberrante du complexe 1 de mTOR (mTORC1) joue un rôle dans différents contextes pathologiques y compris le cancer [660]. L'efficacité des inhibiteurs de mTOR en tant que monothérapie est limitée. En revanche, les effets thérapeutiques, *in vitro* et *in vivo*, des inhibiteurs doubles de mTORC1/2, OSI-027 et PP42 se sont considérablement améliorés, lorsqu'ils sont combinés avec un inhibiteur des protéines BET spécifique du bromodomaine 2, le RVX-208. Dans des cellules de rhabdomyosarcome, le RVX-208 a bloqué efficacement la fixation de BRD4 sur son promoteur et a diminué l'expression de protéines telles que p-AKT, p-mTOR, p-p70S6K et la cycline D1, entraînant une diminution de la prolifération [661].

Bibliographie

1. Marie, P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Med Sci (Paris)* **2001**, *17*, 1252–1259, doi:10.1051/medsci/200117121252.
2. Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *1092*, 385–396, doi:10.1196/annals.1365.035.
3. Stock, S.R. The Mineral-Collagen Interface in Bone. *Calcif Tissue Int* **2015**, *97*, 262–280, doi:10.1007/s00223-015-9984-6.
4. Aszódi, A.; Bateman, J.F.; Gustafsson, E.; Boot-Handford, R.; Fässler, R. Mammalian Skeletogenesis and Extracellular Matrix: What Can We Learn from Knockout Mice? *Cell Struct Funct* **2000**, *25*, 73–84, doi:10.1247/csf.25.73.
5. Lin, X.; Patil, S.; Gao, Y.-G.; Qian, A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol* **2020**, *11*, 757, doi:10.3389/fphar.2020.00757.
6. Hauschka, P.V.; Wians, F.H. Osteocalcin-Hydroxyapatite Interaction in the Extracellular Organic Matrix of Bone. *Anat Rec* **1989**, *224*, 180–188, doi:10.1002/ar.1092240208.
7. Icer, M.A.; Gezmen-Karadag, M. The Multiple Functions and Mechanisms of Osteopontin. *Clin Biochem* **2018**, *59*, 17–24, doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003.
8. Buckwalter, J.A.; Glimcher, M.J.; Cooper, R.R.; Recker, R. Bone Biology. I: Structure, Blood Supply, Cells, Matrix, and Mineralization. *Instr Course Lect* **1996**, *45*, 371–386.
9. Downey, P.A.; Siegel, M.I. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Phys Ther* **2006**, *86*, 77–91, doi:10.1093/ptj/86.1.77.
10. Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. The Cell Biology of Bone Metabolism. *J Clin Pathol* **2008**, *61*, 577–587, doi:10.1136/jcp.2007.048868.
11. Malluche, H.H.; Faugere, M.-C. 3 Lamellar and Woven Bone. *Atlas of Mineralized Bone Histology* **1986**, 10–11, doi:10.1159/000412200.
12. Ascenzi, M.-G.; Roe, A.K. The Osteon: The Micromechanical Unit of Compact Bone. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2012**, *17*, 1551–1581, doi:10.2741/4003.
13. Lopes, D.; Martins-Cruz, C.; Oliveira, M.B.; Mano, J.F. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. *Biomaterials* **2018**, *185*, 240–275, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.028.
14. Kane, R.; Ma1, P.X. Mimicking the Nanostructure of Bone Matrix to Regenerate Bone. *Mater Today (Kidlington)* **2013**, *16*, 418–423, doi:10.1016/j.mattod.2013.11.001.
15. Batist, G.; Tulpule, A.; Sinha, B.K.; Katki, A.G.; Myers, C.E.; Cowan, K.H. Overexpression of a Novel Anionic Glutathione Transferase in Multidrug-Resistant Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15544–15549.
16. Lucas, D. Structural Organization of the Bone Marrow and Its Role in Hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* **2021**, *28*, 36–42, doi:10.1097/MOH.0000000000000621.
17. Bao, C.; Teo, E.; Chong, M.; Liu, Y.; Choolani, M.; Chan, J.K. Advances in Bone Tissue Engineering. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering, INTECH* **2013**, 599–614, doi:10.5772/55916.
18. Robles-Linares, J.A.; Ramírez-Cedillo, E.; Siller, H.R.; Rodríguez, C.A.; Martínez-López, J.I. Parametric Modeling of Biomimetic Cortical Bone Microstructure for Additive Manufacturing. *Materials (Basel)* **2019**, *12*, E913, doi:10.3390/ma12060913.
19. Sebo, Z.L.; Rendina-Ruedy, E.; Ables, G.P.; Lindskog, D.M.; Rodeheffer, M.S.; Fazeli, P.K.; Horowitz, M.C. Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications. *Endocr Rev* **2019**, *40*, 1187–1206, doi:10.1210/er.2018-00138.
20. Tencerova, M.; Ferencakova, M.; Kassem, M. Bone Marrow Adipose Tissue: Role in Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2021**, *35*, 101545, doi:10.1016/j.beem.2021.101545.

21. Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. Osteoblast and Osteocyte: Games without Frontiers. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *561*, 3–12, doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.
22. Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* **2002**, *108*, 17–29, doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
23. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R. da S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 421746, doi:10.1155/2015/421746.
24. Grigoriadis, A.E.; Heersche, J.N.; Aubin, J.E. Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-Derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone. *J Cell Biol* **1988**, *106*, 2139–2151, doi:10.1083/jcb.106.6.2139.
25. Damoulis, P.D.; Hauschka, P.V. Nitric Oxide Acts in Conjunction with Proinflammatory Cytokines to Promote Cell Death in Osteoblasts. *J Bone Miner Res* **1997**, *12*, 412–422, doi:10.1359/jbmr.1997.12.3.412.
26. Batra, N.; Kar, R.; Jiang, J.X. Gap Junctions and Hemichannels in Signal Transmission, Function and Development of Bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 1909–1918, doi:10.1016/j.bbamem.2011.09.018.
27. Unger, V.M.; Kumar, N.M.; Gilula, N.B.; Yeager, M. Three-Dimensional Structure of a Recombinant Gap Junction Membrane Channel. *Science* **1999**, *283*, 1176–1180, doi:10.1126/science.283.5405.1176.
28. Miller, S.C.; de Saint-Georges, L.; Bowman, B.M.; Jee, W.S. Bone Lining Cells: Structure and Function. *Scanning Microsc* **1989**, *3*, 953–960; discussion 960-961.
29. Andersen, T.L.; Sondergaard, T.E.; Skorzynska, K.E.; Dagnaes-Hansen, F.; Plesner, T.L.; Hauge, E.M.; Plesner, T.; Delaisse, J.-M. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *Am J Pathol* **2009**, *174*, 239–247, doi:10.2353/ajpath.2009.080627.
30. Mosley, J.R. Osteoporosis and Bone Functional Adaptation: Mechanobiological Regulation of Bone Architecture in Growing and Adult Bone, a Review. *J Rehabil Res Dev* **2000**, *37*, 189–199.
31. Aarden, E.M.; Burger, E.H.; Nijweide, P.J. Function of Osteocytes in Bone. *J Cell Biochem* **1994**, *55*, 287–299, doi:10.1002/jcb.240550304.
32. Schaffler, M.B.; Cheung, W.-Y.; Majeska, R.; Kennedy, O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif Tissue Int* **2014**, *94*, 5–24, doi:10.1007/s00223-013-9790-y.
33. Manolagas, S. Choreography from the Tomb: An Emerging Role of Dying Osteocytes in the Purposeful, and Perhaps Not So Purposeful, Targeting of Bone Remodeling. *International Bone and Mineral Society Knowledge Environment* **2006**, *3*, 5–14, doi:10.1138/20060193.
34. Stains, J.P.; Fontana, F.; Civitelli, R. Intercellular Junctions and Cell-Cell Communication in the Skeletal System. *Principles of Bone Biology* **2019**, 423–442, doi:10.1016/B978-0-12-814841-9.00018-X.
35. Rochefort, G.Y.; Pallu, S.; Benhamou, C.L. Osteocyte: The Unrecognized Side of Bone Tissue. *Osteoporos Int* **2010**, *21*, 1457–1469, doi:10.1007/s00198-010-1194-5.
36. Dallas, S.L.; Prideaux, M.; Bonewald, L.F. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. *Endocr Rev* **2013**, *34*, 658–690, doi:10.1210/er.2012-1026.
37. Bonewald, L.F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann N Y Acad Sci* **2007**, *1116*, 281–290, doi:10.1196/annals.1402.018.
38. Crockett, J.C.; Mellis, D.J.; Scott, D.I.; Helfrich, M.H. New Knowledge on Critical Osteoclast Formation and Activation Pathways from Study of Rare Genetic Diseases of

- Osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL Axis. *Osteoporos Int* **2011**, 22, 1–20, doi:10.1007/s00198-010-1272-8.
39. Boyce, B.F.; Hughes, D.E.; Wright, K.R.; Xing, L.; Dai, A. Recent Advances in Bone Biology Provide Insight into the Pathogenesis of Bone Diseases. *Lab Invest* **1999**, 79, 83–94.
 40. Boyce, B.F.; Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in Bone Modeling and Remodeling. *Arch Biochem Biophys* **2008**, 473, 139–146, doi:10.1016/j.abb.2008.03.018.
 41. Matsumoto, M.; Kogawa, M.; Wada, S.; Takayanagi, H.; Tsujimoto, M.; Katayama, S.; Hisatake, K.; Nogi, Y. Essential Role of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* **2004**, 279, 45969–45979, doi:10.1074/jbc.M408795200.
 42. Luchin, A.; Purdom, G.; Murphy, K.; Clark, M.Y.; Angel, N.; Cassady, A.I.; Hume, D.A.; Ostrowski, M.C. The Microphthalmia Transcription Factor Regulates Expression of the Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Gene during Terminal Differentiation of Osteoclasts. *J Bone Miner Res* **2000**, 15, 451–460, doi:10.1359/jbmr.2000.15.3.451.
 43. Miyamoto, T. The Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein DC-STAMP Is Essential for Osteoclast Fusion and Osteoclast Bone-Resorbing Activity. *Mod Rheumatol* **2006**, 16, 341–342, doi:10.1007/s10165-006-0524-0.
 44. Kobayashi, Y.; Udagawa, N.; Takahashi, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2009**, 19, 61–72, doi:10.1615/critrevukargeneexpr.v19.i1.30.
 45. Hu, R.; Sharma, S.M.; Bronisz, A.; Srinivasan, R.; Sankar, U.; Ostrowski, M.C. Eos, MITF, and PU.1 Recruit Corepressors to Osteoclast-Specific Genes in Committed Myeloid Progenitors. *Mol Cell Biol* **2007**, 27, 4018–4027, doi:10.1128/MCB.01839-06.
 46. Kenkre, J.S.; Bassett, J. The Bone Remodelling Cycle. *Ann Clin Biochem* **2018**, 55, 308–327, doi:10.1177/0004563218759371.
 47. Sims, N.A.; Martin, T.J. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol* **2020**, 82, 507–529, doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034425.
 48. Krum, S.A.; Miranda-Carboni, G.A.; Hauschka, P.V.; Carroll, J.S.; Lane, T.F.; Freedman, L.P.; Brown, M. Estrogen Protects Bone by Inducing Fas Ligand in Osteoblasts to Regulate Osteoclast Survival. *EMBO J* **2008**, 27, 535–545, doi:10.1038/sj.emboj.7601984.
 49. Raggatt, L.J.; Partridge, N.C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem* **2010**, 285, 25103–25108, doi:10.1074/jbc.R109.041087.
 50. Heino, T.J.; Hentunen, T.A.; Väänänen, H.K. Osteocytes Inhibit Osteoclastic Bone Resorption through Transforming Growth Factor-Beta: Enhancement by Estrogen. *J Cell Biochem* **2002**, 85, 185–197, doi:10.1002/jcb.10109.
 51. Jüppner, H.; Abou-Samra, A.B.; Freeman, M.; Kong, X.F.; Schipani, E.; Richards, J.; Kolakowski, L.F.; Hock, J.; Potts, J.T.; Kronenberg, H.M. A G Protein-Linked Receptor for Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide. *Science* **1991**, 254, 1024–1026, doi:10.1126/science.1658941.
 52. Swarthout, J.T.; D’Alonzo, R.C.; Selvamurugan, N.; Partridge, N.C. Parathyroid Hormone-Dependent Signaling Pathways Regulating Genes in Bone Cells. *Gene* **2002**, 282, 1–17, doi:10.1016/s0378-1119(01)00798-3.
 53. Ma, Y.L.; Cain, R.L.; Halladay, D.L.; Yang, X.; Zeng, Q.; Miles, R.R.; Chandrasekhar, S.; Martin, T.J.; Onyia, J.E. Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. *Endocrinology* **2001**, 142, 4047–4054, doi:10.1210/endo.142.9.8356.

54. Insogna, K.L.; Sahni, M.; Grey, A.B.; Tanaka, S.; Horne, W.C.; Neff, L.; Mitnick, M.; Levy, J.B.; Baron, R. Colony-Stimulating Factor-1 Induces Cytoskeletal Reorganization and c-Src-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Selected Cellular Proteins in Rodent Osteoclasts. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 2476–2485, doi:10.1172/JCI119790.
55. Burgess, T.L.; Qian, Y.; Kaufman, S.; Ring, B.D.; Van, G.; Capparelli, C.; Kelley, M.; Hsu, H.; Boyle, W.J.; Dunstan, C.R.; et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *J Cell Biol* **1999**, *145*, 527–538, doi:10.1083/jcb.145.3.527.
56. Silver, I.A.; Murrills, R.J.; Etherington, D.J. Microelectrode Studies on the Acid Microenvironment beneath Adherent Macrophages and Osteoclasts. *Exp Cell Res* **1988**, *175*, 266–276, doi:10.1016/0014-4827(88)90191-7.
57. Delaissé, J.-M.; Andersen, T.L.; Engsig, M.T.; Henriksen, K.; Troen, T.; Blavier, L. Matrix Metalloproteinases (MMP) and Cathepsin K Contribute Differently to Osteoclastic Activities. *Microsc Res Tech* **2003**, *61*, 504–513, doi:10.1002/jemt.10374.
58. Ikebuchi, Y.; Aoki, S.; Honma, M.; Hayashi, M.; Sugamori, Y.; Khan, M.; Kariya, Y.; Kato, G.; Tabata, Y.; Penninger, J.M.; et al. Coupling of Bone Resorption and Formation by RANKL Reverse Signalling. *Nature* **2018**, *561*, 195–200, doi:10.1038/s41586-018-0482-7.
59. Matsuo, K.; Otaki, N. Bone Cell Interactions through Eph/Ephrin: Bone Modeling, Remodeling and Associated Diseases. *Cell Adh Migr* **2012**, *6*, 148–156, doi:10.4161/cam.20888.
60. Zhou, H.; Chernenky, R.; Davies, J.E. Deposition of Cement at Reversal Lines in Rat Femoral Bone. *J Bone Miner Res* **1994**, *9*, 367–374, doi:10.1002/jbmr.5650090311.
61. Zhao, C.; Irie, N.; Takada, Y.; Shimoda, K.; Miyamoto, T.; Nishiwaki, T.; Suda, T.; Matsuo, K. Bidirectional EphrinB2-EphB4 Signaling Controls Bone Homeostasis. *Cell Metab* **2006**, *4*, 111–121, doi:10.1016/j.cmet.2006.05.012.
62. Sims, N.A.; Martin, T.J. Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How Are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? *Front Endocrinol (Lausanne)* **2015**, *6*, 41, doi:10.3389/fendo.2015.00041.
63. van Bezooijen, R.L.; Roelen, B.A.J.; Visser, A.; van der Wee-Pals, L.; de Wilt, E.; Karperien, M.; Hamersma, H.; Papapoulos, S.E.; ten Dijke, P.; Löwik, C.W.G.M. Sclerostin Is an Osteocyte-Expressed Negative Regulator of Bone Formation, but Not a Classical BMP Antagonist. *J Exp Med* **2004**, *199*, 805–814, doi:10.1084/jem.20031454.
64. Li, X.; Zhang, Y.; Kang, H.; Liu, W.; Liu, P.; Zhang, J.; Harris, S.E.; Wu, D. Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling *. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 19883–19887, doi:10.1074/jbc.M413274200.
65. Fermor, B.; Skerry, T.M. PTH Receptor Binding on Osteocytes in Cortical and Trabecular Bone. *Bone* **1995**, *17*.
66. Robling, A.G.; Niziolek, P.J.; Baldridge, L.A.; Condon, K.W.; Allen, M.R.; Alam, I.; Mantila, S.M.; Gluhak-Heinrich, J.; Bellido, T.M.; Harris, S.E.; et al. Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 5866–5875, doi:10.1074/jbc.M705092200.
67. Atkins, G.J.; Findlay, D.M. Osteocyte Regulation of Bone Mineral: A Little Give and Take. *Osteoporos Int* **2012**, *23*, 2067–2079, doi:10.1007/s00198-012-1915-z.
68. Murshed, M.; Harmey, D.; Millán, J.L.; McKee, M.D.; Karsenty, G. Unique Coexpression in Osteoblasts of Broadly Expressed Genes Accounts for the Spatial Restriction of ECM Mineralization to Bone. *Genes Dev* **2005**, *19*, 1093–1104, doi:10.1101/gad.1276205.
69. Harmey, D.; Hesse, L.; Narisawa, S.; Johnson, K.A.; Terkeltaub, R.; Millán, J.L. Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and

- Ank: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. *Am J Pathol* **2004**, 164, 1199–1209, doi:10.1016/S0002-9440(10)63208-7.
70. Rowe, P.; Koller, A.; Sharma, S. Physiology, Bone Remodeling. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
 71. Yang, Y.; Yang, R.; Roth, M.; Piperdi, S.; Zhang, W.; Dorfman, H.; Rao, P.; Park, A.; Tripathi, S.; Freeman, C.; et al. Genetically Transforming Human Osteoblasts to Sarcoma: Development of an Osteosarcoma Model. *Genes Cancer* **2017**, 8, 484–494, doi:10.18632/genesandcancer.133.
 72. Mohseny, A.B.; Szuhai, K.; Romeo, S.; Buddingh, E.P.; Briaire-de Bruijn, I.; de Jong, D.; van Pel, M.; Cleton-Jansen, A.-M.; Hogendoorn, P.C.W. Osteosarcoma Originates from Mesenchymal Stem Cells in Consequence of Aneuploidization and Genomic Loss of Cdkn2. *J Pathol* **2009**, 219, 294–305, doi:10.1002/path.2603.
 73. Deng, Z.-L.; Sharff, K.A.; Tang, N.; Song, W.-X.; Luo, J.; Luo, X.; Chen, J.; Bennett, E.; Reid, R.; Manning, D.; et al. Regulation of Osteogenic Differentiation during Skeletal Development. *Front Biosci* **2008**, 13, 2001–2021, doi:10.2741/2819.
 74. Rejniak, K.A.; Lloyd, M.C.; Reed, D.R.; Bui, M.M. Diagnostic Assessment of Osteosarcoma Chemoresistance Based on Virtual Clinical Trials. *Medical Hypotheses* **2015**, 85, 348–354, doi:10.1016/j.mehy.2015.06.015.
 75. ESMO/European Sarcoma Network Working Group Bone Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2014**, 25 Suppl 3, iii113–123, doi:10.1093/annonc/mdu256.
 76. Chen, Y.; Cao, J.; Zhang, N.; Yang, B.; He, Q.; Shao, X.; Ying, M. Advances in Differentiation Therapy for Osteosarcoma. *Drug Discovery Today* **2019**, doi:10.1016/j.drudis.2019.08.010.
 77. Mutsaers, A.J.; Walkley, C.R. Cells of Origin in Osteosarcoma: Mesenchymal Stem Cells or Osteoblast Committed Cells? *Bone* **2014**, 62, 56–63, doi:10.1016/j.bone.2014.02.003.
 78. Rodriguez, R.; Rubio, R.; Menendez, P. Modeling Sarcomagenesis Using Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Cell Res* **2012**, 22, 62–77, doi:10.1038/cr.2011.157.
 79. Abarrategi, A.; Tornin, J.; Martinez-Cruzado, L.; Hamilton, A.; Martinez-Campos, E.; Rodrigo, J.P.; González, M.V.; Baldini, N.; Garcia-Castro, J.; Rodriguez, R. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int* **2016**, 2016, doi:10.1155/2016/3631764.
 80. Berman, S.D.; Calo, E.; Landman, A.S.; Danielian, P.S.; Miller, E.S.; West, J.C.; Fonhoue, B.D.; Caron, A.; Bronson, R.; Bouxsein, M.L.; et al. Metastatic Osteosarcoma Induced by Inactivation of Rb and P53 in the Osteoblast Lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, 11851–11856, doi:10.1073/pnas.0805462105.
 81. Sottnik, J.L.; Campbell, B.; Mehra, R.; Behbahani-Nejad, O.; Hall, C.L.; Keller, E.T. Osteocytes Serve as a Progenitor Cell of Osteosarcoma. *J Cell Biochem* **2014**, 115, 1420–1429, doi:10.1002/jcb.24793.
 82. Lamoureux, F.; Trichet, V.; Chipoy, C.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Redini, F. Recent Advances in the Management of Osteosarcoma and Forthcoming Therapeutic Strategies. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2007**, 7, 169–181, doi:10.1586/14737140.7.2.169.
 83. Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. Osteosarcoma Incidence and Survival Rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* **2009**, 115, 1531–1543, doi:10.1002/cncr.24121.
 84. Jafari, F.; Javdansirat, S.; Sanaie, S.; Naseri, A.; Shamekh, A.; Rostamzadeh, D.; Dolati, S. Osteosarcoma: A Comprehensive Review of Management and Treatment Strategies. *Annals of Diagnostic Pathology* **2020**, 49, 151654, doi:10.1016/j.anndiagpath.2020.151654.

85. Ottaviani, G.; Jaffe, N. The Epidemiology of Osteosarcoma. *Cancer Treat Res* **2009**, *152*, 3–13, doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_1.
86. He, J.-P.; Hao, Y.; Wang, X.-L.; Yang, X.-J.; Shao, J.-F.; Guo, F.-J.; Feng, J.-X. Review of the Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 5967–5976, doi:10.7314/apjcp.2014.15.15.5967.
87. Sadykova, L.R.; Ntekim, A.I.; Muyangwa-Semenova, M.; Rutland, C.S.; Jeyapalan, J.N.; Blatt, N.; Rizvanov, A.A. Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma. *Cancer Investigation* **2020**, *38*, 259–269, doi:10.1080/07357907.2020.1768401.
88. Lindsey, B.A.; Markel, J.E.; Kleinerman, E.S. Osteosarcoma Overview. *Rheumatol Ther* **2016**, *4*, 25–43, doi:10.1007/s40744-016-0050-2.
89. Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. International Osteosarcoma Incidence Patterns in Children and Adolescents, Middle Ages and Elderly Persons. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 229–234, doi:10.1002/ijc.24320.
90. Steliarova-Foucher, E.; Stiller, C.; Kaatsch, P.; Berrino, F.; Coebergh, J.-W.; Lacour, B.; Parkin, M. Geographical Patterns and Time Trends of Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): An Epidemiological Study. *Lancet* **2004**, *364*, 2097–2105, doi:10.1016/S0140-6736(04)17550-8.
91. Stiller, C.A.; Bielack, S.S.; Jundt, G.; Steliarova-Foucher, E. Bone Tumours in European Children and Adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System Project. *Eur J Cancer* **2006**, *42*, 2124–2135, doi:10.1016/j.ejca.2006.05.015.
92. Eyre, R.; Feltbower, R.G.; James, P.W.; Blakey, K.; Mubwandarikwa, E.; Forman, D.; McKinney, P.A.; Pearce, M.S.; McNally, R.J.Q. The Epidemiology of Bone Cancer in 0 - 39 Year Olds in Northern England, 1981 - 2002. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 357, doi:10.1186/1471-2407-10-357.
93. Fraumeni, J.F. Stature and Malignant Tumors of Bone in Childhood and Adolescence. *Cancer* **1967**, *20*, 967–973, doi:10.1002/1097-0142(196706)20:6<967::aid-cncr2820200606>3.0.co;2-p.
94. Ruza, E.; Sotillo, E.; Sierrasesúмага, L.; Azcona, C.; Patiño-García, A. Analysis of Polymorphisms of the Vitamin D Receptor, Estrogen Receptor, and Collagen Ialpha1 Genes and Their Relationship with Height in Children with Bone Cancer. *J Pediatr Hematol Oncol* **2003**, *25*, 780–786, doi:10.1097/00043426-200310000-00007.
95. Longhi, A.; Pasini, A.; Cicognani, A.; Baronio, F.; Pellacani, A.; Baldini, N.; Bacci, G. Height as a Risk Factor for Osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* **2005**, *27*, 314–318, doi:10.1097/01.mph.0000169251.57611.8e.
96. Goodman, M.A.; McMaster, J.H.; Drash, A.L.; Diamond, P.E.; Kappakas, G.S.; Scranton, P.E. Metabolic and Endocrine Alterations in Osteosarcoma Patients. *Cancer* **1978**, *42*, 603–610, doi:10.1002/1097-0142(197808)42:2<603::aid-cncr2820420229>3.0.co;2-6.
97. Mirabello, L.; Pfeiffer, R.; Murphy, G.; Daw, N.C.; Patiño-Garcia, A.; Troisi, R.J.; Hoover, R.N.; Douglass, C.; Schüz, J.; Craft, A.W.; et al. Height at Diagnosis and Birth-Weight as Risk Factors for Osteosarcoma. *Cancer Causes Control* **2011**, *22*, 899–908, doi:10.1007/s10552-011-9763-2.
98. Polednak, A.P. Primary Bone Cancer Incidence in Black and White Residents of New York State. *Cancer* **1985**, *55*, 2883–2888, doi:10.1002/1097-0142(19850615)55:12<2883::aid-cncr2820551231>3.0.co;2-q.
99. Oyemade, G.A.; Abioye, A.A. Primary Malignant Tumors of Bone: Incidence in Ibadan, Nigeria. *J Natl Med Assoc* **1982**, *74*, 65–68.

100. *Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995* / [Edited by Lynn A. Gloecker Ries ... Et Al.]; National Cancer Institute, SEER Program, 1999;
101. (PDF) Knowledge And Belief About Traditional Bone Setters' Practices In Sokoto, North-West Nigeria Available online: https://www.researchgate.net/publication/352374291_Knowledge_And_Belief_About_Traditional_Bone_Setters'_Practices_In_Sokoto_North-West_Nigeria (accessed on 16 August 2022).
102. Ottaviani, G.; Jaffe, N. The Epidemiology of Osteosarcoma. *Cancer Treat Res* **2009**, *152*, 3–13, doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_1.
103. Cotterill, S.J.; Wright, C.M.; Pearce, M.S.; Craft, A.W.; UKCCSG/MRC Bone Tumour Working Group Stature of Young People with Malignant Bone Tumors. *Pediatr Blood Cancer* **2004**, *42*, 59–63, doi:10.1002/pbc.10437.
104. Marina, N.; Gebhardt, M.; Teot, L.; Gorlick, R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *Oncologist* **2004**, *9*, 422–441, doi:10.1634/theoncologist.9-4-422.
105. Sandberg, A.A.; Bridge, J.A. Updates on the Cytogenetics and Molecular Genetics of Bone and Soft Tissue Tumors: Osteosarcoma and Related Tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **2003**, *145*, 1–30.
106. Bousquet, M.; Noirot, C.; Accadbled, F.; Sales de Gauzy, J.; Castex, M.P.; Brousset, P.; Gomez-Brouchet, A. Whole-Exome Sequencing in Osteosarcoma Reveals Important Heterogeneity of Genetic Alterations. *Ann Oncol* **2016**, *27*, 738–744, doi:10.1093/annonc/mdw009.
107. Perry, J.A.; Kiezun, A.; Tonzi, P.; Van Allen, E.M.; Carter, S.L.; Baca, S.C.; Cowley, G.S.; Bhatt, A.S.; Rheinbay, E.; Pedamallu, C.S.; et al. Complementary Genomic Approaches Highlight the PI3K/MTOR Pathway as a Common Vulnerability in Osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, E5564–5573, doi:10.1073/pnas.1419260111.
108. Chen, X.; Bahrami, A.; Pappo, A.; Easton, J.; Dalton, J.; Hedlund, E.; Ellison, D.; Shurtleff, S.; Wu, G.; Wei, L.; et al. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Reports* **2014**, *7*, 104–112, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.003.
109. Wunder, J.S.; Gokgoz, N.; Parkes, R.; Bull, S.B.; Eskandarian, S.; Davis, A.M.; Beauchamp, C.P.; Conrad, E.U.; Grimer, R.J.; Healey, J.H.; et al. TP53 Mutations and Outcome in Osteosarcoma: A Prospective, Multicenter Study. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 1483–1490, doi:10.1200/JCO.2005.04.074.
110. Deshpande, A.; Hinds, P.W. The Retinoblastoma Protein in Osteoblast Differentiation and Osteosarcoma. *Curr Mol Med* **2006**, *6*, 809–817, doi:10.2174/1566524010606070809.
111. Kansara, M.; Teng, M.W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational Biology of Osteosarcoma. *Nat Rev Cancer* **2014**, *14*, 722–735, doi:10.1038/nrc3838.
112. Hansen, M.F.; Seton, M.; Merchant, A. Osteosarcoma in Paget's Disease of Bone. *J Bone Miner Res* **2006**, *21 Suppl 2*, P58–63, doi:10.1359/jbmr.06s211.
113. Larizza, L.; Roversi, G.; Volpi, L. Rothmund-Thomson Syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **2010**, *5*, 2, doi:10.1186/1750-1172-5-2.
114. Arora, H.; Chacon, A.H.; Choudhary, S.; McLeod, M.P.; Meshkov, L.; Nouri, K.; Izakovic, J. Bloom Syndrome. *Int J Dermatol* **2014**, *53*, 798–802, doi:10.1111/ijd.12408.
115. Calvert, G.T.; Randall, R.L.; Jones, K.B.; Cannon-Albright, L.; Lessnick, S.; Schiffman, J.D. At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond. *Sarcoma* **2012**, *2012*, 152382, doi:10.1155/2012/152382.

116. Gianferante, D.M.; Mirabello, L.; Savage, S.A. Germline and Somatic Genetics of Osteosarcoma - Connecting Aetiology, Biology and Therapy. *Nat Rev Endocrinol* **2017**, *13*, 480–491, doi:10.1038/nrendo.2017.16.
117. Smida, J.; Baumhoer, D.; Rosemann, M.; Walch, A.; Bielack, S.; Poremba, C.; Remberger, K.; Korsching, E.; Scheurlen, W.; Dierkes, C.; et al. Genomic Alterations and Allelic Imbalances Are Strong Prognostic Predictors in Osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 4256–4267, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0284.
118. Le Vu, B.; de Vathaire, F.; Shamsaldin, A.; Hawkins, M.M.; Grimaud, E.; Hardiman, C.; Diallo, I.; Vassal, G.; Bessa, E.; Campbell, S.; et al. Radiation Dose, Chemotherapy and Risk of Osteosarcoma after Solid Tumours during Childhood. *Int J Cancer* **1998**, *77*, 370–377, doi:10.1002/(sici)1097-0215(19980729)77:3<370::aid-ijc11>3.0.co;2-c.
119. Shimatani, A.; Aono, M.; Hoshi, M.; Oebisu, N.; Iwai, T.; Takada, N.; Hara, J.; Nitani, C.; Nakamura, H. Secondary Osteosarcoma in Patients Previously Treated for Childhood Cancer: Three Case Reports. *Molecular and Clinical Oncology* **2019**, *10*, 153–158, doi:10.3892/mco.2018.1752.
120. Dray, M.; Miller, M.V. Paget's Osteosarcoma and Post-radiation Osteosarcoma: Secondary Osteosarcoma at Middlemore Hospital, New Zealand. *Pathology* **2008**, doi:10.1080/00313020802320663.
121. Douglass, C.W.; Joshipura, K. Caution Needed in Fluoride and Osteosarcoma Study. *Cancer Causes Control* **2006**, *17*, 481–482, doi:10.1007/s10552-006-0008-8.
122. Paulino, A.C.; Fowler, B.Z. Secondary Neoplasms after Radiotherapy for a Childhood Solid Tumor. *Pediatr Hematol Oncol* **2005**, *22*, 89–101, doi:10.1080/08880010590896459.
123. Linet, M.S.; Kim, K.P.; Rajaraman, P. Children's Exposure to Diagnostic Medical Radiation and Cancer Risk: Epidemiologic and Dosimetric Considerations. *Pediatr Radiol* **2009**, *39 Suppl 1*, S4-26, doi:10.1007/s00247-008-1026-3.
124. Tan, M.L.; Choong, P.F.M.; Dass, C.R. Osteosarcoma – Conventional Treatment vs. Gene Therapy. *Cancer Biology & Therapy* **2009**, *8*, 106–117, doi:10.4161/cbt.8.2.7385.
125. Klein, M.J.; Siegal, G.P. Osteosarcoma: Anatomic and Histologic Variants. *Am. J. Clin. Pathol.* **2006**, *125*, 555–581, doi:10.1309/UC6K-QHLD-9LV2-KENN.
126. Isakoff, M.S.; Bielack, S.S.; Meltzer, P.; Gorlick, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3029–3035, doi:10.1200/JCO.2014.59.4895.
127. Mialou, V.; Philip, T.; Kalifa, C.; Perol, D.; Gentet, J.-C.; Marec-Berard, P.; Pacquement, H.; Chastagner, P.; Defaschelles, A.-S.; Hartmann, O. Metastatic Osteosarcoma at Diagnosis: Prognostic Factors and Long-Term Outcome--the French Pediatric Experience. *Cancer* **2005**, *104*, 1100–1109, doi:10.1002/cncr.21263.
128. Misaghi, A.; Goldin, A.; Awad, M.; Kulidjian, A.A. Osteosarcoma: A Comprehensive Review. *SICOT-J* **2018**, *4*, 12, doi:10.1051/sicotj/2017028.
129. Marko, T. Uncovering Mechanisms of Osteosarcoma Metastasis. **2016**.
130. Strauss, S.J.; Whelan, J.S. Current Questions in Bone Sarcomas. *Current Opinion in Oncology* **2018**, *30*, 252–259, doi:10.1097/CCO.0000000000000456.
131. Marchandet, L.; Lallier, M.; Charrier, C.; Baud'huin, M.; Ory, B.; Lamoureux, F. Mechanisms of Resistance to Conventional Therapies for Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 683, doi:10.3390/cancers13040683.
132. Bacci, G.; Briccoli, A.; Longhi, A.; Ferrari, S.; Mercuri, M.; Faggioli, F.; Versari, M.; Picci, P. Treatment and Outcome of Recurrent Osteosarcoma: Experience at Rizzoli in 235 Patients Initially Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Acta Oncologica* **2005**, *44*, 748–755, doi:10.1080/02841860500327503.

133. Bruland, O.S.; Høifødt, H.; Saeter, G.; Smeland, S.; Fodstad, O. Hematogenous Micrometastases in Osteosarcoma Patients. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 4666–4673, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0165.
134. Strauss, S.J.; Ng, T.; Mendoza-Naranjo, A.; Whelan, J.; Sorensen, P.H.B. Understanding Micrometastatic Disease and Anoikis Resistance in Ewing Family of Tumors and Osteosarcoma. *Oncologist* **2010**, *15*, 627–635, doi:10.1634/theoncologist.2010-0093.
135. Bruland, Ø.S.; Høifødt, H.; Hall, K.S.; Smeland, S.; Fodstad, Ø. Bone Marrow Micrometastases Studied by an Immunomagnetic Isolation Procedure in Extremity Localized Non-Metastatic Osteosarcoma Patients. *Cancer Treat Res* **2009**, *152*, 509–515, doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_30.
136. Kerboeuf, M.; Koppang, E.O.; Haaland, A.H.; Lingaas, F.; Bruland, Ø.S.; Teige, J.; Moe, L. Early Immunohistochemical Detection of Pulmonary Micrometastases in Dogs with Osteosarcoma. *Acta Vet Scand* **2021**, *63*, 41, doi:10.1186/s13028-021-00608-9.
137. Wittig, J.C.; Bickels, J.; Priebat, D.; Jelinek, J.; Kellar-Graney, K.; Shmookler, B.; Malawer, M.M. Osteosarcoma: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* **2002**, *65*, 1123–1132.
138. Takeuchi, A.; Lewis, V.O.; Satcher, R.L.; Moon, B.S.; Lin, P.P. What Are the Factors That Affect Survival and Relapse After Local Recurrence of Osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res* **2014**, *472*, 3188–3195, doi:10.1007/s11999-014-3759-7.
139. Ritter, J.; Bielack, S.S. Osteosarcoma. *Ann Oncol* **2010**, *21 Suppl 7*, vii320-325, doi:10.1093/annonc/mdq276.
140. Shimose, S.; Kubo, T.; Fujimori, J.; Furuta, T.; Ochi, M. A Novel Assessment Method of Serum Alkaline Phosphatase for the Diagnosis of Osteosarcoma in Children and Adolescents. *J Orthop Sci* **2014**, *19*, 997–1003, doi:10.1007/s00776-014-0617-0.
141. Chen, J.; Sun, M.; Hua, Y.; Cai, Z. Prognostic Significance of Serum Lactate Dehydrogenase Level in Osteosarcoma: A Meta-Analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* **2014**, *140*, 1205–1210, doi:10.1007/s00432-014-1644-0.
142. Limmahakhun, S.; Pothacharoen, P.; Theera-Umpon, N.; Arpornchayanon, O.; Leerapun, T.; Luevitoonvechkij, S.; Pruksakorn, D. Relationships between Serum Biomarker Levels and Clinical Presentation of Human Osteosarcomas. *Asian Pac J Cancer Prev* **2011**, *12*, 1717–1722.
143. Ren, H.-Y.; Sun, L.-L.; Li, H.-Y.; Ye, Z.-M. Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Level in Osteosarcoma: A Meta-Analysis of Published Data. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 160835, doi:10.1155/2015/160835.
144. Bacci, G.; Picci, P.; Ferrari, S.; Orlandi, M.; Ruggieri, P.; Casadei, R.; Ferraro, A.; Biagini, R.; Battistini, A. Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Measurements in Patients with Osteosarcoma Treated with Adjuvant or Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer* **1993**, *71*, 1224–1230, doi:10.1002/1097-0142(19930215)71:4<1224::aid-cnrcr2820710409>3.0.co;2-m.
145. Shi, L.; Xie, C.; Zhu, J.; Chen, X. Downregulation of Serum MiR-194 Predicts Poor Prognosis in Osteosarcoma Patients. *Ann Diagn Pathol* **2020**, *46*, 151488, doi:10.1016/j.anndiagpath.2020.151488.
146. Bacci, G.; Bertoni, F.; Longhi, A.; Ferrari, S.; Forni, C.; Biagini, R.; Bacchini, P.; Donati, D.; Manfrini, M.; Bernini, G.; et al. Neoadjuvant Chemotherapy for High-Grade Central Osteosarcoma of the Extremity. Histologic Response to Preoperative Chemotherapy Correlates with Histologic Subtype of the Tumor. *Cancer* **2003**, *97*, 3068–3075, doi:10.1002/cncr.11456.
147. Machado, I.; Navarro, S.; Picci, P.; Llombart-Bosch, A. The Utility of SATB2 Immunohistochemical Expression in Distinguishing between Osteosarcomas and Their

- Malignant Bone Tumor Mimickers, Such as Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas. *Pathology - Research and Practice* **2016**, 212, doi:10.1016/j.prp.2016.06.012.
148. Agustina, H.; Asyifa, I.; Aziz, A.; Hernowo, B.S. The Role of Osteocalcin and Alkaline Phosphatase Immunohistochemistry in Osteosarcoma Diagnosis. *Patholog Res Int* **2018**, 2018, 6346409, doi:10.1155/2018/6346409.
 149. Enneking, W.F.; Spanier, S.S.; Goodman, M.A. A System for the Surgical Staging of Musculoskeletal Sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* **1980**, 106–120.
 150. Mangham, D.C.; Athanasou, N.A. Guidelines for Histopathological Specimen Examination and Diagnostic Reporting of Primary Bone Tumours. *Clin Sarcoma Res* **2011**, 1, 6, doi:10.1186/2045-3329-1-6.
 151. Kundu, Z.S. Classification, Imaging, Biopsy and Staging of Osteosarcoma. *Indian J Orthop* **2014**, 48, 238–246, doi:10.4103/0019-5413.132491.
 152. Teeny, S.M.; York, S.C.; Mesko, J.W.; Rea, R.E. Long-Term Follow-up Care Recommendations after Total Hip and Knee Arthroplasty: Results of the American Association of Hip and Knee Surgeons' Member Survey. *J Arthroplasty* **2003**, 18, 954–962, doi:10.1016/j.arth.2003.09.001.
 153. Righi, A.; Gambarotti, M.; Longo, S.; Benini, S.; Gamberi, G.; Cocchi, S.; Vanel, D.; Picci, P.; Bertoni, F.; Simoni, A.; et al. Small Cell Osteosarcoma: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Analysis of 36 Cases. *Am J Surg Pathol* **2015**, 39, 691–699, doi:10.1097/PAS.0000000000000412.
 154. Daft, P.G.; Yuan, K.; Warram, J.M.; Klein, M.J.; Siegal, G.P.; Zayzafoon, M. Alpha-CaMKII Plays a Critical Role in Determining the Aggressive Behavior of Human Osteosarcoma. *Mol Cancer Res* **2013**, 11, 349–359, doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0572.
 155. Saraf, A.J.; Fenger, J.M.; Roberts, R.D. Osteosarcoma: Accelerating Progress Makes for a Hopeful Future. *Front Oncol* **2018**, 8, 4, doi:10.3389/fonc.2018.00004.
 156. Ottaviani, G.; Robert, R.S.; Huh, W.W.; Jaffe, N. Functional, Psychosocial and Professional Outcomes in Long-Term Survivors of Lower-Extremity Osteosarcomas: Amputation versus Limb Salvage. *Cancer Treat. Res.* **2009**, 152, 421–436, doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_23.
 157. Li, X.; Zhang, Y.; Wan, S.; Li, H.; Li, D.; Xia, J.; Yuan, Z.; Ren, M.; Yu, S.; Li, S.; et al. A Comparative Study between Limb-Salvage and Amputation for Treating Osteosarcoma. *J Bone Oncol* **2016**, 5, 15–21, doi:10.1016/j.jbo.2016.01.001.
 158. Anderson, P.M. Effectiveness of Radiotherapy for Osteosarcoma That Responds to Chemotherapy. *Mayo Clinic Proceedings* **2003**, 78, 145–146, doi:10.4065/78.2.145.
 159. Schwarz, R.; Bruland, O.; Cassoni, A.; Schomberg, P.; Bielack, S. The Role of Radiotherapy in Osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **2009**, 152, 147–164, doi:10.1007/978-1-4419-0284-9_7.
 160. Bielack, S.S.; Hecker-Nolting, S.; Blattmann, C.; Kager, L. Advances in the Management of Osteosarcoma. *F1000Res* **2016**, 5, 2767, doi:10.12688/f1000research.9465.1.
 161. Liu, Y.; Xu, Y.; Lin, N.; Jiang, S.; Wang, Y.; Ye, Z. High-Dose Methotrexate (HD-MTX) Used as an Adjunct with Other Chemotherapeutics for the Treatment of Osteosarcoma. *Cell Biochem Biophys* **2015**, 71, 1097–1104, doi:10.1007/s12013-014-0314-9.
 162. Bielack, S.S.; Smeland, S.; Whelan, J.S.; Marina, N.; Jovic, G.; Hook, J.M.; Krailo, M.D.; Gebhardt, M.; Pápai, Z.; Meyer, J.; et al. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to

- Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* **2015**, 33, 2279–2287, doi:10.1200/JCO.2014.60.0734.
163. Wang, X.; Zheng, H.; Shou, T.; Tang, C.; Miao, K.; Wang, P. Effectiveness of Multi-Drug Regimen Chemotherapy Treatment in Osteosarcoma Patients: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Orthop Surg Res* **2017**, 12, 52, doi:10.1186/s13018-017-0544-9.
 164. Gaspar, N.; Occean, B.-V.; Pacquement, H.; Bompas, E.; Bouvier, C.; Brisse, H.J.; Castex, M.-P.; Cheurfa, N.; Corradini, N.; Delaye, J.; et al. Results of Methotrexate-Etoposide-Ifosfamide Based Regimen (M-EI) in Osteosarcoma Patients Included in the French OS2006/Sarcome-09 Study. *Eur J Cancer* **2018**, 88, 57–66, doi:10.1016/j.ejca.2017.09.036.
 165. Ando, K.; Heymann, M.-F.; Stresing, V.; Mori, K.; Rédini, F.; Heymann, D. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* **2013**, 5, 591–616, doi:10.3390/cancers5020591.
 166. Bielack, S.S.; Carrle, D.; Harges, J.; Schuck, A.; Paulussen, M. Bone Tumors in Adolescents and Young Adults. *Curr Treat Options Oncol* **2008**, 9, 67–80, doi:10.1007/s11864-008-0057-1.
 167. Goorin, A.M.; Schwartzentruber, D.J.; Devidas, M.; Gebhardt, M.C.; Ayala, A.G.; Harris, M.B.; Helman, L.J.; Grier, H.E.; Link, M.P.; Pediatric Oncology Group Presurgical Chemotherapy Compared with Immediate Surgery and Adjuvant Chemotherapy for Nonmetastatic Osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21, 1574–1580, doi:10.1200/JCO.2003.08.165.
 168. Huang, Y.-J.; He, A.-N.; Sun, Y.-J.; Shen, Z.; Min, D.-L.; Yao, Y. Continuous-Infusion Ifosfamide and Doxorubicin Combination as Second-Line Chemotherapy for Recurrent or Refractory Osteosarcoma Patients in China: A Retrospective Study. *Asian Pac J Cancer Prev* **2015**, 16, 2391–2395, doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2391.
 169. Zhang, Y.; Yang, J.; Zhao, N.; Wang, C.; Kamar, S.; Zhou, Y.; He, Z.; Yang, J.; Sun, B.; Shi, X.; et al. Progress in the Chemotherapeutic Treatment of Osteosarcoma. *Oncol Lett* **2018**, 16, 6228–6237, doi:10.3892/ol.2018.9434.
 170. Mintz, M.B.; Sowers, R.; Brown, K.M.; Hilmer, S.C.; Mazza, B.; Huvos, A.G.; Meyers, P.A.; Lafleur, B.; McDonough, W.S.; Henry, M.M.; et al. An Expression Signature Classifies Chemotherapy-Resistant Pediatric Osteosarcoma. *Cancer Res* **2005**, 65, 1748–1754, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2463.
 171. Ferrari, S.; Palmerini, E. Adjuvant and Neoadjuvant Combination Chemotherapy for Osteogenic Sarcoma. *Curr Opin Oncol* **2007**, 19, 341–346, doi:10.1097/CCO.0b013e328122d73f.
 172. Yang, Z.; Yue, Z.; Ma, X.; Xu, Z. Calcium Homeostasis: A Potential Vicious Cycle of Bone Metastasis in Breast Cancers. *Front Oncol* **2020**, 10, 293, doi:10.3389/fonc.2020.00293.
 173. Wang, W.; Yang, X.; Dai, J.; Lu, Y.; Zhang, J.; Keller, E.T. Prostate Cancer Promotes a Vicious Cycle of Bone Metastasis Progression through Inducing Osteocytes to Secrete GDF15 That Stimulates Prostate Cancer Growth and Invasion. *Oncogene* **2019**, 38, 4540–4559, doi:10.1038/s41388-019-0736-3.
 174. de Groot, A.F.; Appelman-Dijkstra, N.M.; van der Burg, S.H.; Kroep, J.R. The Anti-Tumor Effect of RANKL Inhibition in Malignant Solid Tumors - A Systematic Review. *Cancer Treat Rev* **2018**, 62, 18–28, doi:10.1016/j.ctrv.2017.10.010.
 175. Gartrell, B.A.; Saad, F. Managing Bone Metastases and Reducing Skeletal Related Events in Prostate Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**, 11, 335–345, doi:10.1038/nrclinonc.2014.70.

176. Mundy, G.R. Metastasis to Bone: Causes, Consequences and Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 584–593, doi:10.1038/nrc867.
177. Lamora, A.; Talbot, J.; Mullard, M.; Brounais-Le Royer, B.; Redini, F.; Verrecchia, F. TGF- β Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J Clin Med* **2016**, *5*, E96, doi:10.3390/jcm5110096.
178. Chen, C.; Xie, L.; Ren, T.; Huang, Y.; Xu, J.; Guo, W. Immunotherapy for Osteosarcoma: Fundamental Mechanism, Rationale, and Recent Breakthroughs. *Cancer Lett* **2021**, *500*, 1–10, doi:10.1016/j.canlet.2020.12.024.
179. Mori, K.; R  dini, F.; Gouin, F.; Cherrier, B.; Heymann, D. Osteosarcoma: Current Status of Immunotherapy and Future Trends (Review). *Oncol Rep* **2006**, *15*, 693–700.
180. Yee, C.; Lizee, G.A. Personalized Therapy: Tumor Antigen Discovery for Adoptive Cellular Therapy. *Cancer J* **2017**, *23*, 144–148, doi:10.1097/PPO.0000000000000255.
181. Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P. Adoptive Cell Transfer as Personalized Immunotherapy for Human Cancer. *Science* **2015**, *348*, 62–68, doi:10.1126/science.aaa4967.
182. Moukengue, B.; Lallier, M.; Marchandet, L.; Baud’huin, M.; Verrecchia, F.; Ory, B.; Lamoureux, F. Origin and Therapies of Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 3503, doi:10.3390/cancers14143503.
183. Vrani  , S.; Be  lija, S.; Gatalica, Z. Targeting HER2 Expression in Cancer: New Drugs and New Indications. *Bosn J Basic Med Sci* **2021**, *21*, 1–4, doi:10.17305/bjbms.2020.4908.
184. Ebb, D.; Meyers, P.; Grier, H.; Bernstein, M.; Gorlick, R.; Lipshultz, S.E.; Krailo, M.; Devidas, M.; Barkauskas, D.A.; Siegal, G.P.; et al. Phase II Trial of Trastuzumab in Combination with Cytotoxic Chemotherapy for Treatment of Metastatic Osteosarcoma with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression: A Report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 2545–2551, doi:10.1200/JCO.2011.37.4546.
185. Pappo, A.S.; Vassal, G.; Crowley, J.J.; Bolejack, V.; Hogendoorn, P.C.W.; Chugh, R.; Ladanyi, M.; Grippo, J.F.; Dall, G.; Staddon, A.P.; et al. A Phase 2 Trial of R1507, a Monoclonal Antibody to the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R), in Patients with Recurrent or Refractory Rhabdomyosarcoma, Osteosarcoma, Synovial Sarcoma, and Other Soft Tissue Sarcomas: Results of a Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study. *Cancer* **2014**, *120*, 2448–2456, doi:10.1002/cncr.28728.
186. Weigel, B.; Malempati, S.; Reid, J.M.; Voss, S.D.; Cho, S.Y.; Chen, H.X.; Krailo, M.; Villaluna, D.; Adamson, P.C.; Blaney, S.M. Phase 2 Trial of Cixutumumab in Children, Adolescents, and Young Adults with Refractory Solid Tumors: A Report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* **2014**, *61*, 452–456, doi:10.1002/pbc.24605.
187. Malempati, S.; Weigel, B.; Ingle, A.M.; Ahern, C.H.; Carroll, J.M.; Roberts, C.T.; Reid, J.M.; Schmechel, S.; Voss, S.D.; Cho, S.Y.; et al. Phase I/II Trial and Pharmacokinetic Study of Cixutumumab in Pediatric Patients with Refractory Solid Tumors and Ewing Sarcoma: A Report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 256–262, doi:10.1200/JCO.2011.37.4355.
188. AsghariHanjani, N.; Vafa, M. The Role of IGF-1 in Obesity, Cardiovascular Disease, and Cancer. *Med J Islam Repub Iran* **2019**, *33*, 56, doi:10.34171/mjiri.33.56.
189. Dong, P.; Xiong, Y.; Yue, J.; Hanley, S.J.B.; Watari, H. B7H3 As a Promoter of Metastasis and Promising Therapeutic Target. *Front Oncol* **2018**, *8*, 264, doi:10.3389/fonc.2018.00264.
190. Purcell, J.W.; Tanlimco, S.G.; Hickson, J.; Fox, M.; Sho, M.; Durkin, L.; Uziel, T.; Powers, R.; Foster, K.; McGonigal, T.; et al. LRRC15 Is a Novel Mesenchymal Protein

- and Stromal Target for Antibody-Drug Conjugates. *Cancer Res* **2018**, *78*, 4059–4072, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0327.
191. Wang, Y.; Liu, Y.; Zhang, M.; Lv, L.; Zhang, X.; Zhang, P.; Zhou, Y. LRRC15 Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Modulating P65 Cytoplasmic/Nuclear Translocation. *Stem Cell Res Ther* **2018**, *9*, 65, doi:10.1186/s13287-018-0809-1.
 192. Ben-Ami, E.; Perret, R.; Huang, Y.; Courgeon, F.; Gokhale, P.C.; Laroche-Clary, A.; Eschle, B.K.; Velasco, V.; Le Loarer, F.; Algeo, M.-P.; et al. LRRC15 Targeting in Soft-Tissue Sarcomas: Biological and Clinical Implications. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, E757, doi:10.3390/cancers12030757.
 193. Demetri, G.D.; Luke, J.J.; Hollebecque, A.; Powderly, J.D.; Spira, A.I.; Subbiah, V.; Naumovski, L.; Chen, C.; Fang, H.; Lai, D.W.; et al. First-in-Human Phase I Study of ABBV-085, an Antibody-Drug Conjugate Targeting LRRC15, in Sarcomas and Other Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* **2021**, *27*, 3556–3566, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-4513.
 194. Pritchard-Jones, K.; Spendlove, I.; Wilton, C.; Whelan, J.; Weeden, S.; Lewis, I.; Hale, J.; Douglas, C.; Pagonis, C.; Campbell, B.; et al. Immune Responses to the 105AD7 Human Anti-Idiotypic Vaccine after Intensive Chemotherapy, for Osteosarcoma. *Br J Cancer* **2005**, *92*, 1358–1365, doi:10.1038/sj.bjc.6602500.
 195. Tsuda, N.; Murayama, K.; Ishida, H.; Matsunaga, K.; Komiya, S.; Itoh, K.; Yamada, A. Expression of a Newly Defined Tumor-Rejection Antigen SART3 in Musculoskeletal Tumors and Induction of HLA Class I-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes by SART3-Derived Peptides. *J Orthop Res* **2001**, *19*, 346–351, doi:10.1016/S0736-0266(00)90031-7.
 196. Tsukahara, T.; Nabeta, Y.; Kawaguchi, S.; Ikeda, H.; Sato, Y.; Shimozaawa, K.; Ida, K.; Asanuma, H.; Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; et al. Identification of Human Autologous Cytotoxic T-Lymphocyte-Defined Osteosarcoma Gene That Encodes a Transcriptional Regulator, Papillomavirus Binding Factor. *Cancer Res* **2004**, *64*, 5442–5448, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0522.
 197. Dyson, K.A.; Stover, B.D.; Grippin, A.; Mendez-Gomez, H.R.; Lagmay, J.; Mitchell, D.A.; Sayour, E.J. Emerging Trends in Immunotherapy for Pediatric Sarcomas. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 78, doi:10.1186/s13045-019-0756-z.
 198. Ma, L.; Dichwalkar, T.; Chang, J.Y.H.; Cossette, B.; Garafola, D.; Zhang, A.Q.; Fichter, M.; Wang, C.; Liang, S.; Silva, M.; et al. Enhanced CAR-T Cell Activity against Solid Tumors by Vaccine Boosting through the Chimeric Receptor. *Science* **2019**, *365*, 162–168, doi:10.1126/science.aav8692.
 199. Krishnadas, D.K.; Shusterman, S.; Bai, F.; Diller, L.; Sullivan, J.E.; Cheerva, A.C.; George, R.E.; Lucas, K.G. A Phase I Trial Combining Decitabine/Dendritic Cell Vaccine Targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for Children with Relapsed or Therapy-Refractory Neuroblastoma and Sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64*, 1251–1260, doi:10.1007/s00262-015-1731-3.
 200. Harris, M.A.; Hawkins, C.J. Recent and Ongoing Research into Metastatic Osteosarcoma Treatments. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 3817, doi:10.3390/ijms23073817.
 201. Meyers, P.A.; Schwartz, C.L.; Krailo, M.; Kleinerman, E.S.; Betcher, D.; Bernstein, M.L.; Conrad, E.; Ferguson, W.; Gebhardt, M.; Goorin, A.M.; et al. Osteosarcoma: A Randomized, Prospective Trial of the Addition of Ifosfamide and/or Muramyl Tripeptide to Cisplatin, Doxorubicin, and High-Dose Methotrexate. *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 2004–2011, doi:10.1200/JCO.2005.06.031.
 202. Meyers, P.A.; Schwartz, C.L.; Krailo, M.D.; Healey, J.H.; Bernstein, M.L.; Betcher, D.; Ferguson, W.S.; Gebhardt, M.C.; Goorin, A.M.; Harris, M.; et al. Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival--a Report

- from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 633–638, doi:10.1200/JCO.2008.14.0095.
203. Chou, A.J.; Kleinerman, E.S.; Krailo, M.D.; Chen, Z.; Betcher, D.L.; Healey, J.H.; Conrad, E.U.; Nieder, M.L.; Weiner, M.A.; Wells, R.J.; et al. Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed Metastatic Osteosarcoma: A Report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **2009**, *115*, 5339–5348, doi:10.1002/cncr.24566.
 204. Meyers, P.A. Muramyl Tripeptide-Phosphatidyl Ethanolamine Encapsulated in Liposomes (L-MTP-PE) in the Treatment of Osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol* **2020**, *1257*, 133–139, doi:10.1007/978-3-030-43032-0_11.
 205. Xiao, H.; Chen, L.; Luo, G.; Son, H.; Prectoni, J.H.; Zheng, W. Effect of the Cytokine Levels in Serum on Osteosarcoma. *Tumour Biol* **2014**, *35*, 1023–1028, doi:10.1007/s13277-013-1136-x.
 206. Burgess, M.; Tawbi, H. Immunotherapeutic Approaches to Sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **2015**, *16*, 26, doi:10.1007/s11864-015-0345-5.
 207. Stern, J.B.; Smith, K.A. Interleukin-2 Induction of T-Cell G1 Progression and c-Myb Expression. *Science* **1986**, *233*, 203–206, doi:10.1126/science.3523754.
 208. Meazza, C.; Cefalo, G.; Massimino, M.; Daolio, P.; Pastorino, U.; Scanagatta, P.; Morosi, C.; Podda, M.; Ferrari, A.; Terenziani, M.; et al. Primary Metastatic Osteosarcoma: Results of a Prospective Study in Children given Chemotherapy and Interleukin-2. *Med Oncol* **2017**, *34*, 191, doi:10.1007/s12032-017-1052-9.
 209. Schwinger, W.; Klass, V.; Benesch, M.; Lackner, H.; Dornbusch, H.J.; Sovinz, P.; Moser, A.; Schwantzer, G.; Urban, C. Feasibility of High-Dose Interleukin-2 in Heavily Pretreated Pediatric Cancer Patients. *Ann Oncol* **2005**, *16*, 1199–1206, doi:10.1093/annonc/mdi226.
 210. Rivoltini, L.; Arienti, F.; Orazi, A.; Cefalo, G.; Gasparini, M.; Gambacorti-Passerini, C.; Fossati-Bellani, F.; Parmiani, G. Phenotypic and Functional Analysis of Lymphocytes Infiltrating Paediatric Tumours, with a Characterization of the Tumour Phenotype. *Cancer Immunol Immunother* **1992**, *34*, 241–251, doi:10.1007/BF01741792.
 211. Nasr, S.; McKolanis, J.; Pais, R.; Findley, H.; Hnath, R.; Waldrep, K.; Ragab, A.H. A Phase I Study of Interleukin-2 in Children with Cancer and Evaluation of Clinical and Immunologic Status during Therapy. A Pediatric Oncology Group Study. *Cancer* **1989**, *64*, 783–788, doi:10.1002/1097-0142(19890815)64:4<783::aid-cncr2820640402>3.0.co;2-f.
 212. Tarhini, A.A.; Kirkwood, J.M. How Much of a Good Thing? What Duration for Interferon Alfa-2b Adjuvant Therapy? *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 3773–3776, doi:10.1200/JCO.2012.44.9975.
 213. Wagner, L.M.; Adams, V.R. Targeting the PD-1 Pathway in Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors. *Onco Targets Ther* **2017**, *10*, 2097–2106, doi:10.2147/OTT.S124008.
 214. Wedekind, M.F.; Wagner, L.M.; Cripe, T.P. Immunotherapy for Osteosarcoma: Where Do We Go from Here? *Pediatric Blood & Cancer* **2018**, *65*, e27227, doi:10.1002/pbc.27227.
 215. Rodig, S.J.; Gusenleitner, D.; Jackson, D.G.; Gjini, E.; Giobbie-Hurder, A.; Jin, C.; Chang, H.; Lovitch, S.B.; Horak, C.; Weber, J.S.; et al. MHC Proteins Confer Differential Sensitivity to CTLA-4 and PD-1 Blockade in Untreated Metastatic Melanoma. *Sci Transl Med* **2018**, *10*, eaar3342, doi:10.1126/scitranslmed.aar3342.
 216. Callahan, M.K.; Postow, M.A.; Wolchok, J.D. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol* **2014**, *4*, 385, doi:10.3389/fonc.2014.00385.
 217. Hingorani, P.; Maas, M.L.; Gustafson, M.P.; Dickman, P.; Adams, R.H.; Watanabe, M.; Eshun, F.; Williams, J.; Seidel, M.J.; Dietz, A.B. Increased CTLA-4(+) T Cells and

- an Increased Ratio of Monocytes with Loss of Class II (CD14(+)) HLA-DR(Lo/Neg)) Found in Aggressive Pediatric Sarcoma Patients. *J Immunother Cancer* **2015**, 3, 35, doi:10.1186/s40425-015-0082-0.
218. Wolchok, J.D.; Neyns, B.; Linette, G.; Negrier, S.; Lutzky, J.; Thomas, L.; Waterfield, W.; Schadendorf, D.; Smylie, M.; Guthrie, T.; et al. Ipilimumab Monotherapy in Patients with Pretreated Advanced Melanoma: A Randomised, Double-Blind, Multicentre, Phase 2, Dose-Ranging Study. *Lancet Oncol* **2010**, 11, 155–164, doi:10.1016/S1470-2045(09)70334-1.
 219. Merchant, M.S.; Wright, M.; Baird, K.; Wexler, L.H.; Rodriguez-Galindo, C.; Bernstein, D.; Delbrook, C.; Lodish, M.; Bishop, R.; Wolchok, J.D.; et al. Phase I Clinical Trial of Ipilimumab in Pediatric Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* **2016**, 22, 1364–1370, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0491.
 220. Roberts, S.S.; Chou, A.J.; Cheung, N.-K.V. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. *Frontiers in Oncology* **2015**, 5.
 221. Shen, J.K.; Cote, G.M.; Choy, E.; Yang, P.; Harmon, D.; Schwab, J.; Nielsen, G.P.; Chebib, I.; Ferrone, S.; Wang, X.; et al. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Osteosarcoma. *Cancer Immunol Res* **2014**, 2, 690–698, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0224.
 222. Palmerini, E.; Agostinelli, C.; Picci, P.; Pileri, S.; Marafioti, T.; Lollini, P.-L.; Scotlandi, K.; Longhi, A.; Benassi, M.S.; Ferrari, S. Tumoral Immune-Infiltrate (IF), PD-L1 Expression and Role of CD8/TIA-1 Lymphocytes in Localized Osteosarcoma Patients Treated within Protocol ISG-OS1. *Oncotarget* **2017**, 8, 111836–111846, doi:10.18632/oncotarget.22912.
 223. Nowicki, T.S.; Anderson, J.L.; Federman, N. Prospective Immunotherapies in Childhood Sarcomas: PD1/PDL1 Blockade in Combination with Tumor Vaccines. *Pediatr Res* **2016**, 79, 371–377, doi:10.1038/pr.2015.246.
 224. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune Infiltration and PD-L1 Expression in the Tumor Microenvironment Are Prognostic in Osteosarcoma. *Sci Rep* **2016**, 6, 30093, doi:10.1038/srep30093.
 225. Wang, J.; Zhang, H.; Sun, X.; Wang, X.; Ren, T.; Huang, Y.; Zhang, R.; Zheng, B.; Guo, W. Exosomal PD-L1 and N-Cadherin Predict Pulmonary Metastasis Progression for Osteosarcoma Patients. *J Nanobiotechnology* **2020**, 18, 151, doi:10.1186/s12951-020-00710-6.
 226. Lussier, D.M.; O'Neill, L.; Nieves, L.M.; McAfee, M.S.; Holechek, S.A.; Collins, A.W.; Dickman, P.; Jacobsen, J.; Hingorani, P.; Blattman, J.N. Enhanced T-Cell Immunity to Osteosarcoma through Antibody Blockade of PD-1/PD-L1 Interactions. *J Immunother* **2015**, 38, 96–106, doi:10.1097/CJI.0000000000000065.
 227. Thanindratarn, P.; Dean, D.C.; Nelson, S.D.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Advances in Immune Checkpoint Inhibitors for Bone Sarcoma Therapy. *J Bone Oncol* **2019**, 15, 100221, doi:10.1016/j.jbo.2019.100221.
 228. Harrison, D.J.; Geller, D.S.; Gill, J.D.; Lewis, V.O.; Gorlick, R. Current and Future Therapeutic Approaches for Osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **2018**, 18, 39–50, doi:10.1080/14737140.2018.1413939.
 229. Tawbi, H.A.; Burgess, M.; Bolejack, V.; Van Tine, B.A.; Schuetze, S.M.; Hu, J.; D'Angelo, S.; Attia, S.; Riedel, R.F.; Priebe, D.A.; et al. Pembrolizumab in Advanced Soft-Tissue Sarcoma and Bone Sarcoma (SARC028): A Multicentre, Two-Cohort, Single-Arm, Open-Label, Phase 2 Trial. *The Lancet Oncology* **2017**, 18, 1493–1501, doi:10.1016/S1470-2045(17)30624-1.

230. Le Cesne, A.; Marec-Berard, P.; Blay, J.-Y.; Gaspar, N.; Bertucci, F.; Penel, N.; Bompas, E.; Cousin, S.; Toulmonde, M.; Bessede, A.; et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) Targeting in Patients with Advanced Osteosarcomas: Results from the PEMBROSARC Study. *European Journal of Cancer* **2019**, *119*, 151–157, doi:10.1016/j.ejca.2019.07.018.
231. Boye, K.; Longhi, A.; Guren, T.; Lorenz, S.; Næss, S.; Pierini, M.; Taksdal, I.; Lobmaier, I.; Cesari, M.; Paioli, A.; et al. Pembrolizumab in Advanced Osteosarcoma: Results of a Single-Arm, Open-Label, Phase 2 Trial. *Cancer Immunol Immunother* **2021**, *70*, 2617–2624, doi:10.1007/s00262-021-02876-w.
232. Bishop, M.W.; Kaste, S.C.; Sykes, A.; Pan, H.; Dela Cruz, F.S.; Whittle, S.; Mascarenhas, L.; Thomas, P.G.; Youngblood, B.; Harman, J.L.; et al. OSTPDL1: A Phase II Study of Avelumab, a Monoclonal Antibody Targeting Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) in Adolescent and Young Adult Patients with Recurrent or Progressive Osteosarcoma. *JCO* **2020**, *38*, 10521–10521, doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.10521.
233. Mesiano, G.; Grignani, G.; Fiorino, E.; Leuci, V.; Rotolo, R.; D'Ambrosio, L.; Salfi, C.; Gammaitoni, L.; Giraudo, L.; Pisacane, A.; et al. Cytokine Induced Killer Cells Are Effective against Sarcoma Cancer Stem Cells Spared by Chemotherapy and Target Therapy. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1465161, doi:10.1080/2162402X.2018.1465161.
234. Sterner, R.C.; Sterner, R.M. CAR-T Cell Therapy: Current Limitations and Potential Strategies. *Blood Cancer J* **2021**, *11*, 69, doi:10.1038/s41408-021-00459-7.
235. Hong, M.; Clubb, J.D.; Chen, Y.Y. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 473–488, doi:10.1016/j.ccell.2020.07.005.
236. Ahmed, N.; Brawley, V.S.; Hegde, M.; Robertson, C.; Ghazi, A.; Gerken, C.; Liu, E.; Dakhova, O.; Ashoori, A.; Corder, A.; et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* **2015**, *33*, 1688–1696, doi:10.1200/JCO.2014.58.0225.
237. Morgan, R.A.; Yang, J.C.; Kitano, M.; Dudley, M.E.; Laurencot, C.M.; Rosenberg, S.A. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced with a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol Ther* **2010**, *18*, 843–851, doi:10.1038/mt.2010.24.
238. Long, A.H.; Highfill, S.L.; Cui, Y.; Smith, J.P.; Walker, A.J.; Ramakrishna, S.; El-Etriby, R.; Galli, S.; Tsokos, M.G.; Orentas, R.J.; et al. Reduction of MDSCs with All-Trans Retinoic Acid Improves CAR Therapy Efficacy for Sarcomas. *Cancer Immunol Res* **2016**, *4*, 869–880, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0230.
239. Steffin, D.H.M.; Heslop, H.E. Epigenetic Inhibition Puts Target Antigen in the Crosshairs of CAR T Cells. *Mol Ther* **2019**, *27*, 900–901, doi:10.1016/j.ymthe.2019.04.007.
240. Roth, M.; Linkowski, M.; Tarim, J.; Piperdi, S.; Sowers, R.; Geller, D.; Gill, J.; Gorlick, R. Ganglioside GD2 as a Therapeutic Target for Antibody-Mediated Therapy in Patients with Osteosarcoma. *Cancer* **2014**, *120*, 548–554, doi:10.1002/cncr.28461.
241. Tian, Z.; Niu, X.; Yao, W. Receptor Tyrosine Kinases in Osteosarcoma Treatment: Which Is the Key Target? *Front Oncol* **2020**, *10*, 1642, doi:10.3389/fonc.2020.01642.
242. Jiao, Q.; Bi, L.; Ren, Y.; Song, S.; Wang, Q.; Wang, Y.-S. Advances in Studies of Tyrosine Kinase Inhibitors and Their Acquired Resistance. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 36, doi:10.1186/s12943-018-0801-5.
243. Knösel, T.; Kampmann, E.; Kirchner, T.; Altendorf-Hofmann, A. [Tyrosine kinases in soft tissue tumors]. *Pathologe* **2014**, *35 Suppl 2*, 198–201, doi:10.1007/s00292-014-1958-3.

244. Mijji, L.N.O.; Petrilli, A.S.; Di Cesare, S.; Odashiro, A.N.; Burnier, M.N.; de Toledo, S.R.; Garcia, R.J.; Alves, M.T.S. C-Kit Expression in Human Osteosarcoma and in Vitro Assays. *Int J Clin Exp Pathol* **2011**, *4*, 775–781.
245. Luo, J.; Xia, Y.; Yin, Y.; Luo, J.; Liu, M.; Zhang, H.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Yang, L.; Kong, L. ATF4 Destabilizes RET through Nonclassical GRP78 Inhibition to Enhance Chemosensitivity to Bortezomib in Human Osteosarcoma. *Theranostics* **2019**, *9*, 6334–6353, doi:10.7150/thno.36818.
246. Kim, M.; Jung, J.-Y.; Choi, S.; Lee, H.; Morales, L.D.; Koh, J.-T.; Kim, S.H.; Choi, Y.-D.; Choi, C.; Slaga, T.J.; et al. GFRA1 Promotes Cisplatin-Induced Chemoresistance in Osteosarcoma by Inducing Autophagy. *Autophagy* **2017**, *13*, 149–168, doi:10.1080/15548627.2016.1239676.
247. Fernanda Amary, M.; Ye, H.; Berisha, F.; Khatri, B.; Forbes, G.; Lehovskiy, K.; Frezza, A.M.; Behjati, S.; Tarpey, P.; Pillay, N.; et al. Fibroblastic Growth Factor Receptor 1 Amplification in Osteosarcoma Is Associated with Poor Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy. *Cancer Med* **2014**, *3*, 980–987, doi:10.1002/cam4.268.
248. Weekes, D.; Kashima, T.G.; Zanduetta, C.; Perurena, N.; Thomas, D.P.; Sunter, A.; Vuillier, C.; Bozec, A.; El-Emir, E.; Miletich, I.; et al. Regulation of Osteosarcoma Cell Lung Metastasis by the C-Fos/AP-1 Target FGFR1. *Oncogene* **2016**, *35*, 2852–2861, doi:10.1038/onc.2015.344.
249. Takagi, S.; Takemoto, A.; Takami, M.; Oh-Hara, T.; Fujita, N. Platelets Promote Osteosarcoma Cell Growth through Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Akt Signaling Axis. *Cancer Sci* **2014**, *105*, 983–988, doi:10.1111/cas.12464.
250. Zhang, D.; Cui, G.; Sun, C.; Lei, L.; Lei, L.; Williamson, R.A.; Wang, Y.; Zhang, J.; Chen, P.; Wang, A.; et al. Hypoxia Promotes Osteosarcoma Cell Proliferation and Migration through Enhancing Platelet-Derived Growth Factor-BB/Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Axis. *Biochem Biophys Res Commun* **2019**, *512*, 360–366, doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.040.
251. Wang, Y.-H.; Han, X.-D.; Qiu, Y.; Xiong, J.; Yu, Y.; Wang, B.; Zhu, Z.-Z.; Qian, B.-P.; Chen, Y.-X.; Wang, S.-F.; et al. Increased Expression of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Is Correlated with Tumor Metastasis and Prognosis in Patients with Osteosarcoma. *J Surg Oncol* **2012**, *105*, 235–243, doi:10.1002/jso.22077.
252. Patané, S.; Avnet, S.; Coltella, N.; Costa, B.; Sponza, S.; Olivero, M.; Vigna, E.; Naldini, L.; Baldini, N.; Ferracini, R.; et al. MET Overexpression Turns Human Primary Osteoblasts into Osteosarcomas. *Cancer Res* **2006**, *66*, 4750–4757, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4422.
253. Chen, Y.; Huang, W.; Sun, W.; Zheng, B.; Wang, C.; Luo, Z.; Wang, J.; Yan, W. LncRNA MALAT1 Promotes Cancer Metastasis in Osteosarcoma via Activation of the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *51*, 1313–1326, doi:10.1159/000495550.
254. Ségaliny, A.I.; Tellez-Gabriel, M.; Heymann, M.-F.; Heymann, D. Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers. *J Bone Oncol* **2015**, *4*, 1–12, doi:10.1016/j.jbo.2015.01.001.
255. Navid, F.; Santana, V.M.; Neel, M.; McCarville, M.B.; Shulkin, B.L.; Wu, J.; Billups, C.A.; Mao, S.; Daryani, V.M.; Stewart, C.F.; et al. A Phase II Trial Evaluating the Feasibility of Adding Bevacizumab to Standard Osteosarcoma Therapy. *Int J Cancer* **2017**, *141*, 1469–1477, doi:10.1002/ijc.30841.
256. Mansky, P.J.; Liewehr, D.J.; Steinberg, S.M.; Chrousos, G.P.; Avila, N.A.; Long, L.; Bernstein, D.; Mackall, C.L.; Hawkins, D.S.; Helman, L.J. Treatment of Metastatic Osteosarcoma with the Somatostatin Analog OncoLar: Significant Reduction of Insulin-

- like Growth Factor-1 Serum Levels. *J Pediatr Hematol Oncol* **2002**, 24, 440–446, doi:10.1097/00043426-200208000-00007.
257. Anderson, P.M.; Bielack, S.S.; Gorlick, R.G.; Skubitz, K.; Daw, N.C.; Herzog, C.E.; Monge, O.R.; Lassaletta, A.; Boldrini, E.; Pápai, Z.; et al. A Phase II Study of Clinical Activity of SCH 717454 (Robatumumab) in Patients with Relapsed Osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* **2016**, 63, 1761–1770, doi:10.1002/pbc.26087.
 258. Xie, L.; Xu, J.; Sun, X.; Tang, X.; Yan, T.; Yang, R.; Guo, W. Apatinib for Advanced Osteosarcoma after Failure of Standard Multimodal Therapy: An Open Label Phase II Clinical Trial. *Oncologist* **2019**, 24, e542–e550, doi:10.1634/theoncologist.2018-0542.
 259. Fleuren, E.D.G.; Versleijen-Jonkers, Y.M.H.; Boerman, O.C.; van der Graaf, W.T.A. Targeting Receptor Tyrosine Kinases in Osteosarcoma and Ewing Sarcoma: Current Hurdles and Future Perspectives. *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1845, 266–276, doi:10.1016/j.bbcan.2014.02.005.
 260. Gobin, B.; Moriceau, G.; Ory, B.; Charrier, C.; Brion, R.; Blanchard, F.; Redini, F.; Heymann, D. Imatinib Mesylate Exerts Anti-Proliferative Effects on Osteosarcoma Cells and Inhibits the Tumour Growth in Immunocompetent Murine Models. *PLoS ONE* **2014**, 9, e90795, doi:10.1371/journal.pone.0090795.
 261. Shaikh, A.B.; Li, F.; Li, M.; He, B.; He, X.; Chen, G.; Guo, B.; Li, D.; Jiang, F.; Dang, L.; et al. Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Int J Mol Sci* **2016**, 17, 506, doi:10.3390/ijms17040506.
 262. Schuetze, S.M.; Wathen, J.K.; Lucas, D.R.; Choy, E.; Samuels, B.L.; Staddon, A.P.; Ganjoo, K.N.; von Mehren, M.; Chow, W.A.; Loeb, D.M.; et al. SARC009: Phase 2 Study of Dasatinib in Patients with Previously Treated, High-Grade, Advanced Sarcoma. *Cancer* **2016**, 122, 868–874, doi:10.1002/cncr.29858.
 263. Aplenc, R.; Blaney, S.M.; Strauss, L.C.; Balis, F.M.; Shusterman, S.; Ingle, A.M.; Agrawal, S.; Sun, J.; Wright, J.J.; Adamson, P.C. Pediatric Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Dasatinib: A Report from the Children’s Oncology Group Phase I Consortium. *J Clin Oncol* **2011**, 29, 839–844, doi:10.1200/JCO.2010.30.7231.
 264. Hingorani, P.; Zhang, W.; Gorlick, R.; Kolb, E.A. Inhibition of Src Phosphorylation Alters Metastatic Potential of Osteosarcoma in Vitro but Not in Vivo. *Clin Cancer Res* **2009**, 15, 3416–3422, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1657.
 265. Fox, E.; Aplenc, R.; Bagatell, R.; Chuk, M.K.; Dombi, E.; Goodspeed, W.; Goodwin, A.; Kromplewski, M.; Jayaprakash, N.; Marotti, M.; et al. A Phase 1 Trial and Pharmacokinetic Study of Cediranib, an Orally Bioavailable Pan-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor, in Children and Adolescents with Refractory Solid Tumors. *J Clin Oncol* **2010**, 28, 5174–5181, doi:10.1200/JCO.2010.30.9674.
 266. Davis, L.E.; Bolejack, V.; Ryan, C.W.; Ganjoo, K.N.; Loggers, E.T.; Chawla, S.; Agulnik, M.; Livingston, M.B.; Reed, D.; Keedy, V.; et al. Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma. *J Clin Oncol* **2019**, 37, 1424–1431, doi:10.1200/JCO.18.02374.
 267. Duffaud, F.; Mir, O.; Boudou-Rouquette, P.; Piperno-Neumann, S.; Penel, N.; Bompas, E.; Delcambre, C.; Kalbacher, E.; Italiano, A.; Collard, O.; et al. Efficacy and Safety of Regorafenib in Adult Patients with Metastatic Osteosarcoma: A Non-Comparative, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Study. *Lancet Oncol* **2019**, 20, 120–133, doi:10.1016/S1470-2045(18)30742-3.
 268. Grignani, G.; Palmerini, E.; Ferraresi, V.; D’Ambrosio, L.; Bertulli, R.; Asaftei, S.D.; Tamburini, A.; Pignochino, Y.; Sangiolo, D.; Marchesi, E.; et al. Sorafenib and Everolimus for Patients with Unresectable High-Grade Osteosarcoma Progressing after Standard Treatment: A Non-Randomised Phase 2 Clinical Trial. *Lancet Oncol* **2015**, 16, 98–107, doi:10.1016/S1470-2045(14)71136-2.

269. Italiano, A.; Mir, O.; Mathoulin-Pelissier, S.; Penel, N.; Piperno-Neumann, S.; Bompas, E.; Chevreau, C.; Duffaud, F.; Entz-Werlé, N.; Saada, E.; et al. Cabozantinib in Patients with Advanced Ewing Sarcoma or Osteosarcoma (CABONE): A Multicentre, Single-Arm, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 446–455, doi:10.1016/S1470-2045(19)30825-3.
270. Grignani, G.; Palmerini, E.; Dileo, P.; Asaftei, S.D.; D'Ambrosio, L.; Pignochino, Y.; Mercuri, M.; Picci, P.; Fagioli, F.; Casali, P.G.; et al. A Phase II Trial of Sorafenib in Relapsed and Unresectable High-Grade Osteosarcoma after Failure of Standard Multimodal Therapy: An Italian Sarcoma Group Study. *Ann Oncol* **2012**, *23*, 508–516, doi:10.1093/annonc/mdr151.
271. Gaspar, N.; Campbell-Hewson, Q.; Gallego Melcon, S.; Locatelli, F.; Venkatramani, R.; Hecker-Nolting, S.; Gambart, M.; Bautista, F.; Thebaud, E.; Aerts, I.; et al. Phase I/II Study of Single-Agent Lenvatinib in Children and Adolescents with Refractory or Relapsed Solid Malignancies and Young Adults with Osteosarcoma (ITCC-050)☆. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100250, doi:10.1016/j.esmoop.2021.100250.
272. Umeda, K.; Kato, I.; Saida, S.; Okamoto, T.; Adachi, S. Pazopanib for Second Recurrence of Osteosarcoma in Pediatric Patients. *Pediatr Int* **2017**, *59*, 937–938, doi:10.1111/ped.13307.
273. Hu, C.; Deng, Z.; Zhang, Y.; Yan, L.; Cai, L.; Lei, J.; Xie, Y. The Prognostic Significance of Src and P-Src Expression in Patients with Osteosarcoma. *Med Sci Monit* **2015**, *21*, 638–645, doi:10.12659/MSM.892803.
274. Baird, K.; Glod, J.; Steinberg, S.M.; Reinke, D.; Pressey, J.G.; Mascarenhas, L.; Federman, N.; Marina, N.; Chawla, S.; Lagmay, J.P.; et al. Results of a Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Phase 2.5 Study of Saracatinib (AZD0530), in Patients with Recurrent Osteosarcoma Localized to the Lung. *Sarcoma* **2020**, *2020*, 7935475, doi:10.1155/2020/7935475.
275. Dancy, J.E. Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. *Expert Opin Investig Drugs* **2005**, *14*, 313–328, doi:10.1517/13543784.14.3.313.
276. Shaw, R.J.; Cantley, L.C. Ras, PI(3)K and MTOR Signalling Controls Tumour Cell Growth. *Nature* **2006**, *441*, 424–430, doi:10.1038/nature04869.
277. Zhou, Q.; Deng, Z.; Zhu, Y.; Long, H.; Zhang, S.; Zhao, J. MTOR/P70S6K Signal Transduction Pathway Contributes to Osteosarcoma Progression and Patients' Prognosis. *Med Oncol* **2010**, *27*, 1239–1245, doi:10.1007/s12032-009-9365-y.
278. Chawla, S.P.; Staddon, A.P.; Baker, L.H.; Schuetze, S.M.; Tolcher, A.W.; D'Amato, G.Z.; Blay, J.-Y.; Mita, M.M.; Sankhala, K.K.; Berk, L.; et al. Phase II Study of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Ridaforolimus in Patients with Advanced Bone and Soft Tissue Sarcomas. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 78–84, doi:10.1200/JCO.2011.35.6329.
279. Demetri, G.D.; Chawla, S.P.; Ray-Coquard, I.; Le Cesne, A.; Staddon, A.P.; Milhem, M.M.; Penel, N.; Riedel, R.F.; Bui-Nguyen, B.; Cranmer, L.D.; et al. Results of an International Randomized Phase III Trial of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Ridaforolimus versus Placebo to Control Metastatic Sarcomas in Patients after Benefit from Prior Chemotherapy. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 2485–2492, doi:10.1200/JCO.2012.45.5766.
280. Corral, L.G.; Muller, G.W.; Moreira, A.L.; Chen, Y.; Wu, M.; Stirling, D.; Kaplan, G. Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibitory Activity. *Mol Med* **1996**, *2*, 506–515.
281. Lamoureux, F.; Richard, P.; Wittrant, Y.; Battaglia, S.; Pilet, P.; Trichet, V.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Pitard, B.; Heymann, D.; et al. Therapeutic Relevance of Osteoprotegerin Gene Therapy in Osteosarcoma: Blockade of the Vicious Cycle between

- Tumor Cell Proliferation and Bone Resorption. *Cancer Res* **2007**, *67*, 7308–7318, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4130.
282. Heymann, D. Anti-RANKL Therapy for Bone Tumours: Basic, Pre-Clinical and Clinical Evidences. *J Bone Oncol* **2012**, *1*, 2–11, doi:10.1016/j.jbo.2012.03.001.
 283. Kupas, V.; Weishaupt, C.; Siepmann, D.; Kaserer, M.-L.; Eickelmann, M.; Metze, D.; Luger, T.A.; Beissert, S.; Loser, K. RANK Is Expressed in Metastatic Melanoma and Highly Upregulated on Melanoma-Initiating Cells. *J Invest Dermatol* **2011**, *131*, 944–955, doi:10.1038/jid.2010.377.
 284. Stopeck, A.T.; Lipton, A.; Body, J.-J.; Steger, G.G.; Tonkin, K.; de Boer, R.H.; Lichinitser, M.; Fujiwara, Y.; Yardley, D.A.; Viniegra, M.; et al. Denosumab Compared with Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients with Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 5132–5139, doi:10.1200/JCO.2010.29.7101.
 285. Clemons, M.; Gelmon, K.A.; Pritchard, K.I.; Paterson, A.H.G. Bone-Targeted Agents and Skeletal-Related Events in Breast Cancer Patients with Bone Metastases: The State of the Art. *Curr Oncol* **2012**, *19*, 259–268, doi:10.3747/co.19.1011.
 286. Piperno-Neumann, S.; Le Deley, M.-C.; Rédini, F.; Pacquement, H.; Marec-Bérard, P.; Petit, P.; Brisse, H.; Lervat, C.; Gentet, J.-C.; Entz-Werlé, N.; et al. Zoledronate in Combination with Chemotherapy and Surgery to Treat Osteosarcoma (OS2006): A Randomised, Multicentre, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2016**, *17*, 1070–1080, doi:10.1016/S1470-2045(16)30096-1.
 287. Lewis, I.J.; Nooij, M.A.; Whelan, J.; Sydes, M.R.; Grimer, R.; Hogendoorn, P.C.W.; Memon, M.A.; Weeden, S.; Uscinska, B.M.; van Glabbeke, M.; et al. Improvement in Histologic Response but Not Survival in Osteosarcoma Patients Treated with Intensified Chemotherapy: A Randomized Phase III Trial of the European Osteosarcoma Intergroup. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 112–128, doi:10.1093/jnci/djk015.
 288. Gokani, S.; Bhatt, L.K. Bromodomains: A Novel Target for the Anticancer Therapy. *European Journal of Pharmacology* **2021**, 174523, doi:10.1016/j.ejphar.2021.174523.
 289. Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P.A. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27–36, doi:10.1093/carcin/bgp220.
 290. Reddy, S.A. Romidepsin for the Treatment of Relapsed/Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma (Mycosis Fungoides/Sézary Syndrome): Use in a Community Setting. *Crit Rev Oncol Hematol* **2016**, *106*, 99–107, doi:10.1016/j.critrevonc.2016.07.001.
 291. Shimony, S.; Horowitz, N.; Ribakovsky, E.; Rozovski, U.; Avigdor, A.; Zloto, K.; Berger, T.; Avivi, I.; Perry, C.; Abadi, U.; et al. Romidepsin Treatment for Relapsed or Refractory Peripheral and Cutaneous T-Cell Lymphoma: Real-Life Data from a National Multicenter Observational Study. *Hematol Oncol* **2019**, *37*, 569–577, doi:10.1002/hon.2691.
 292. Duvic, M.; Vu, J. Vorinostat in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Drugs Today (Barc)* **2007**, *43*, 585–599, doi:10.1358/dot.2007.43.9.1112980.
 293. Mei, M.; Aldoss, I.; Marcucci, G.; Pullarkat, V. Hypomethylating Agents in Combination with Venetoclax for Acute Myeloid Leukemia: Update on Clinical Trial Data and Practical Considerations for Use. *Am J Hematol* **2019**, *94*, 358–362, doi:10.1002/ajh.25369.
 294. Bohl, S.R.; Bullinger, L.; Rücker, F.G. Epigenetic Therapy: Azacytidine and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Rev Hematol* **2018**, *11*, 361–371, doi:10.1080/17474086.2018.1453802.
 295. Muddassir, M.; Soni, K.; Sangani, C.B.; Alarifi, A.; Afzal, M.; Abduh, N.A.Y.; Duan, Y.; Bhadja, P. Bromodomain and BET Family Proteins as Epigenetic Targets in Cancer

- Therapy: Their Degradation, Present Drugs, and Possible PROTACs. *RSC Adv* **2020**, *11*, 612–636, doi:10.1039/d0ra07971e.
296. The Bromodomain: A Conserved Sequence Found in Human, Drosophila and Yeast Proteins - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1350857/> (accessed on 29 July 2022).
 297. Ferri, E.; Petosa, C.; McKenna, C.E. Bromodomains: Structure, Function and Pharmacology of Inhibition. *Biochemical Pharmacology* **2016**, *106*, 1–18, doi:10.1016/j.bcp.2015.12.005.
 298. White, M.E.; Fenger, J.M.; Carson, W.E. Emerging Roles of and Therapeutic Strategies Targeting BRD4 in Cancer. *Cell. Immunol.* **2019**, *337*, 48–53, doi:10.1016/j.cellimm.2019.02.001.
 299. Pérez-Salvia, M.; Esteller, M. Bromodomain Inhibitors and Cancer Therapy: From Structures to Applications. *Epigenetics* **2017**, *12*, 323–339, doi:10.1080/15592294.2016.1265710.
 300. Delmore, J.E.; Issa, G.C.; Lemieux, M.E.; Rahl, P.B.; Shi, J.; Jacobs, H.M.; Kastiris, E.; Gilpatrick, T.; Paranal, R.M.; Qi, J.; et al. BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc. *Cell* **2011**, *146*, 904–917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017.
 301. Sarnik, J.; Poplawski, T.; Tokarz, P. BET Proteins as Attractive Targets for Cancer Therapeutics. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 11102, doi:10.3390/ijms222011102.
 302. Stathis, A.; Bertoni, F. BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment. *Cancer Discov* **2018**, *8*, 24–36, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0605.
 303. Hajmirza, A.; Emadali, A.; Gauthier, A.; Casasnovas, O.; Gressin, R.; Callanan, M.B. BET Family Protein BRD4: An Emerging Actor in NFκB Signaling in Inflammation and Cancer. *Biomedicines* **2018**, *6*, E16, doi:10.3390/biomedicines6010016.
 304. Jiang, Y.W.; Veschambre, P.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Conaway, J.W.; Conaway, R.C.; Kornberg, R.D. Mammalian Mediator of Transcriptional Regulation and Its Possible Role as an End-Point of Signal Transduction Pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 8538–8543, doi:10.1073/pnas.95.15.8538.
 305. Denis, G.V.; McComb, M.E.; Faller, D.V.; Sinha, A.; Romesser, P.B.; Costello, C.E. Identification of Transcription Complexes That Contain the Double Bromodomain Protein Brd2 and Chromatin Remodeling Machines. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 502–511, doi:10.1021/pr050430u.
 306. Sinha, A.; Faller, D.V.; Denis, G.V. Bromodomain Analysis of Brd2-Dependent Transcriptional Activation of Cyclin A. *Biochem J* **2005**, *387*, 257–269, doi:10.1042/BJ20041793.
 307. Denis, G.V.; Vaziri, C.; Guo, N.; Faller, D.V. RING3 Kinase Transactivates Promoters of Cell Cycle Regulatory Genes through E2F. *Cell Growth Differ* **2000**, *11*, 417–424.
 308. LeRoy, G.; Rickards, B.; Flint, S.J. The Double Bromodomain Proteins Brd2 and Brd3 Couple Histone Acetylation to Transcription. *Mol Cell* **2008**, *30*, 51–60, doi:10.1016/j.molcel.2008.01.018.
 309. Dai, J.; Zhou, S.; Ge, Q.; Qin, J.; Li, J.; Ju, H.; Cao, Y.; Zheng, M.; Li, C.; Gao, X.; et al. Recruitment of Brd3 and Brd4 to Acetylated Chromatin Is Essential for Proinflammatory Cytokine-Induced Matrix-Degrading Enzyme Expression. *J Orthop Surg Res* **2019**, *14*, 59, doi:10.1186/s13018-019-1091-3.
 310. Lamonica, J.M.; Deng, W.; Kadauke, S.; Campbell, A.E.; Gamsjaeger, R.; Wang, H.; Cheng, Y.; Billin, A.N.; Hardison, R.C.; Mackay, J.P.; et al. Bromodomain Protein Brd3 Associates with Acetylated GATA1 to Promote Its Chromatin Occupancy at Erythroid

- Target Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, E159-168, doi:10.1073/pnas.1102140108.
311. Belkina, A.C.; Denis, G.V. BET Domain Co-Regulators in Obesity, Inflammation and Cancer. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 465–477, doi:10.1038/nrc3256.
 312. Floyd, S.R.; Pacold, M.E.; Huang, Q.; Clarke, S.M.; Lam, F.C.; Cannell, I.G.; Bryson, B.D.; Rameseder, J.; Lee, M.J.; Blake, E.J.; et al. The Bromodomain Protein Brd4 Insulates Chromatin from DNA Damage Signalling. *Nature* **2013**, *498*, 246–250, doi:10.1038/nature12147.
 313. Jang, M.K.; Mochizuki, K.; Zhou, M.; Jeong, H.-S.; Brady, J.N.; Ozato, K. The Bromodomain Protein Brd4 Is a Positive Regulatory Component of P-TEFb and Stimulates RNA Polymerase II-Dependent Transcription. *Mol Cell* **2005**, *19*, 523–534, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.027.
 314. Yang, Z.; Yik, J.H.N.; Chen, R.; He, N.; Jang, M.K.; Ozato, K.; Zhou, Q. Recruitment of P-TEFb for Stimulation of Transcriptional Elongation by the Bromodomain Protein Brd4. *Mol Cell* **2005**, *19*, 535–545, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.029.
 315. Dey, A.; Nishiyama, A.; Karpova, T.; McNally, J.; Ozato, K. Brd4 Marks Select Genes on Mitotic Chromatin and Directs Postmitotic Transcription. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 4899–4909, doi:10.1091/mbc.e09-05-0380.
 316. Prinjha, R.K.; Witherington, J.; Lee, K. Place Your BETs: The Therapeutic Potential of Bromodomains. *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, *33*, 146–153, doi:10.1016/j.tips.2011.12.002.
 317. Alqahtani, A.; Choucair, K.; Ashraf, M.; Hammouda, D.M.; Alloghbi, A.; Khan, T.; Senzer, N.; Nemunaitis, J. Bromodomain and Extra-Terminal Motif Inhibitors: A Review of Preclinical and Clinical Advances in Cancer Therapy. *Future Sci OA* **2019**, *5*, doi:10.4155/fsoa-2018-0115.
 318. Muller, S.; Filippakopoulos, P.; Knapp, S. Bromodomains as Therapeutic Targets. *Expert Rev Mol Med* **2011**, *13*, e29, doi:10.1017/S1462399411001992.
 319. Lee, J.-K.; Louzada, S.; An, Y.; Kim, S.Y.; Kim, S.; Youk, J.; Park, S.; Koo, S.H.; Keam, B.; Jeon, Y.K.; et al. Complex Chromosomal Rearrangements by Single Catastrophic Pathogenesis in NUT Midline Carcinoma. *Ann Oncol* **2017**, *28*, 890–897, doi:10.1093/annonc/mdw686.
 320. French, C.A.; Ramirez, C.L.; Kolmakova, J.; Hickman, T.T.; Cameron, M.J.; Thyne, M.E.; Kutok, J.L.; Toretsky, J.A.; Tadavarthi, A.K.; Kees, U.R.; et al. BRD-NUT Oncoproteins: A Family of Closely Related Nuclear Proteins That Block Epithelial Differentiation and Maintain the Growth of Carcinoma Cells. *Oncogene* **2008**, *27*, 2237–2242, doi:10.1038/sj.onc.1210852.
 321. Grayson, A.R.; Walsh, E.M.; Cameron, M.J.; Godec, J.; Ashworth, T.; Ambrose, J.M.; Aserlind, A.B.; Wang, H.; Evan, G.; Kluk, M.J.; et al. MYC, a Downstream Target of BRD-NUT, Is Necessary and Sufficient for the Blockade of Differentiation in NUT Midline Carcinoma. *Oncogene* **2014**, *33*, 1736–1742, doi:10.1038/onc.2013.126.
 322. Wang, R.; You, J. Mechanistic Analysis of the Role of Bromodomain-Containing Protein 4 (BRD4) in BRD4-NUT Oncoprotein-Induced Transcriptional Activation. *J Biol Chem* **2015**, *290*, 2744–2758, doi:10.1074/jbc.M114.600759.
 323. Reynoird, N. Dérégulations épigénétiques induites par la protéine fusion BRD4-NUT et caractérisation de la protéine NUT au cours de la spermatogenèse et dans les cancers. 272.
 324. Wang, R.; Liu, W.; Helfer, C.M.; Bradner, J.E.; Hornick, J.L.; Janicki, S.M.; French, C.A.; You, J. Activation of SOX2 Expression by BRD4-NUT Oncogenic Fusion Drives Neoplastic Transformation in NUT Midline Carcinoma. *Cancer Res* **2014**, *74*, 3332–3343, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2658.

325. Bradner, J.E.; Hnisz, D.; Young, R.A. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 629–643, doi:10.1016/j.cell.2016.12.013.
326. Lori, L.; Pasquo, A.; Lori, C.; Petrosino, M.; Chiaraluce, R.; Tallant, C.; Knapp, S.; Consalvi, V. Effect of BET Missense Mutations on Bromodomain Function, Inhibitor Binding and Stability. *PLoS One* **2016**, *11*, e0159180, doi:10.1371/journal.pone.0159180.
327. Yang, L.; Zhang, Y.; Shan, W.; Hu, Z.; Yuan, J.; Pi, J.; Wang, Y.; Fan, L.; Tang, Z.; Li, C.; et al. Repression of BET Activity Sensitizes Homologous Recombination-Proficient Cancers to PARP Inhibition. *Sci Transl Med* **2017**, *9*, eaal1645, doi:10.1126/scitranslmed.aal1645.
328. Pastori, C.; Daniel, M.; Penas, C.; Volmar, C.-H.; Johnstone, A.L.; Brothers, S.P.; Graham, R.M.; Allen, B.; Sarkaria, J.N.; Komotar, R.J.; et al. BET Bromodomain Proteins Are Required for Glioblastoma Cell Proliferation. *Epigenetics* **2014**, *9*, 611–620, doi:10.4161/epi.27906.
329. Klein, K.; Kabala, P.A.; Grabiec, A.M.; Gay, R.E.; Kolling, C.; Lin, L.-L.; Gay, S.; Tak, P.P.; Prinjha, R.K.; Ospelt, C.; et al. The Bromodomain Protein Inhibitor I-BET151 Suppresses Expression of Inflammatory Genes and Matrix Degrading Enzymes in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Ann Rheum Dis* **2016**, *75*, 422–429, doi:10.1136/annrheumdis-2014-205809.
330. Lee, D.H.; Qi, J.; Bradner, J.E.; Said, J.W.; Doan, N.B.; Forscher, C.; Yang, H.; Koeffler, H.P. Synergistic Effect of JQ1 and Rapamycin for Treatment of Human Osteosarcoma. *Int J Cancer* **2015**, *136*, 2055–2064, doi:10.1002/ijc.29269.
331. Lamoureux, F.; Baud'huin, M.; Rodriguez Calleja, L.; Jacques, C.; Berreur, M.; Rédini, F.; Lecanda, F.; Bradner, J.E.; Heymann, D.; Ory, B. Selective Inhibition of BET Bromodomain Epigenetic Signalling Interferes with the Bone-Associated Tumour Vicious Cycle. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3511, doi:10.1038/ncomms4511.
332. Baker, E.K.; Taylor, S.; Gupte, A.; Sharp, P.P.; Walia, M.; Walsh, N.C.; Zannettino, A.C.; Chalk, A.M.; Burns, C.J.; Walkley, C.R. BET Inhibitors Induce Apoptosis through a MYC Independent Mechanism and Synergise with CDK Inhibitors to Kill Osteosarcoma Cells. *Sci Rep* **2015**, *5*, 10120, doi:10.1038/srep10120.
333. Chen, H.; Liu, H.; Qing, G. Targeting Oncogenic Myc as a Strategy for Cancer Treatment. *Signal Transduct Target Ther* **2018**, *3*, 5, doi:10.1038/s41392-018-0008-7.
334. Mertz, J.A.; Conery, A.R.; Bryant, B.M.; Sandy, P.; Balasubramanian, S.; Mele, D.A.; Bergeron, L.; Sims, R.J. Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 16669–16674, doi:10.1073/pnas.1108190108.
335. Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A.R.; Herrmann, H.; Sison, E.A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; et al. RNAi Screen Identifies Brd4 as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukaemia. *Nature* **2011**, *478*, 524–528, doi:10.1038/nature10334.
336. Nicholas, D.A.; Andrieu, G.; Strissel, K.J.; Nikolajczyk, B.S.; Denis, G.V. BET Bromodomain Proteins and Epigenetic Regulation of Inflammation: Implications for Type 2 Diabetes and Breast Cancer. *Cell Mol Life Sci* **2017**, *74*, 231–243, doi:10.1007/s00018-016-2320-0.
337. Stewart, H.J.S.; Horne, G.A.; Bastow, S.; Chevassut, T.J.T. BRD4 Associates with P53 in DNMT3A-Mutated Leukemia Cells and Is Implicated in Apoptosis by the Bromodomain Inhibitor JQ1. *Cancer Med* **2013**, *2*, 826–835, doi:10.1002/cam4.146.
338. Dawson, M.A.; Prinjha, R.K.; Dittmann, A.; Giotopoulos, G.; Bantscheff, M.; Chan, W.-I.; Robson, S.C.; Chung, C.; Hopf, C.; Savitski, M.M.; et al. Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-Fusion Leukaemia. *Nature* **2011**, *478*, 529–533, doi:10.1038/nature10509.

339. Ott, C.J.; Kopp, N.; Bird, L.; Paranal, R.M.; Qi, J.; Bowman, T.; Rodig, S.J.; Kung, A.L.; Bradner, J.E.; Weinstock, D.M. BET Bromodomain Inhibition Targets Both C-Myc and IL7R in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **2012**, *120*, 2843–2852, doi:10.1182/blood-2012-02-413021.
340. Chanvorachote, P.; Sriratanasak, N.; Nonpanya, N. C-Myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target. *Anticancer Res* **2020**, *40*, 609–618, doi:10.21873/anticancer.13990.
341. Aunoble, B.; Sanches, R.; Didier, E.; Bignon, Y.J. Major Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Involved in Epithelial Ovarian Cancer (Review). *Int J Oncol* **2000**, *16*, 567–576, doi:10.3892/ijo.16.3.567.
342. Liao, D.J.; Dickson, R.B. C-Myc in Breast Cancer. *Endocr Relat Cancer* **2000**, *7*, 143–164, doi:10.1677/erc.0.0070143.
343. Grivnikov, S.I.; Karin, M. Inflammation and Oncogenesis: A Vicious Connection. *Curr Opin Genet Dev* **2010**, *20*, 65–71, doi:10.1016/j.gde.2009.11.004.
344. Andrieu, G.P.; Shafran, J.S.; Deeney, J.T.; Bharadwaj, K.R.; Rangarajan, A.; Denis, G.V. BET Proteins in Abnormal Metabolism, Inflammation, and the Breast Cancer Microenvironment. *J Leukoc Biol* **2018**, *104*, 265–274, doi:10.1002/JLB.5RI0917-380RR.
345. Leal, A.S.; Williams, C.R.; Royce, D.B.; Pioli, P.A.; Sporn, M.B.; Liby, K.T. Bromodomain Inhibitors, JQ1 and I-BET 762, as Potential Therapies for Pancreatic Cancer. *Cancer Lett* **2017**, *394*, 76–87, doi:10.1016/j.canlet.2017.02.021.
346. Chakraborty, D.; Benham, V.; Jdanov, V.; Bullard, B.; Leal, A.S.; Liby, K.T.; Bernard, J.J. A BET Bromodomain Inhibitor Suppresses Adiposity-Associated Malignant Transformation. *Cancer Prev Res (Phila)* **2018**, *11*, 129–142, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-17-0262.
347. D, C.; V, B.; B, B.; T, K.; Hc, H.; D, G.; Ey, D.; Sy, L.; Jj, B. Fibroblast Growth Factor Receptor Is a Mechanistic Link between Visceral Adiposity and Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, doi:10.1038/onc.2017.278.
348. Goy, E.; Abbadie, C. [Senescence and cancer: double-dealing]. *Med Sci (Paris)* **2018**, *34*, 223–230, doi:10.1051/medsci/20183403010.
349. Huang, B.; Yang, X.-D.; Zhou, M.-M.; Ozato, K.; Chen, L.-F. Brd4 Coactivates Transcriptional Activation of NF-KappaB via Specific Binding to Acetylated RelA. *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 1375–1387, doi:10.1128/MCB.01365-08.
350. Zou, Z.; Huang, B.; Wu, X.; Zhang, H.; Qi, J.; Bradner, J.; Nair, S.; Chen, L.-F. Brd4 Maintains Constitutively Active NF-KB in Cancer Cells by Binding to Acetylated RelA. *Oncogene* **2014**, *33*, 2395–2404, doi:10.1038/onc.2013.179.
351. Gallagher, S.J.; Mijatov, B.; Gunatilake, D.; Gowrishankar, K.; Tiffen, J.; James, W.; Jin, L.; Pupo, G.; Cullinane, C.; McArthur, G.A.; et al. Control of NF-KB Activity in Human Melanoma by Bromodomain and Extra-Terminal Protein Inhibitor I-BET151. *Pigment Cell Melanoma Res* **2014**, *27*, 1126–1137, doi:10.1111/pcmr.12282.
352. Kortlever, R.M.; Sodik, N.M.; Wilson, C.H.; Burkhart, D.L.; Pellegrinet, L.; Brown Swigart, L.; Littlewood, T.D.; Evan, G.I. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* **2017**, *171*, 1301–1315.e14, doi:10.1016/j.cell.2017.11.013.
353. Garcia, A.; Kandel, J.J. Notch: A Key Regulator of Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Histol Histopathol* **2012**, *27*, 151–156, doi:10.14670/HH-27.151.
354. Andrieu, G.; Tran, A.H.; Strissel, K.J.; Denis, G.V. BRD4 Regulates Breast Cancer Dissemination through Jagged1/Notch1 Signaling. *Cancer Res* **2016**, *76*, 6555–6567, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0559.

355. McKinney, C.C.; Kim, M.J.; Chen, D.; McBride, A.A. Brd4 Activates Early Viral Transcription upon Human Papillomavirus 18 Infection of Primary Keratinocytes. *mBio* **2016**, *7*, e01644-16, doi:10.1128/mBio.01644-16.
356. Liu, C.; Cheng, X.; Chen, J.; Wang, Y.; Wu, X.; Tian, R.; Liu, B.; Ding, X.; Sun, Q.; Gong, W. Suppression of YAP/TAZ-Notch1-NICD Axis by Bromodomain and Extraterminal Protein Inhibition Impairs Liver Regeneration. *Theranostics* **2019**, *9*, 3840–3852, doi:10.7150/thno.33370.
357. Frank, S.B.; Berger, P.L.; Ljungman, M.; Miranti, C.K. Human Prostate Luminal Cell Differentiation Requires NOTCH3 Induction by P38-MAPK and MYC. *J Cell Sci* **2017**, *130*, 1952–1964, doi:10.1242/jcs.197152.
358. Kulikowski, E.; Rakai, B.D.; Wong, N.C.W. Inhibitors of Bromodomain and Extra-Terminal Proteins for Treating Multiple Human Diseases. *Med Res Rev* **2021**, *41*, 223–245, doi:10.1002/med.21730.
359. Xu, Y.; Vakoc, C.R. Targeting Cancer Cells with BET Bromodomain Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2017**, *7*, a026674, doi:10.1101/cshperspect.a026674.
360. Fedorov, O.; Lingard, H.; Wells, C.; Monteiro, O.P.; Picaud, S.; Keates, T.; Yapp, C.; Philpott, M.; Martin, S.J.; Felletar, I.; et al. [1,2,4]Triazolo[4,3-a]Phthalazines: Inhibitors of Diverse Bromodomains. *J Med Chem* **2014**, *57*, 462–476, doi:10.1021/jm401568s.
361. Filippakopoulos, P.; Qi, J.; Picaud, S.; Shen, Y.; Smith, W.B.; Fedorov, O.; Morse, E.M.; Keates, T.; Hickman, T.T.; Felletar, I.; et al. Selective Inhibition of BET Bromodomains. *Nature* **2010**, *468*, 1067–1073, doi:10.1038/nature09504.
362. Alekseyenko, A.A.; Walsh, E.M.; Wang, X.; Grayson, A.R.; Hsi, P.T.; Kharchenko, P.V.; Kuroda, M.I.; French, C.A. The Oncogenic BRD4-NUT Chromatin Regulator Drives Aberrant Transcription within Large Topological Domains. *Genes Dev* **2015**, *29*, 1507–1523, doi:10.1101/gad.267583.115.
363. Junwei, S.; Vakoc, C.R. The Mechanisms behind the Therapeutic Activity of BET Bromodomain Inhibition. *Mol Cell* **2014**, *54*, 728–736, doi:10.1016/j.molcel.2014.05.016.
364. Miller, A.L.; Garcia, P.L.; Fehling, S.C.; Gamblin, T.L.; Vance, R.B.; Council, L.N.; Chen, D.; Yang, E.S.; van Waardenburg, R.C.A.M.; Yoon, K.J. The BET Inhibitor JQ1 Augments the Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Preclinical Models of Pancreatic Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 3470, doi:10.3390/cancers13143470.
365. Hogg, S.J.; Vervoort, S.J.; Deswal, S.; Ott, C.J.; Li, J.; Cluse, L.A.; Beavis, P.A.; Darcy, P.K.; Martin, B.P.; Spencer, A.; et al. BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1. *Cell Rep* **2017**, *18*, 2162–2174, doi:10.1016/j.celrep.2017.02.011.
366. Henssen, A.; Thor, T.; Odersky, A.; Heukamp, L.; El-Hindy, N.; Beckers, A.; Speleman, F.; Althoff, K.; Schäfers, S.; Schramm, A.; et al. BET Bromodomain Protein Inhibition Is a Therapeutic Option for Medulloblastoma. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2080–2095, doi:10.18632/oncotarget.1534.
367. Bandopadhyay, P.; Bergthold, G.; Nguyen, B.; Schubert, S.; Gholamin, S.; Tang, Y.; Bolin, S.; Schumacher, S.E.; Zeid, R.; Masoud, S.; et al. BET Bromodomain Inhibition of MYC-Amplified Medulloblastoma. *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 912–925, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2281.
368. Zhang, Y.; Tian, S.; Xiong, J.; Zhou, Y.; Song, H.; Liu, C. JQ-1 Inhibits Colon Cancer Proliferation via Suppressing Wnt/ β -Catenin Signaling and MiR-21. *Chem Res Toxicol* **2018**, *31*, 302–307, doi:10.1021/acs.chemrestox.7b00346.
369. Borbely, G.; Haldosen, L.-A.; Dahlman-Wright, K.; Zhao, C. Induction of USP17 by Combining BET and HDAC Inhibitors in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 33623–33635, doi:10.18632/oncotarget.5601.

370. Stuhlmiller, T.J.; Miller, S.M.; Zawistowski, J.S.; Nakamura, K.; Beltran, A.S.; Duncan, J.S.; Angus, S.P.; Collins, K.A.L.; Granger, D.A.; Reuther, R.A.; et al. Inhibition of Lapatinib-Induced Kinome Reprogramming in ERBB2-Positive Breast Cancer by Targeting BET Family Bromodomains. *Cell Rep* **2015**, *11*, 390–404, doi:10.1016/j.celrep.2015.03.037.
371. Loosveld, M.; Castellano, R.; Gon, S.; Goubard, A.; Crouzet, T.; Pouyet, L.; Prebet, T.; Vey, N.; Nadel, B.; Collette, Y.; et al. Therapeutic Targeting of C-Myc in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia, T-ALL. *Oncotarget* **2014**, *5*, 3168–3172, doi:10.18632/oncotarget.1873.
372. Fiskus, W.; Sharma, S.; Qi, J.; Shah, B.; Devaraj, S.G.T.; Leveque, C.; Portier, B.P.; Iyer, S.; Bradner, J.E.; Bhalla, K.N. BET Protein Antagonist JQ1 Is Synergistically Lethal with FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) and Overcomes Resistance to FLT3-TKI in AML Cells Expressing FLT-ITD. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13*, 2315–2327, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0258.
373. Chaidos, A.; Caputo, V.; Karadimitris, A. Inhibition of Bromodomain and Extra-Terminal Proteins (BET) as a Potential Therapeutic Approach in Haematological Malignancies: Emerging Preclinical and Clinical Evidence. *Therapeutic Advances in Hematology* **2015**, *6*, 128–141, doi:10.1177/2040620715576662.
374. Garcia, P.L.; Miller, A.L.; Kreitzburg, K.M.; Council, L.N.; Gamblin, T.L.; Christein, J.D.; Heslin, M.J.; Arnoletti, J.P.; Richardson, J.H.; Chen, D.; et al. The BET Bromodomain Inhibitor JQ1 Suppresses Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Patient-Derived Xenograft Models. *Oncogene* **2016**, *35*, 833–845, doi:10.1038/onc.2015.126.
375. Park, I.H.; Yang, H.N.; Jeon, S.Y.; Hwang, J.-A.; Kim, M.K.; Kong, S.-Y.; Shim, S.H.; Lee, K.S. Anti-Tumor Activity of BET Inhibitors in Androgen-Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *Sci Rep* **2019**, *9*, 13305, doi:10.1038/s41598-019-49366-9.
376. da Motta, L.L.; Ledaki, I.; Purshouse, K.; Haider, S.; De Bastiani, M.A.; Baban, D.; Morotti, M.; Steers, G.; Wigfield, S.; Bridges, E.; et al. The BET Inhibitor JQ1 Selectively Impairs Tumour Response to Hypoxia and Downregulates CA9 and Angiogenesis in Triple Negative Breast Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 122–132, doi:10.1038/onc.2016.184.
377. Bradbury, R.H.; Callis, R.; Carr, G.R.; Chen, H.; Clark, E.; Feron, L.; Glossop, S.; Graham, M.A.; Hattersley, M.; Jones, C.; et al. Optimization of a Series of Bivalent Triazolopyridazine Based Bromodomain and Extraterminal Inhibitors: The Discovery of (3R)-4-[2-[4-[1-(3-Methoxy-[1,2,4]Triazolo[4,3-b]Pyridazin-6-Yl)-4-Piperidyl]Phenoxy]Ethyl]-1,3-Dimethyl-Piperazin-2-One (AZD5153). *J Med Chem* **2016**, *59*, 7801–7817, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00070.
378. Paper: CPI-0610, Bromodomain and Extraterminal Domain Protein (BET) Inhibitor, As “Add-on” to Ruxolitinib, in Advanced Myelofibrosis Patients with Suboptimal Response: Update of MANIFEST Phase 2 Study Available online: <https://ash.confex.com/ash/2020/webprogram/Paper140891.html> (accessed on 16 August 2022).
379. Boi, M.; Gaudio, E.; Bonetti, P.; Kwee, I.; Bernasconi, E.; Tarantelli, C.; Rinaldi, A.; Testoni, M.; Cascione, L.; Ponzoni, M.; et al. The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-Cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 1628–1638, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1561.
380. Finley, A.; Copeland, R.A. Small Molecule Control of Chromatin Remodeling. *Chem Biol* **2014**, *21*, 1196–1210, doi:10.1016/j.chembiol.2014.07.024.

381. Bui, M.H.; Lin, X.; Albert, D.H.; Li, L.; Lam, L.T.; Faivre, E.J.; Warder, S.E.; Huang, X.; Wilcox, D.; Donawho, C.K.; et al. Preclinical Characterization of BET Family Bromodomain Inhibitor ABBV-075 Suggests Combination Therapeutic Strategies. *Cancer Res* **2017**, *77*, 2976–2989, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1793.
382. Kim, S.R.; Lewis, J.M.; Cyrenne, B.M.; Monico, P.F.; Mirza, F.N.; Carlson, K.R.; Foss, F.M.; Girardi, M. BET Inhibition in Advanced Cutaneous T Cell Lymphoma Is Synergistically Potentiated by BCL2 Inhibition or HDAC Inhibition. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29193–29207, doi:10.18632/oncotarget.25670.
383. Berthon, C.; Raffoux, E.; Thomas, X.; Vey, N.; Gomez-Roca, C.; Yee, K.; Taussig, D.C.; Rezai, K.; Roumier, C.; Herait, P.; et al. Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study. *Lancet Haematol* **2016**, *3*, e186-195, doi:10.1016/S2352-3026(15)00247-1.
384. Coudé, M.-M.; Braun, T.; Berrou, J.; Dupont, M.; Bertrand, S.; Masse, A.; Raffoux, E.; Itzykson, R.; Delord, M.; Riveiro, M.E.; et al. BET Inhibitor OTX015 Targets BRD2 and BRD4 and Decreases C-MYC in Acute Leukemia Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17698–17712, doi:10.18632/oncotarget.4131.
385. Wang, M.; Chen, C.; Xu, J.; Wang, L.; Song, X.; Zhang, H.; Zeng, L.; Xu, K. [Effect of bromodomain protein 4 inhibitor GSK525762A on the proliferation and apoptosis of B-cell acute lymphoblastic leukemia cells and its mechanism]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **2014**, *35*, 528–532, doi:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.06.012.
386. Ma, S.; Chen, C.; Zhu, J.; Li, Y.; Wang, X.; Song, X.; Cao, J.; Xu, K. [In vitro study of BRD4 inhibitor GSK525762A against primary adult common B-cell acute lymphoblastic leukemia cells in vitro]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **2015**, *36*, 563–569, doi:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.007.
387. Kim, E.; Ten Hacken, E.; Sivina, M.; Clarke, A.; Thompson, P.A.; Jain, N.; Ferrajoli, A.; Estrov, Z.; Keating, M.J.; Wierda, W.G.; et al. The BET Inhibitor GS-5829 Targets Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and Their Supportive Microenvironment. *Leukemia* **2020**, *34*, 1588–1598, doi:10.1038/s41375-019-0682-7.
388. Siu, K.T.; Ramachandran, J.; Yee, A.J.; Eda, H.; Santo, L.; Panaroni, C.; Mertz, J.A.; Sims Iii, R.J.; Cooper, M.R.; Raje, N. Preclinical Activity of CPI-0610, a Novel Small-Molecule Bromodomain and Extra-Terminal Protein Inhibitor in the Therapy of Multiple Myeloma. *Leukemia* **2017**, *31*, 1760–1769, doi:10.1038/leu.2016.355.
389. Chaidos, A.; Caputo, V.; Gouvedenou, K.; Liu, B.; Marigo, I.; Chaudhry, M.S.; Rotolo, A.; Tough, D.F.; Smithers, N.N.; Bassil, A.K.; et al. Potent Antimyeloma Activity of the Novel Bromodomain Inhibitors I-BET151 and I-BET762. *Blood* **2014**, *123*, 697–705, doi:10.1182/blood-2013-01-478420.
390. Wyce, A.; Degenhardt, Y.; Bai, Y.; Le, B.; Korenchuk, S.; Crouthame, M.-C.; McHugh, C.F.; Vessella, R.; Creasy, C.L.; Tummino, P.J.; et al. Inhibition of BET Bromodomain Proteins as a Therapeutic Approach in Prostate Cancer. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2419–2429, doi:10.18632/oncotarget.1572.
391. Nicodeme, E.; Jeffrey, K.L.; Schaefer, U.; Beinke, S.; Dewell, S.; Chung, C.; Chandwani, R.; Marazzi, I.; Wilson, P.; Coste, H.; et al. Suppression of Inflammation by a Synthetic Histone Mimic. *Nature* **2010**, *468*, 1119–1123, doi:10.1038/nature09589.
392. Kanojia, D.; Panek, W.K.; Cordero, A.; Fares, J.; Xiao, A.; Savchuk, S.; Kumar, K.; Xiao, T.; Pituch, K.C.; Miska, J.; et al. BET Inhibition Increases BIII-Tubulin Expression and Sensitizes Metastatic Breast Cancer in the Brain to Vinorelbine. *Sci Transl Med* **2020**, *12*, eaax2879, doi:10.1126/scitranslmed.aax2879.
393. Firle, K.A.; Szymansky, A.; Witthauer, M.J.; Dorado-Garcia, H.; Toedling, J.; Schoenbeck, K.; Henssen, A.G.; Hertwig, F.; Eggert, A.; Schulte, J.H. Preclinical Evaluation of BET-Bromodomain Inhibitor TEN-010 as Monotherapy and Combination

- Therapy in MYC-Driven Neuroblastoma. *Annals of Oncology* **2018**, 29, iii12–iii13, doi:10.1093/annonc/mdy047.010.
394. Wyce, A.; Ganji, G.; Smitheman, K.N.; Chung, C.-W.; Korenchuk, S.; Bai, Y.; Barbash, O.; Le, B.; Craggs, P.D.; McCabe, M.T.; et al. BET Inhibition Silences Expression of MYCN and BCL2 and Induces Cytotoxicity in Neuroblastoma Tumor Models. *PLoS One* **2013**, 8, e72967, doi:10.1371/journal.pone.0072967.
 395. Baratta, M.G.; Schinzel, A.C.; Zwang, Y.; Bandopadhyay, P.; Bowman-Colin, C.; Kutt, J.; Curtis, J.; Piao, H.; Wong, L.C.; Kung, A.L.; et al. An In-Tumor Genetic Screen Reveals That the BET Bromodomain Protein, BRD4, Is a Potential Therapeutic Target in Ovarian Carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, 112, 232–237, doi:10.1073/pnas.1422165112.
 396. Megiorni, F.; Camero, S.; Pontecorvi, P.; Camicia, L.; Marampon, F.; Ceccarelli, S.; Anastasiadou, E.; Bernabò, N.; Perniola, G.; Pizzuti, A.; et al. OTX015 Epi-Drug Exerts Antitumor Effects in Ovarian Cancer Cells by Blocking GNL3-Mediated Radioresistance Mechanisms: Cellular, Molecular and Computational Evidence. *Cancers (Basel)* **2021**, 13, 1519, doi:10.3390/cancers13071519.
 397. Bonazzoli, E.; Predolini, F.; Cocco, E.; Bellone, S.; Altwerger, G.; Menderes, G.; Zammataro, L.; Bianchi, A.; Pettinella, F.; Riccio, F.; et al. Inhibition of BET Bromodomain Proteins with GS-5829 and GS-626510 in Uterine Serous Carcinoma, a Biologically Aggressive Variant of Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res* **2018**, 24, 4845–4853, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0864.
 398. Xie, F.; Huang, M.; Lin, X.; Liu, C.; Liu, Z.; Meng, F.; Wang, C.; Huang, Q. The BET Inhibitor I-BET762 Inhibits Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Proliferation and Enhances the Therapeutic Effect of Gemcitabine. *Sci Rep* **2018**, 8, 8102, doi:10.1038/s41598-018-26496-0.
 399. Markman, R.L.; Webber, L.P.; Nascimento Filho, C.H.V.; Reis, L.A.; Vargas, P.A.; Lopes, M.A.; Zanella, V.; Martins, M.D.; Squarize, C.H.; Castilho, R.M. Interfering with Bromodomain Epigenome Readers as Therapeutic Option in Mucoepidermoid Carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)* **2019**, 42, 143–155, doi:10.1007/s13402-018-0416-2.
 400. Aggarwal, R.; Starodub, A.N.; Koh, B.D.; Xing, G.; Armstrong, A.J.; Carducci, M.A. Phase Ib Study of the BET Inhibitor GS-5829 as Monotherapy and Combined with Enzalutamide in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **2022**, 28, 3979–3989, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-0175.
 401. Amorim, S.; Stathis, A.; Gleeson, M.; Iyengar, S.; Magarotto, V.; Leleu, X.; Morschhauser, F.; Karlin, L.; Broussais, F.; Rezai, K.; et al. Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Lymphoma or Multiple Myeloma: A Dose-Escalation, Open-Label, Pharmacokinetic, Phase 1 Study. *Lancet Haematol* **2016**, 3, e196–204, doi:10.1016/S2352-3026(16)00021-1.
 402. Lewin, J.; Soria, J.-C.; Stathis, A.; Delord, J.-P.; Peters, S.; Awada, A.; Aftimos, P.G.; Bekradda, M.; Rezai, K.; Zeng, Z.; et al. Phase Ib Trial With Birabresib, a Small-Molecule Inhibitor of Bromodomain and Extraterminal Proteins, in Patients With Selected Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* **2018**, 36, 3007–3014, doi:10.1200/JCO.2018.78.2292.
 403. Piha-Paul, S.A.; Sachdev, J.C.; Barve, M.; LoRusso, P.; Szmulewitz, R.; Patel, S.P.; Lara, P.N.; Chen, X.; Hu, B.; Freise, K.J.; et al. First-in-Human Study of Mivebresib (ABBV-075), an Oral Pan-Inhibitor of Bromodomain and Extra Terminal Proteins, in Patients with Relapsed/Refractory Solid Tumors. *Clin Cancer Res* **2019**, 25, 6309–6319, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0578.

404. Liu, Z.; Wang, P.; Chen, H.; Wold, E.A.; Tian, B.; Brasier, A.R.; Zhou, J. Drug Discovery Targeting Bromodomain-Containing Protein 4. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4533–4558, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01761.
405. Tanaka, M.; Roberts, J.M.; Seo, H.-S.; Souza, A.; Paulk, J.; Scott, T.G.; DeAngelo, S.L.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J.E. Design and Characterization of Bivalent BET Inhibitors. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 1089–1096, doi:10.1038/nchembio.2209.
406. Ren, C.; Zhang, G.; Han, F.; Fu, S.; Cao, Y.; Zhang, F.; Zhang, Q.; Meslamani, J.; Xu, Y.; Ji, D.; et al. Spatially Constrained Tandem Bromodomain Inhibition Bolsters Sustained Repression of BRD4 Transcriptional Activity for TNBC Cell Growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, 7949–7954, doi:10.1073/pnas.1720000115.
407. Luo, M.; Wu, Q.; Yang, Y.; Sun, L.; Huan, X.; Tian, C.; Xiong, B.; Miao, Z.; Wang, Y.; Chen, D. Design and Development of a Novel Series of Oral Bivalent BET Inhibitors with Potent Anticancer Activities. *Eur J Med Chem* **2022**, *239*, 114519, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114519.
408. Wu, Q.; Chen, D.-Q.; Sun, L.; Huan, X.-J.; Bao, X.-B.; Tian, C.-Q.; Hu, J.; Lv, K.-K.; Wang, Y.-Q.; Xiong, B.; et al. Novel Bivalent BET Inhibitor N2817 Exhibits Potent Anticancer Activity and Inhibits TAF1. *Biochem Pharmacol* **2021**, *185*, 114435, doi:10.1016/j.bcp.2021.114435.
409. Rhyasen, G.W.; Hattersley, M.M.; Yao, Y.; Dulak, A.; Wang, W.; Petteruti, P.; Dale, I.L.; Boiko, S.; Cheung, T.; Zhang, J.; et al. AZD5153: A Novel Bivalent BET Bromodomain Inhibitor Highly Active against Hematologic Malignancies. *Mol Cancer Ther* **2016**, *15*, 2563–2574, doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0141.
410. Shen, G.; Chen, J.; Zhou, Y.; Wang, Z.; Ma, Z.; Xu, C.; Jiang, M. AZD5153 Inhibits Prostate Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Cell Physiol Biochem* **2018**, *50*, 798–809, doi:10.1159/000494244.
411. Xu, K.; Chen, D.; Qian, D.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Guo, S.; Ma, Z.; Wang, S. AZD5153, a Novel BRD4 Inhibitor, Suppresses Human Thyroid Carcinoma Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *499*, 531–537, doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.184.
412. Zhang, P.; Li, R.; Xiao, H.; Liu, W.; Zeng, X.; Xie, G.; Yang, W.; Shi, L.; Yin, Y.; Tao, K. BRD4 Inhibitor AZD5153 Suppresses the Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Sensitizes the Anticancer Effect of PARP Inhibitor. *Int J Biol Sci* **2019**, *15*, 1942–1954, doi:10.7150/ijbs.34162.
413. Lin, C.-H.; Kuo, J.C.-T.; Li, D.; Koenig, A.B.; Pan, A.; Yan, P.; Bai, X.-F.; Lee, R.J.; Ghoshal, K. AZD5153, a Bivalent BRD4 Inhibitor, Suppresses Hepatocarcinogenesis by Altering BRD4 Chromosomal Landscape and Modulating the Transcriptome of HCC Cells. *Front Cell Dev Biol* **2022**, *10*, 853652, doi:10.3389/fcell.2022.853652.
414. Woods, A.D.; Berlow, N.E.; Ortiz, M.V.; Dela Cruz, F.; Siddiquee, A.; Coutinho, D.F.; Purohit, R.; Freier, K.E.T.; Michalek, J.E.; Lathara, M.; et al. Bromodomain 4 Inhibition Leads to MYCN Downregulation in Wilms Tumor. *Pediatr Blood Cancer* **2022**, *69*, e29401, doi:10.1002/pbc.29401.
415. First-in-Human Study of AZD5153, a Small Molecule Inhibitor of Bromodomain Protein 4 (BRD4), in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory (RR) Malignant Solid Tumor and Lymphoma: Preliminary Data. *Journal of Clinical Oncology* **2019**.
416. Guan, X.; Cheryala, N.; Karim, R.M.; Chan, A.; Berndt, N.; Qi, J.; Georg, G.I.; Schönbrunn, E. Bivalent BET Bromodomain Inhibitors Confer Increased Potency and Selectivity for BRDT via Protein Conformational Plasticity. *J Med Chem* **2022**, *65*, 10441–10458, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00453.
417. Gacias, M.; Gerona-Navarro, G.; Plotnikov, A.N.; Zhang, G.; Zeng, L.; Kaur, J.; Moy, G.; Rusinova, E.; Rodriguez, Y.; Matikainen, B.; et al. Selective Chemical Modulation of

- Gene Transcription Favors Oligodendrocyte Lineage Progression. *Chem Biol* **2014**, *21*, 841–854, doi:10.1016/j.chembiol.2014.05.009.
418. Zhang, G.; Plotnikov, A.N.; Rusinova, E.; Shen, T.; Morohashi, K.; Joshua, J.; Zeng, L.; Mujtaba, S.; Ohlmeyer, M.; Zhou, M.-M. Structure-Guided Design of Potent Diazobenzene Inhibitors for the BET Bromodomains. *J Med Chem* **2013**, *56*, 9251–9264, doi:10.1021/jm401334s.
 419. Cheung, K.; Lu, G.; Sharma, R.; Vincek, A.; Zhang, R.; Plotnikov, A.N.; Zhang, F.; Zhang, Q.; Ju, Y.; Hu, Y.; et al. BET N-Terminal Bromodomain Inhibition Selectively Blocks Th17 Cell Differentiation and Ameliorates Colitis in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, 2952–2957, doi:10.1073/pnas.1615601114.
 420. Rodríguez, Y.; Gerona-Navarro, G.; Osman, R.; Zhou, M.-M. In Silico Design and Molecular Basis for the Selectivity of Olinone toward the First over the Second Bromodomain of BRD4. *Proteins* **2020**, *88*, 414–430, doi:10.1002/prot.25818.
 421. Seal, J.; Lamotte, Y.; Donche, F.; Bouillot, A.; Mirguet, O.; Gellibert, F.; Nicodeme, E.; Krysa, G.; Kirilovsky, J.; Beinke, S.; et al. Identification of a Novel Series of BET Family Bromodomain Inhibitors: Binding Mode and Profile of I-BET151 (GSK1210151A). *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 2968–2972, doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.041.
 422. Gilan, O.; Rioja, I.; Knezevic, K.; Bell, M.J.; Yeung, M.M.; Harker, N.R.; Lam, E.Y.N.; Chung, C.-W.; Bamborough, P.; Petretich, M.; et al. Selective Targeting of BD1 and BD2 of the BET Proteins in Cancer and Immunoinflammation. *Science* **2020**, *368*, 387–394, doi:10.1126/science.aaz8455.
 423. Shorstova, T.; Foulkes, W.D.; Witcher, M. Achieving Clinical Success with BET Inhibitors as Anti-Cancer Agents. *Br J Cancer* **2021**, *124*, 1478–1490, doi:10.1038/s41416-021-01321-0.
 424. Chen, D.; Lu, T.; Yan, Z.; Lu, W.; Zhou, F.; Lyu, X.; Xu, B.; Jiang, H.; Chen, K.; Luo, C.; et al. Discovery, Structural Insight, and Bioactivities of BY27 as a Selective Inhibitor of the Second Bromodomains of BET Proteins. *Eur J Med Chem* **2019**, *182*, 111633, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111633.
 425. Lin, X.; Huang, X.; Bellin, R.; Faivre, E.; Hessler, P.; Lam, L.; Bui, M.; Wilcox, D.; Uziel, T.; Ferguson, D.; et al. Abstract 800: ABBV-744, a First-in-Class and Highly Selective Inhibitor of the Second Bromodomain of BET Family Proteins, Displays Robust Activities in Preclinical Models of Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research* **2018**, *78*, 800–800, doi:10.1158/1538-7445.AM2018-800.
 426. Vaidergorn, M.M.; da Silva Emery, F.; Ganesan, A. From Hit Seeking to Magic Bullets: The Successful Union of Epigenetic and Fragment Based Drug Discovery (EPIDD + FBDD). *J Med Chem* **2021**, *64*, 13980–14010, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00787.
 427. Faivre, E.; Wilcox, D.; Ha-Bui, M.; Hessler, P.; Sehgal, V.; Lu, X.; Uziel, T.; Mehta, G.; Albert, D.; Mcdaniel, K.; et al. Abstract 4960: First-in-Class, Highly BDII-Selective BET Family Inhibitor ABBV-744 Displays Potent Anti-Tumor Activity in Androgen Receptor Positive Prostate Cancer Models and an Improved Tolerability Profile. *Cancer Research* **2018**, *78*, 4960–4960, doi:10.1158/1538-7445.AM2018-4960.
 428. Faivre, E.J.; McDaniel, K.F.; Albert, D.H.; Mantena, S.R.; Plotnik, J.P.; Wilcox, D.; Zhang, L.; Bui, M.H.; Sheppard, G.S.; Wang, L.; et al. Selective Inhibition of the BD2 Bromodomain of BET Proteins in Prostate Cancer. *Nature* **2020**, *578*, 306–310, doi:10.1038/s41586-020-1930-8.
 429. Piha-Paul, S.A.; Hann, C.L.; French, C.A.; Cousin, S.; Braña, I.; Cassier, P.A.; Moreno, V.; de Bono, J.S.; Harward, S.D.; Ferron-Brady, G.; et al. Phase 1 Study of Molibresib (GSK525762), a Bromodomain and Extra-Terminal Domain Protein Inhibitor,

- in NUT Carcinoma and Other Solid Tumors. *JNCI Cancer Spectr* **2020**, *4*, pkz093, doi:10.1093/jncics/pkz093.
430. Stathis, A.; Zucca, E.; Bekradda, M.; Gomez-Roca, C.; Delord, J.-P.; de La Motte Rouge, T.; Uro-Coste, E.; de Braud, F.; Pelosi, G.; French, C.A. Clinical Response of Carcinomas Harboring the BRD4-NUT Oncoprotein to the Targeted Bromodomain Inhibitor OTX015/MK-8628. *Cancer Discov* **2016**, *6*, 492–500, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1335.
 431. Bolden, J.E.; Tasdemir, N.; Dow, L.E.; van Es, J.H.; Wilkinson, J.E.; Zhao, Z.; Clevers, H.; Lowe, S.W. Inducible in Vivo Silencing of Brd4 Identifies Potential Toxicities of Sustained BET Protein Inhibition. *Cell Rep* **2014**, *8*, 1919–1929, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.025.
 432. Bechter, O.; Schöffski, P. Make Your Best BET: The Emerging Role of BET Inhibitor Treatment in Malignant Tumors. *Pharmacol Ther* **2020**, *208*, 107479, doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107479.
 433. Lai, A.C.; Crews, C.M. Induced Protein Degradation: An Emerging Drug Discovery Paradigm. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 101–114, doi:10.1038/nrd.2016.211.
 434. Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Dong, H.; Wang, J.; Raina, K.; Hines, J.; Winkler, J.D.; Crew, A.P.; Coleman, K.; et al. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem Biol* **2015**, *22*, 755–763, doi:10.1016/j.chembiol.2015.05.009.
 435. Wu, S.; Jiang, Y.; Hong, Y.; Chu, X.; Zhang, Z.; Tao, Y.; Fan, Z.; Bai, Z.; Li, X.; Chen, Y.; et al. BRD4 PROTAC Degradar ARV-825 Inhibits T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Targeting “Undruggable” Myc-Pathway Genes. *Cancer Cell Int* **2021**, *21*, 230, doi:10.1186/s12935-021-01908-w.
 436. Sun, B.; Fiskus, W.; Qian, Y.; Rajapakshe, K.; Raina, K.; Coleman, K.G.; Crew, A.P.; Shen, A.; Saenz, D.T.; Mill, C.P.; et al. BET Protein Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Exerts Potent Lethal Activity against Mantle Cell Lymphoma Cells. *Leukemia* **2018**, *32*, 343–352, doi:10.1038/leu.2017.207.
 437. Li, Z.; Lim, S.L.; Tao, Y.; Li, X.; Xie, Y.; Yang, C.; Zhang, Z.; Jiang, Y.; Zhang, X.; Cao, X.; et al. PROTAC Bromodomain Inhibitor ARV-825 Displays Anti-Tumor Activity in Neuroblastoma by Repressing Expression of MYCN or c-Myc. *Front Oncol* **2020**, *10*, 574525, doi:10.3389/fonc.2020.574525.
 438. Noblejas-López, M.D.M.; Nieto-Jimenez, C.; Burgos, M.; Gómez-Juárez, M.; Montero, J.C.; Esparís-Ogando, A.; Pandiella, A.; Galán-Moya, E.M.; Ocaña, A. Activity of BET-Proteolysis Targeting Chimeric (PROTAC) Compounds in Triple Negative Breast Cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **2019**, *38*, 383, doi:10.1186/s13046-019-1387-5.
 439. ARV-825 Demonstrates Antitumor Activity in Gastric Cancer via MYC-Targets and G2M-Checkpoint Signaling Pathways - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34733788/> (accessed on 10 October 2022).
 440. Lu, Q.; Ding, X.; Huang, T.; Zhang, S.; Li, Y.; Xu, L.; Chen, G.; Ying, Y.; Wang, Y.; Feng, Z.; et al. BRD4 Degradar ARV-825 Produces Long-Lasting Loss of BRD4 Protein and Exhibits Potent Efficacy against Cholangiocarcinoma Cells. *Am J Transl Res* **2019**, *11*, 5728–5739.
 441. Tarantelli, C.; Cannas, E.; Ekeh, H.; Moscatello, C.; Gaudio, E.; Cascione, L.; Napoli, S.; Rech, C.; Testa, A.; Maniaci, C.; et al. The Bromodomain and Extra-Terminal Domain Degradar MZ1 Exhibits Preclinical Anti-Tumoral Activity in Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Activated B Cell-like Type. *Explor Target Antitumor Ther* **2021**, *2*, 586–601, doi:10.37349/etat.2021.00065.
 442. Yin, Y.; Sun, M.; Zhan, X.; Wu, C.; Geng, P.; Sun, X.; Wu, Y.; Zhang, S.; Qin, J.; Zhuang, Z.; et al. EGFR Signaling Confers Resistance to BET Inhibition in

- Hepatocellular Carcinoma through Stabilizing Oncogenic MYC. *J Exp Clin Cancer Res* **2019**, 38, 83, doi:10.1186/s13046-019-1082-6.
443. Ma, Y.; Wang, L.; Neitzel, L.R.; Loganathan, S.N.; Tang, N.; Qin, L.; Crispi, E.E.; Guo, Y.; Knapp, S.; Beauchamp, R.D.; et al. The MAPK Pathway Regulates Intrinsic Resistance to BET Inhibitors in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **2017**, 23, 2027–2037, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0453.
 444. Jiang, F.; Wei, Q.; Li, H.; Li, H.; Cui, Y.; Ma, Y.; Chen, H.; Cao, P.; Lu, T.; Chen, Y. Discovery of Novel Small Molecule Induced Selective Degradation of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Bromodomain Protein BRD4 and BRD2 with Cellular Potencies. *Bioorg Med Chem* **2020**, 28, 115181, doi:10.1016/j.bmc.2019.115181.
 445. Shu, S.; Lin, C.Y.; He, H.H.; Witwicki, R.M.; Tabassum, D.P.; Roberts, J.M.; Janiszewska, M.; Huh, S.J.; Liang, Y.; Ryan, J.; et al. Response and Resistance to BET Bromodomain Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Nature* **2016**, 529, 413–417, doi:10.1038/nature16508.
 446. Bai, L.; Zhou, B.; Yang, C.-Y.; Ji, J.; McEachern, D.; Przybranowski, S.; Jiang, H.; Hu, J.; Xu, F.; Zhao, Y.; et al. Targeted Degradation of BET Proteins in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* **2017**, 77, 2476–2487, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2622.
 447. Zhang, H.; Li, G.; Zhang, Y.; Shi, J.; Yan, B.; Tang, H.; Chen, S.; Zhang, J.; Wen, P.; Wang, Z.; et al. Targeting BET Proteins With a PROTAC Molecule Elicits Potent Anticancer Activity in HCC Cells. *Front Oncol* **2019**, 9, 1471, doi:10.3389/fonc.2019.01471.
 448. Shi, C.; Zhang, H.; Wang, P.; Wang, K.; Xu, D.; Wang, H.; Yin, L.; Zhang, S.; Zhang, Y. PROTAC Induced-BET Protein Degradation Exhibits Potent Anti-Osteosarcoma Activity by Triggering Apoptosis. *Cell Death Dis* **2019**, 10, 815, doi:10.1038/s41419-019-2022-2.
 449. Abedin, S.M.; Boddy, C.S.; Munshi, H.G. BET Inhibitors in the Treatment of Hematologic Malignancies: Current Insights and Future Prospects. *Onco Targets Ther* **2016**, 9, 5943–5953, doi:10.2147/OTT.S100515.
 450. Doroshow, D.B.; Eder, J.P.; LoRusso, P.M. BET Inhibitors: A Novel Epigenetic Approach. *Ann Oncol* **2017**, 28, 1776–1787, doi:10.1093/annonc/mdx157.
 451. Fong, C.Y.; Gilan, O.; Lam, E.Y.N.; Rubin, A.F.; Ftouni, S.; Tyler, D.; Stanley, K.; Sinha, D.; Yeh, P.; Morison, J.; et al. BET Inhibitor Resistance Emerges from Leukaemia Stem Cells. *Nature* **2015**, 525, 538–542, doi:10.1038/nature14888.
 452. Kumar, K.; Raza, S.S.; Knab, L.M.; Chow, C.R.; Kwok, B.; Bentrem, D.J.; Popovic, R.; Ebine, K.; Licht, J.D.; Munshi, H.G. GLI2-Dependent c-MYC Upregulation Mediates Resistance of Pancreatic Cancer Cells to the BET Bromodomain Inhibitor JQ1. *Sci Rep* **2015**, 5, 9489, doi:10.1038/srep09489.
 453. Rathert, P.; Roth, M.; Neumann, T.; Muerdter, F.; Roe, J.-S.; Muhar, M.; Deswal, S.; Cerny-Reiterer, S.; Peter, B.; Jude, J.; et al. Transcriptional Plasticity Promotes Primary and Acquired Resistance to BET Inhibition. *Nature* **2015**, 525, 543–547, doi:10.1038/nature14898.
 454. Wu, T.; Wang, G.; Chen, W.; Zhu, Z.; Liu, Y.; Huang, Z.; Huang, Y.; Du, P.; Yang, Y.; Liu, C.-Y.; et al. Co-Inhibition of BET Proteins and NF-KB as a Potential Therapy for Colorectal Cancer through Synergistic Inhibiting MYC and FOXM1 Expressions. *Cell Death Dis* **2018**, 9, 315, doi:10.1038/s41419-018-0354-y.
 455. Calder, J.; Nagelberg, A.; Luu, J.; Lu, D.; Lockwood, W.W. Resistance to BET Inhibitors in Lung Adenocarcinoma Is Mediated by Casein Kinase Phosphorylation of BRD4. *Oncogenesis* **2021**, 10, 27, doi:10.1038/s41389-021-00316-z.
 456. Zhang, P.; Wang, D.; Zhao, Y.; Ren, S.; Gao, K.; Ye, Z.; Wang, S.; Pan, C.-W.; Zhu, Y.; Yan, Y.; et al. Intrinsic BET Inhibitor Resistance in SPOP-Mutated Prostate Cancer Is

- Mediated by BET Protein Stabilization and AKT-MTORC1 Activation. *Nat Med* **2017**, 23, 1055–1062, doi:10.1038/nm.4379.
457. Pawar, A.; Gollavilli, P.N.; Wang, S.; Asangani, I.A. Resistance to BET Inhibitor Leads to Alternative Therapeutic Vulnerabilities in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Rep* **2018**, 22, 2236–2245, doi:10.1016/j.celrep.2018.02.011.
 458. Kurimchak, A.M.; Shelton, C.; Duncan, K.E.; Johnson, K.J.; Brown, J.; O'Brien, S.; Gabbasov, R.; Fink, L.S.; Li, Y.; Lounsbury, N.; et al. Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep* **2016**, 16, 1273–1286, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.091.
 459. Jing, Y.; Zhang, Z.; Ma, P.; An, S.; Shen, Y.; Zhu, L.; Zhuang, G. Concomitant BET and MAPK Blockade for Effective Treatment of Ovarian Cancer. *Oncotarget* **2016**, 7, 2545–2554, doi:10.18632/oncotarget.6309.
 460. Jang, J.E.; Eom, J.-I.; Jeung, H.-K.; Cheong, J.-W.; Lee, J.Y.; Kim, J.S.; Min, Y.H. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Clin Cancer Res* **2017**, 23, 2781–2794, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1903.
 461. Jang, J.E.; Eom, J.-I.; Jeung, H.-K.; Cheong, J.-W.; Lee, J.Y.; Kim, J.S.; Min, Y.H. Targeting AMPK-ULK1-Mediated Autophagy for Combating BET Inhibitor Resistance in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Autophagy* **2017**, 13, 761–762, doi:10.1080/15548627.2016.1278328.
 462. Shu, S.; Polyak, K. BET Bromodomain Proteins as Cancer Therapeutic Targets. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2016**, 81, 123–129, doi:10.1101/sqb.2016.81.030908.
 463. Wang, W.; Tang, Y.-A.; Xiao, Q.; Lee, W.C.; Cheng, B.; Niu, Z.; Oguz, G.; Feng, M.; Lee, P.L.; Li, B.; et al. Stromal Induction of BRD4 Phosphorylation Results in Chromatin Remodeling and BET Inhibitor Resistance in Colorectal Cancer. *Nat Commun* **2021**, 12, 4441, doi:10.1038/s41467-021-24687-4.
 464. Wu, S.-Y.; Lee, A.-Y.; Lai, H.-T.; Zhang, H.; Chiang, C.-M. Phospho Switch Triggers Brd4 Chromatin Binding and Activator Recruitment for Gene-Specific Targeting. *Mol Cell* **2013**, 49, 843–857, doi:10.1016/j.molcel.2012.12.006.
 465. Dai, X.; Gan, W.; Li, X.; Wang, S.; Zhang, W.; Huang, L.; Liu, S.; Zhong, Q.; Guo, J.; Zhang, J.; et al. Prostate Cancer-Associated SPOP Mutations Confer Resistance to BET Inhibitors through Stabilization of BRD4. *Nat Med* **2017**, 23, 1063–1071, doi:10.1038/nm.4378.
 466. Johnson, G.L.; Stuhlmiller, T.J.; Angus, S.P.; Zawistowski, J.S.; Graves, L.M. Molecular Pathways: Adaptive Kinome Reprogramming in Response to Targeted Inhibition of the BRAF-MEK-ERK Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* **2014**, 20, 2516–2522, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1081.
 467. Chandarlapaty, S.; Sawai, A.; Scaltriti, M.; Rodrik-Outmezguine, V.; Grbovic-Huezo, O.; Serra, V.; Majumder, P.K.; Baselga, J.; Rosen, N. AKT Inhibition Relieves Feedback Suppression of Receptor Tyrosine Kinase Expression and Activity. *Cancer Cell* **2011**, 19, 58–71, doi:10.1016/j.ccr.2010.10.031.
 468. Duncan, J.S.; Whittle, M.C.; Nakamura, K.; Abell, A.N.; Midland, A.A.; Zawistowski, J.S.; Johnson, N.L.; Granger, D.A.; Jordan, N.V.; Darr, D.B.; et al. Dynamic Reprogramming of the Kinome in Response to Targeted MEK Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell* **2012**, 149, 307–321, doi:10.1016/j.cell.2012.02.053.
 469. Nazarian, R.; Shi, H.; Wang, Q.; Kong, X.; Koya, R.C.; Lee, H.; Chen, Z.; Lee, M.-K.; Attar, N.; Sazegar, H.; et al. Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation. *Nature* **2010**, 468, 973–977, doi:10.1038/nature09626.
 470. Sun, C.; Hobor, S.; Bertotti, A.; Zecchin, D.; Huang, S.; Galimi, F.; Cottino, F.; Prahallad, A.; Grenrum, W.; Tzani, A.; et al. Intrinsic Resistance to MEK Inhibition in

- KRAS Mutant Lung and Colon Cancer through Transcriptional Induction of ERBB3. *Cell Rep* **2014**, 7, 86–93, doi:10.1016/j.celrep.2014.02.045.
471. D, D.; Sg, M.; Gl, W.; Hw, L. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. *Cells* **2020**, 9, doi:10.3390/cells9092114.
 472. Terao, T.; Minami, Y. Targeting Hedgehog (Hh) Pathway for the Acute Myeloid Leukemia Treatment. *Cells* **2019**, 8, E312, doi:10.3390/cells8040312.
 473. Vidal, V. [Inhibitors of the Hedgehog signalling pathway: hope for the treatment of basal cell carcinoma]. *Med Sci (Paris)* **2010**, 26, 231–233, doi:10.1051/medsci/2010263231.
 474. Schreyer, E.; Barthélémy, P.; Cottard, F.; Ould Madi-Berthélémy, P.; Schaff-Wendling, F.; Kurtz, J.-E.; Céraline, J. [Androgen receptor variants in prostate cancer]. *Med Sci (Paris)* **2017**, 33, 758–764, doi:10.1051/medsci/20173308021.
 475. Chung, C.; Abboud, K. Targeting the Androgen Receptor Signaling Pathway in Advanced Prostate Cancer. *Am J Health Syst Pharm* **2022**, 79, 1224–1235, doi:10.1093/ajhp/zxac105.
 476. Peng, C.; Ouyang, Y.; Lu, N.; Li, N. The NF-KB Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Frontiers in Immunology* **2020**, 11.
 477. Ambrosini, G.; Do, C.; Tycko, B.; Realubit, R.B.; Karan, C.; Musi, E.; Carvajal, R.D.; Chua, V.; Aplin, A.E.; Schwartz, G.K. Inhibition of NF-KB–Dependent Signaling Enhances Sensitivity and Overcomes Resistance to BET Inhibition in Uveal Melanoma. *Cancer Res* **2019**, 79, 2415–2425, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3177.
 478. Ling, Y.-H.; Liebes, L.; Ng, B.; Buckley, M.; Elliott, P.J.; Adams, J.; Jiang, J.-D.; Muggia, F.M.; Perez-Soler, R. PS-341, a Novel Proteasome Inhibitor, Induces Bcl-2 Phosphorylation and Cleavage in Association with G2-M Phase Arrest and Apoptosis. *Mol Cancer Ther* **2002**, 1, 841–849.
 479. Hishiki, K.; Akiyama, M.; Kanegae, Y.; Ozaki, K.; Ohta, M.; Tsuchitani, E.; Kaito, K.; Yamada, H. NF-KB Signaling Activation via Increases in BRD2 and BRD4 Confers Resistance to the Bromodomain Inhibitor I-BET151 in U937 Cells. *Leukemia Research* **2018**, 74, 57–63, doi:10.1016/j.leukres.2018.09.016.
 480. Ma, S.; Meng, Z.; Chen, R.; Guan, K.-L. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual Review of Biochemistry* **2019**, 88, 577–604, doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111829.
 481. Werneburg, N.; Gores, G.J.; Smoot, R.L. The Hippo Pathway and YAP Signaling: Emerging Concepts in Regulation, Signaling, and Experimental Targeting Strategies With Implications for Hepatobiliary Malignancies. *Gene Expr* **2020**, 20, 67–74, doi:10.3727/105221619X15617324583639.
 482. Gobbi, G.; Donati, B.; Do Valle, I.F.; Reggiani, F.; Torricelli, F.; Remondini, D.; Castellani, G.; Ambrosetti, D.C.; Ciarrocchi, A.; Sancisi, V. The Hippo Pathway Modulates Resistance to BET Proteins Inhibitors in Lung Cancer Cells. *Oncogene* **2019**, 38, 6801–6817, doi:10.1038/s41388-019-0924-1.
 483. Markman, B.; Dienstmann, R.; Tabernero, J. Targeting the PI3K/Akt/MTOR Pathway—beyond Rapalogs. *Oncotarget* **2010**, 1, 530–543, doi:10.18632/oncotarget.101012.
 484. Iniguez, A.B.; Alexe, G.; Wang, E.J.; Roti, G.; Patel, S.; Chen, L.; Kitara, S.; Conway, A.; Robichaud, A.L.; Stolte, B.; et al. Resistance to Epigenetic-Targeted Therapy Engenders Tumor Cell Vulnerabilities Associated with Enhancer Remodeling. *Cancer Cell* **2018**, 34, 922–938.e7, doi:10.1016/j.ccell.2018.11.005.
 485. Loganathan, S.N.; Tang, N.; Holler, A.E.; Wang, N.; Wang, J. Targeting the IGF1R/PI3K/AKT Pathway Sensitizes Ewing Sarcoma to BET Bromodomain Inhibitors.

- Molecular Cancer Therapeutics* **2019**, *18*, 929–936, doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1151.
486. Santarpia, L.; Lippman, S.M.; El-Naggar, A.K. Targeting the MAPK-RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets* **2012**, *16*, 103–119, doi:10.1517/14728222.2011.645805.
 487. Muzny, D.M.; Bainbridge, M.N.; Chang, K.; Dinh, H.H.; Drummond, J.A.; Fowler, G.; Kovar, C.L.; Lewis, L.R.; Morgan, M.B.; Newsham, I.F.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* **2012**, *487*, 330–337, doi:10.1038/nature11252.
 488. Deng, Y.; Yu, C.; Chen, L.; Zhang, X.; Lei, Q.; Liu, Q.; Cai, G.; Liu, F. ARV-771 Acts as an Inducer of Cell Cycle Arrest and Apoptosis to Suppress Hepatocellular Carcinoma Progression. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 858901, doi:10.3389/fphar.2022.858901.
 489. Wyce, A.; Matteo, J.J.; Foley, S.W.; Felitsky, D.J.; Rajapurkar, S.R.; Zhang, X.-P.; Musso, M.C.; Korenchuk, S.; Karpnich, N.O.; Keenan, K.M.; et al. MEK Inhibitors Overcome Resistance to BET Inhibition across a Number of Solid and Hematologic Cancers. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 1–12, doi:10.1038/s41389-018-0043-9.
 490. Degenhardt, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Bray, K.; Anderson, D.; Chen, G.; Mukherjee, C.; Shi, Y.; Gélinas, C.; Fan, Y.; et al. Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Restricts Necrosis, Inflammation, and Tumorigenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 51–64, doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001.
 491. Parzych, K.R.; Klionsky, D.J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* **2014**, *20*, 460–473, doi:10.1089/ars.2013.5371.
 492. Massey, A.; Kiffin, R.; Cuervo, A.M. Pathophysiology of Chaperone-Mediated Autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**, *36*, 2420–2434, doi:10.1016/j.biocel.2004.04.010.
 493. Mijaljica, D.; Prescott, M.; Devenish, R.J. The Intriguing Life of Autophagosomes. *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 3618–3635, doi:10.3390/ijms13033618.
 494. Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. Autophagy: Molecular Machinery for Self-Eating. *Cell Death Differ* **2005**, *12 Suppl 2*, 1542–1552, doi:10.1038/sj.cdd.4401765.
 495. Control of Basal Autophagy Rate by Vacuolar Peduncle - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30735514/> (accessed on 30 August 2022).
 496. Basal Autophagy Prevents Autoactivation or Enhancement of Inflammatory Signals by Targeting Monomeric MyD88 | Scientific Reports Available online: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-01246-w> (accessed on 30 August 2022).
 497. Daussy, C.F.; Espert, L. L'autophagie Sélective Au Cours Des Infections Virales. *Virologie (Montrouge)* **2016**, *20*, 196–206, doi:10.1684/vir.2016.0665.
 498. Mancias, J.D.; Kimmelman, A.C. Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J Mol Biol* **2016**, *428*, 1659–1680, doi:10.1016/j.jmb.2016.02.027.
 499. Khaminets, A.; Behl, C.; Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol* **2016**, *26*, 6–16, doi:10.1016/j.tcb.2015.08.010.
 500. Camuzard, O.; Santucci-Darmanin, S.; Carle, G.F.; Pierrefite-Carle, V. Role of Autophagy in Osteosarcoma. *J Bone Oncol* **2019**, *16*, 100235, doi:10.1016/j.jbo.2019.100235.
 501. Demeter, A.; Romero-Mulero, M.C.; Csabai, L.; Ölbei, M.; Sudhakar, P.; Haerty, W.; Korcsmáros, T. ULK1 and ULK2 Are Less Redundant than Previously Thought: Computational Analysis Uncovers Distinct Regulation and Functions of These Autophagy Induction Proteins. *Sci Rep* **2020**, *10*, 10940, doi:10.1038/s41598-020-67780-2.

502. Jung, C.H.; Jun, C.B.; Ro, S.-H.; Kim, Y.-M.; Otto, N.M.; Cao, J.; Kundu, M.; Kim, D.-H. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate MTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1992–2003, doi:10.1091/mbc.e08-12-1249.
503. Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; et al. Nutrient-Dependent MTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1981–1991, doi:10.1091/mbc.e08-12-1248.
504. Foretz, M.; Taleux, N.; Guigas, B.; Horman, S.; Beauloye, C.; Andreelli, F.; Bertrand, L.; Viollet, B. Régulation Du Métabolisme Énergétique Par l'AMPK: Une Nouvelle Voie Thérapeutique Pour Le Traitement Des Maladies Métaboliques et Cardiaques. *Med Sci (Paris)* **2006**, *22*, 381–388, doi:10.1051/medsci/2006224381.
505. Viollet, B.; Foretz, M. [« Self-eating » to survive - coordinated regulation of autophagy by nutrients]. *Med Sci (Paris)* **2011**, *27*, 569–571, doi:10.1051/medsci/2011276002.
506. Wang, Y.; Liu, Z.; Shu, S.; Cai, J.; Tang, C.; Dong, Z. AMPK/MTOR Signaling in Autophagy Regulation During Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *Front Physiol* **2020**, *11*, 619730, doi:10.3389/fphys.2020.619730.
507. Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.-L. AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **2011**, *13*, 132–141, doi:10.1038/ncb2152.
508. Wong, A.S.L.; Cheung, Z.H.; Ip, N.Y. Molecular Machinery of Macroautophagy and Its Deregulation in Diseases. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1812*, 1490–1497, doi:10.1016/j.bbadis.2011.07.005.
509. Lee, Y.-H.; Kim, J.; Park, K.; Lee, M.-S. β -Cell Autophagy: Mechanism and Role in β -Cell Dysfunction. *Mol Metab* **2019**, *27S*, S92–S103, doi:10.1016/j.molmet.2019.06.014.
510. Ohsumi, Y.; Mizushima, N. Two Ubiquitin-like Conjugation Systems Essential for Autophagy. *Semin Cell Dev Biol* **2004**, *15*, 231–236, doi:10.1016/j.semcdb.2003.12.004.
511. Shpilka, T.; Mizushima, N.; Elazar, Z. Ubiquitin-like Proteins and Autophagy at a Glance. *J Cell Sci* **2012**, *125*, 2343–2348, doi:10.1242/jcs.093757.
512. Chavez-Dominguez, R.; Perez-Medina, M.; Lopez-Gonzalez, J.S.; Galicia-Velasco, M.; Aguilar-Cazares, D. The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-Tumor Activity. *Front Oncol* **2020**, *10*, 578418, doi:10.3389/fonc.2020.578418.
513. Das, C.K.; Banerjee, I.; Mandal, M. Pro-Survival Autophagy: An Emerging Candidate of Tumor Progression through Maintaining Hallmarks of Cancer. *Seminars in Cancer Biology* **2020**, *66*, 59–74, doi:10.1016/j.semcancer.2019.08.020.
514. Liang, X.H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. Induction of Autophagy and Inhibition of Tumorigenesis by Beclin 1. *Nature* **1999**, *402*, 672–676, doi:10.1038/45257.
515. Yue, Z.; Jin, S.; Yang, C.; Levine, A.J.; Heintz, N. Beclin 1, an Autophagy Gene Essential for Early Embryonic Development, Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 15077–15082, doi:10.1073/pnas.2436255100.
516. Qu, X.; Yu, J.; Bhagat, G.; Furuya, N.; Hibshoosh, H.; Troxel, A.; Rosen, J.; Eskelinen, E.-L.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; et al. Promotion of Tumorigenesis by Heterozygous Disruption of the Beclin 1 Autophagy Gene. *J Clin Invest* **2003**, *112*, 1809–1820, doi:10.1172/JCI20039.
517. Kung, C.-P.; Budina, A.; Balaburski, G.; Bergenstock, M.K.; Murphy, M. Autophagy in Tumor Suppression and Cancer Therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2011**, *21*, 71–100, doi:10.1615/critreveukargeneexpr.v21.i1.50.

518. Kang, M.R.; Kim, M.S.; Oh, J.E.; Kim, Y.R.; Song, S.Y.; Kim, S.S.; Ahn, C.H.; Yoo, N.J.; Lee, S.H. Frameshift Mutations of Autophagy-Related Genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in Gastric and Colorectal Cancers with Microsatellite Instability. *J Pathol* **2009**, *217*, 702–706, doi:10.1002/path.2509.
519. Takamura, A.; Komatsu, M.; Hara, T.; Sakamoto, A.; Kishi, C.; Waguri, S.; Eishi, Y.; Hino, O.; Tanaka, K.; Mizushima, N. Autophagy-Deficient Mice Develop Multiple Liver Tumors. *Genes Dev* **2011**, *25*, 795–800, doi:10.1101/gad.2016211.
520. Mortensen, M.; Soilleux, E.J.; Djordjevic, G.; Tripp, R.; Lutteropp, M.; Sadighi-Akha, E.; Stranks, A.J.; Glanville, J.; Knight, S.; Jacobsen, S.-E.W.; et al. The Autophagy Protein Atg7 Is Essential for Hematopoietic Stem Cell Maintenance. *J Exp Med* **2011**, *208*, 455–467, doi:10.1084/jem.20101145.
521. L'autophagie : Le Yin et Le Yang Des Cancers | Médecine/Sciences Available online: https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2017/03/medsci20173303p328/medsci20173303p328.html (accessed on 9 January 2023).
522. Green, D.R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Mitochondria and the Autophagy-Inflammation-Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science* **2011**, *333*, 1109–1112, doi:10.1126/science.1201940.
523. Levine, B.; Mizushima, N.; Virgin, H.W. Autophagy in Immunity and Inflammation. *Nature* **2011**, *469*, 323–335, doi:10.1038/nature09782.
524. Mathew, R.; Karp, C.M.; Beaudoin, B.; Vuong, N.; Chen, G.; Chen, H.-Y.; Bray, K.; Reddy, A.; Bhanot, G.; Gelinas, C.; et al. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of P62. *Cell* **2009**, *137*, 1062–1075, doi:10.1016/j.cell.2009.03.048.
525. Puissant, A.; Fenouille, N.; Auberger, P. When Autophagy Meets Cancer through P62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* **2012**, *2*, 397–413.
526. Pérez-Mancera, P.A.; Young, A.R.J.; Narita, M. Inside and out: The Activities of Senescence in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2014**, *14*, 547–558, doi:10.1038/nrc3773.
527. Patel, N.H.; Bloukh, S.; Alwohosh, E.; Alhesa, A.; Saleh, T.; Gewirtz, D.A. Autophagy and Senescence in Cancer Therapy. *Adv Cancer Res* **2021**, *150*, 1–74, doi:10.1016/bs.acr.2021.01.002.
528. Ivanov, A.; Pawlikowski, J.; Manoharan, I.; van Tuyn, J.; Nelson, D.M.; Rai, T.S.; Shah, P.P.; Hewitt, G.; Korolchuk, V.I.; Passos, J.F.; et al. Lysosome-Mediated Processing of Chromatin in Senescence. *J Cell Biol* **2013**, *202*, 129–143, doi:10.1083/jcb.201212110.
529. White, E. The Role for Autophagy in Cancer. *J Clin Invest* **2015**, *125*, 42–46, doi:10.1172/JCI73941.
530. Guo, J.Y.; Xia, B.; White, E. Autophagy-Mediated Tumor Promotion. *Cell* **2013**, *155*, 1216–1219, doi:10.1016/j.cell.2013.11.019.
531. Singh, R.; Cuervo, A.M. Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metab* **2011**, *13*, 495–504, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.004.
532. Guo, J.Y.; Chen, H.-Y.; Mathew, R.; Fan, J.; Strohecker, A.M.; Karsli-Uzunbas, G.; Kamphorst, J.J.; Chen, G.; Lemons, J.M.S.; Karantza, V.; et al. Activated Ras Requires Autophagy to Maintain Oxidative Metabolism and Tumorigenesis. *Genes Dev* **2011**, *25*, 460–470, doi:10.1101/gad.2016311.
533. Hashimoto, D.; Bläuer, M.; Hirota, M.; Ikonen, N.H.; Sand, J.; Laukkanen, J. Autophagy Is Needed for the Growth of Pancreatic Adenocarcinoma and Has a Cytoprotective Effect against Anticancer Drugs. *Eur J Cancer* **2014**, *50*, 1382–1390, doi:10.1016/j.ejca.2014.01.011.
534. Rouschop, K.M.A.; van den Beucken, T.; Dubois, L.; Niessen, H.; Bussink, J.; Savelkoul, K.; Keulers, T.; Mujcic, H.; Landuyt, W.; Voncken, J.W.; et al. The Unfolded Protein Response Protects Human Tumor Cells during Hypoxia through Regulation of the

- Autophagy Genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* **2010**, *120*, 127–141, doi:10.1172/JCI40027.
535. Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 961–967, doi:10.1038/nrc2254.
 536. Abedin, M.J.; Wang, D.; McDonnell, M.A.; Lehmann, U.; Kelekar, A. Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage. *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 500–510, doi:10.1038/sj.cdd.4402039.
 537. Yang, Y.; Xing, D.; Zhou, F.; Chen, Q. Mitochondrial Autophagy Protects against Heat Shock-Induced Apoptosis through Reducing Cytosolic Cytochrome c Release and Downstream Caspase-3 Activation. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *395*, 190–195, doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.155.
 538. Xie, X.; White, E.P.; Mehnert, J.M. Coordinate Autophagy and MTOR Pathway Inhibition Enhances Cell Death in Melanoma. *PLoS One* **2013**, *8*, e55096, doi:10.1371/journal.pone.0055096.
 539. Du, J.; Teng, R.-J.; Guan, T.; Eis, A.; Kaul, S.; Konduri, G.G.; Shi, Y. Role of Autophagy in Angiogenesis in Aortic Endothelial Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012**, *302*, C383–391, doi:10.1152/ajpcell.00164.2011.
 540. Sachdev, U.; Cui, X.; Hong, G.; Namkoong, S.; Karlsson, J.M.; Baty, C.J.; Tzeng, E. High Mobility Group Box 1 Promotes Endothelial Cell Angiogenic Behavior in Vitro and Improves Muscle Perfusion in Vivo in Response to Ischemic Injury. *J Vasc Surg* **2012**, *55*, 180–191, doi:10.1016/j.jvs.2011.07.072.
 541. Kang, R.; Livesey, K.M.; Zeh, H.J.; Loze, M.T.; Tang, D. HMGB1: A Novel Beclin 1-Binding Protein Active in Autophagy. *Autophagy* **2010**, *6*, 1209–1211, doi:10.4161/auto.6.8.13651.
 542. Poillet-Perez, L.; White, E. Role of Tumor and Host Autophagy in Cancer Metabolism. *Genes Dev* **2019**, *33*, 610–619, doi:10.1101/gad.325514.119.
 543. Karsli-Uzunbas, G.; Guo, J.Y.; Price, S.; Teng, X.; Laddha, S.V.; Khor, S.; Kalaany, N.Y.; Jacks, T.; Chan, C.S.; Rabinowitz, J.D.; et al. Autophagy Is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer Discov* **2014**, *4*, 914–927, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0363.
 544. Lock, R.; Roy, S.; Kenific, C.M.; Su, J.S.; Salas, E.; Ronen, S.M.; Debnath, J. Autophagy Facilitates Glycolysis during Ras-Mediated Oncogenic Transformation. *Mol Biol Cell* **2011**, *22*, 165–178, doi:10.1091/mbc.E10-06-0500.
 545. Poillet-Perez, L.; Xie, X.; Zhan, L.; Yang, Y.; Sharp, D.W.; Hu, Z.S.; Su, X.; Maganti, A.; Jiang, C.; Lu, W.; et al. Autophagy Maintains Tumour Growth through Circulating Arginine. *Nature* **2018**, *563*, 569–573, doi:10.1038/s41586-018-0697-7.
 546. Karvela, M.; Baquero, P.; Kuntz, E.M.; Mukhopadhyay, A.; Mitchell, R.; Allan, E.K.; Chan, E.; Kranc, K.R.; Calabretta, B.; Salomoni, P.; et al. ATG7 Regulates Energy Metabolism, Differentiation and Survival of Philadelphia-Chromosome-Positive Cells. *Autophagy* **2016**, *12*, 936–948, doi:10.1080/15548627.2016.1162359.
 547. Polishchuk, E.V.; Merolla, A.; Lichtmanegger, J.; Romano, A.; Indrieri, A.; Ilyechova, E.Y.; Concilli, M.; De Cegli, R.; Crispino, R.; Mariniello, M.; et al. Activation of Autophagy, Observed in Liver Tissues From Patients With Wilson Disease and From ATP7B-Deficient Animals, Protects Hepatocytes From Copper-Induced Apoptosis. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1173–1189.e5, doi:10.1053/j.gastro.2018.11.032.
 548. Strohecker, A.M.; Guo, J.Y.; Karsli-Uzunbas, G.; Price, S.M.; Chen, G.J.; Mathew, R.; McMahon, M.; White, E. Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of BrafV600E-Driven Lung Tumors. *Cancer Discov* **2013**, *3*, 1272–1285, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0397.

549. Saito, T.; Kuma, A.; Sugiura, Y.; Ichimura, Y.; Obata, M.; Kitamura, H.; Okuda, S.; Lee, H.-C.; Ikeda, K.; Kanegae, Y.; et al. Autophagy Regulates Lipid Metabolism through Selective Turnover of NCoR1. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1567, doi:10.1038/s41467-019-08829-3.
550. Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21883043/> (accessed on 9 January 2023).
551. Nitta, T.; Sato, Y.; Ren, X.S.; Harada, K.; Sasaki, M.; Hirano, S.; Nakanuma, Y. Autophagy May Promote Carcinoma Cell Invasion and Correlate with Poor Prognosis in Cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **2014**, *7*, 4913–4921.
552. Kim, Y.H.; Baek, S.H.; Kim, E.K.; Ha, J.M.; Jin, S.Y.; Lee, H.S.; Ha, H.K.; Song, S.H.; Kim, S.J.; Shin, H.K.; et al. Uncoordinated 51-like Kinase 2 Signaling Pathway Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in A549 Lung Cancer Cells. *FEBS Lett* **2016**, *590*, 1365–1374, doi:10.1002/1873-3468.12172.
553. Peng, Y.-F.; Shi, Y.-H.; Ding, Z.-B.; Ke, A.-W.; Gu, C.-Y.; Hui, B.; Zhou, J.; Qiu, S.-J.; Dai, Z.; Fan, J. Autophagy Inhibition Suppresses Pulmonary Metastasis of HCC in Mice via Impairing Anoikis Resistance and Colonization of HCC Cells. *Autophagy* **2013**, *9*, 2056–2068, doi:10.4161/auto.26398.
554. Promoting Colonization in Metastatic HCC Cells by Modulation of Autophagy - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058558/> (accessed on 9 January 2023).
555. Zitvogel, L.; Kepp, O.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Inflammasomes in Carcinogenesis and Anticancer Immune Responses. *Nat Immunol* **2012**, *13*, 343–351, doi:10.1038/ni.2224.
556. Grassi, G.; Di Caprio, G.; Santangelo, L.; Fimia, G.M.; Cozzolino, A.M.; Komatsu, M.; Ippolito, G.; Tripodi, M.; Alonzi, T. Autophagy Regulates Hepatocyte Identity and Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transitions Promoting Snail Degradation. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1880, doi:10.1038/cddis.2015.249.
557. Qin, W.; Li, C.; Zheng, W.; Guo, Q.; Zhang, Y.; Kang, M.; Zhang, B.; Yang, B.; Li, B.; Yang, H.; et al. Inhibition of Autophagy Promotes Metastasis and Glycolysis by Inducing ROS in Gastric Cancer Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 39839–39854, doi:10.18632/oncotarget.5674.
558. Gong, C.; Bauvy, C.; Tonelli, G.; Yue, W.; Deloménie, C.; Nicolas, V.; Zhu, Y.; Domergue, V.; Marin-Esteban, V.; Tharinger, H.; et al. Beclin 1 and Autophagy Are Required for the Tumorigenicity of Breast Cancer Stem-like/Progenitor Cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 2261–2272, 2272e.1–11, doi:10.1038/onc.2012.252.
559. Wolf, J.; Dewi, D.L.; Fredebohm, J.; Müller-Decker, K.; Flechtenmacher, C.; Hoheisel, J.D.; Boettcher, M. A Mammosphere Formation RNAi Screen Reveals That ATG4A Promotes a Breast Cancer Stem-like Phenotype. *Breast Cancer Res* **2013**, *15*, R109, doi:10.1186/bcr3576.
560. Washington, M.N.; Suh, G.; Orozco, A.F.; Sutton, M.N.; Yang, H.; Wang, Y.; Mao, W.; Millward, S.; Ornelas, A.; Atkinson, N.; et al. ARHI (DIRAS3)-Mediated Autophagy-Associated Cell Death Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Ovarian Cancer Cell Lines and Xenografts. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1836, doi:10.1038/cddis.2015.208.
561. Viale, A.; Pettazzoni, P.; Lyssiotis, C.A.; Ying, H.; Sánchez, N.; Marchesini, M.; Carugo, A.; Green, T.; Seth, S.; Giuliani, V.; et al. Oncogene Ablation-Resistant Pancreatic Cancer Cells Depend on Mitochondrial Function. *Nature* **2014**, *514*, 628–632, doi:10.1038/nature13611.

562. Li, F.; Yang, C.; Zhang, H.-B.; Ma, J.; Jia, J.; Tang, X.; Zeng, J.; Chong, T.; Wang, X.; He, D.; et al. BET Inhibitor JQ1 Suppresses Cell Proliferation via Inducing Autophagy and Activating LKB1/AMPK in Bladder Cancer Cells. *Cancer Med* **2019**, *8*, 4792–4805, doi:10.1002/cam4.2385.
563. Gump, J.M.; Thorburn, A. Autophagy and Apoptosis: What Is the Connection? *Trends Cell Biol* **2011**, *21*, 387–392, doi:10.1016/j.tcb.2011.03.007.
564. Kang, R.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T.; Tang, D. The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cell Death Differ* **2011**, *18*, 571–580, doi:10.1038/cdd.2010.191.
565. Ciechomska, I.A.; Goemans, G.C.; Skepper, J.N.; Tolkovsky, A.M. Bcl-2 Complexed with Beclin-1 Maintains Full Anti-Apoptotic Function. *Oncogene* **2009**, *28*, 2128–2141, doi:10.1038/onc.2009.60.
566. Moscat, J.; Diaz-Meco, M.T. P62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* **2009**, *137*, 1001–1004, doi:10.1016/j.cell.2009.05.023.
567. Dikic, I.; Johansen, T.; Kirkin, V. Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Cancer Res* **2010**, *70*, 3431–3434, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4027.
568. Norman, J.M.; Cohen, G.M.; Bampton, E.T.W. The in Vitro Cleavage of the HAtg Proteins by Cell Death Proteases. *Autophagy* **2010**, *6*, 1042–1056, doi:10.4161/auto.6.8.13337.
569. Jin, Z.; Li, Y.; Pitti, R.; Lawrence, D.; Pham, V.C.; Lill, J.R.; Ashkenazi, A. Cullin3-Based Polyubiquitination and P62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **2009**, *137*, 721–735, doi:10.1016/j.cell.2009.03.015.
570. Kondo, Y.; Kanzawa, T.; Sawaya, R.; Kondo, S. The Role of Autophagy in Cancer Development and Response to Therapy. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 726–734, doi:10.1038/nrc1692.
571. Zhou, P.; Li, Y.; Li, B.; Zhang, M.; Xu, C.; Liu, F.; Bian, L.; Liu, Y.; Yao, Y.; Li, D. Autophagy Inhibition Enhances Celecoxib-Induced Apoptosis in Osteosarcoma. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 997–1006, doi:10.1080/15384101.2018.1467677.
572. Zhang, H.; Lei, Y.; Yuan, P.; Li, L.; Luo, C.; Gao, R.; Tian, J.; Feng, Z.; Nice, E.C.; Sun, J. ROS-Mediated Autophagy Induced by Dysregulation of Lipid Metabolism Plays a Protective Role in Colorectal Cancer Cells Treated with Gambogic Acid. *PLoS One* **2014**, *9*, e96418, doi:10.1371/journal.pone.0096418.
573. Shi, Y.; Tang, B.; Yu, P.-W.; Tang, B.; Hao, Y.-X.; Lei, X.; Luo, H.-X.; Zeng, D.-Z. Autophagy Protects against Oxaliplatin-Induced Cell Death via ER Stress and ROS in Caco-2 Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e51076, doi:10.1371/journal.pone.0051076.
574. Li, J.; Hou, N.; Faried, A.; Tsutsumi, S.; Takeuchi, T.; Kuwano, H. Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Ann Surg Oncol* **2009**, *16*, 761–771, doi:10.1245/s10434-008-0260-0.
575. Li, J.; Hou, N.; Faried, A.; Tsutsumi, S.; Kuwano, H. Inhibition of Autophagy Augments 5-Fluorouracil Chemotherapy in Human Colon Cancer in Vitro and in Vivo Model. *Eur J Cancer* **2010**, *46*, 1900–1909, doi:10.1016/j.ejca.2010.02.021.
576. Liu, D.; Yang, Y.; Liu, Q.; Wang, J. Inhibition of Autophagy by 3-MA Potentiates Cisplatin-Induced Apoptosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Med Oncol* **2011**, *28*, 105–111, doi:10.1007/s12032-009-9397-3.
577. Bijnsdorp, I.V.; Peters, G.J.; Temmink, O.H.; Fukushima, M.; Kruyt, F.A. Differential Activation of Cell Death and Autophagy Results in an Increased Cytotoxic Potential for Trifluorothymidine Compared to 5-Fluorouracil in Colon Cancer Cells. *Int J Cancer* **2010**, *126*, 2457–2468, doi:10.1002/ijc.24943.

578. Paton, E.L.; Turner, J.A.; Schlaepfer, I.R. Overcoming Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutated Tumours. *J Oncol* **2020**, *2020*, 1079827, doi:10.1155/2020/1079827.
579. Saputra, E.C.; Huang, L.; Chen, Y.; Tucker-Kellogg, L. Combination Therapy and the Evolution of Resistance: The Theoretical Merits of Synergism and Antagonism in Cancer. *Cancer Res* **2018**, *78*, 2419–2431, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1201.
580. Hill, J.A.; Cowen, L.E. Using Combination Therapy to Thwart Drug Resistance. *Future Microbiol* **2015**, *10*, 1719–1726, doi:10.2217/fmb.15.68.
581. Echevarría-Vargas, I.M.; Reyes-Uribe, P.I.; Guterres, A.N.; Yin, X.; Kossenkov, A.V.; Liu, Q.; Zhang, G.; Krepler, C.; Cheng, C.; Wei, Z.; et al. Co-targeting BET and MEK as Salvage Therapy for MAPK and Checkpoint Inhibitor-resistant Melanoma. *EMBO Mol Med* **2018**, *10*, doi:10.15252/emmm.201708446.
582. Funck-Brentano, E.; Vizlin-Hodzic, D.; Nilsson, J.A.; Nilsson, L.M. BET Bromodomain Inhibitor HMBA Synergizes with MEK Inhibition in Treatment of Malignant Glioma. *Epigenetics* **2021**, *16*, 54–63, doi:10.1080/15592294.2020.1786319.
583. Zhu, X.; Holmsen, E.; Park, S.; Willingham, M.C.; Qi, J.; Cheng, S.-Y. Synergistic Effects of BET and MEK Inhibitors Promote Regression of Anaplastic Thyroid Tumors. *Oncotarget* **2018**, *9*, 35408–35421, doi:10.18632/oncotarget.26253.
584. Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 621–681, doi:10.1124/pr.58.3.10.
585. Sales Gil, R.; Vagnarelli, P. Ki-67: More Hidden behind a “Classic Proliferation Marker.” *Trends Biochem Sci* **2018**, *43*, 747–748, doi:10.1016/j.tibs.2018.08.004.
586. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890, doi:10.1093/bioinformatics/bty560.
587. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
588. Garrido-Martín, D.; Palumbo, E.; Guigó, R.; Breschi, A. Ggsashimi: Sashimi Plot Revised for Browser- and Annotation-Independent Splicing Visualization. *PLoS Comput Biol* **2018**, *14*, e1006360, doi:10.1371/journal.pcbi.1006360.
589. Bray, N.L.; Pimentel, H.; Melsted, P.; Pachter, L. Near-Optimal Probabilistic RNA-Seq Quantification. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 525–527, doi:10.1038/nbt.3519.
590. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
591. Yu, G.; Wang, L.-G.; Han, Y.; He, Q.-Y. ClusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* **2012**, *16*, 284–287, doi:10.1089/omi.2011.0118.
592. Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 2847–2849, doi:10.1093/bioinformatics/btw313.
593. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.journal* **2011**, *17*, 10–12, doi:10.14806/ej.17.1.200.
594. Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
595. Smith, T.; Heger, A.; Sudbery, I. UMI-Tools: Modeling Sequencing Errors in Unique Molecular Identifiers to Improve Quantification Accuracy. *Genome Res* **2017**, *27*, 491–499, doi:10.1101/gr.209601.116.

596. Patro, R.; Duggal, G.; Love, M.I.; Irizarry, R.A.; Kingsford, C. Salmon: Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression Using Dual-Phase Inference. *Nat Methods* **2017**, *14*, 417–419, doi:10.1038/nmeth.4197.
597. Li, L.; Liu, W.-L.; Su, L.; Lu, Z.-C.; He, X.-S. The Role of Autophagy in Cancer Radiotherapy. *Curr Mol Pharmacol* **2020**, *13*, 31–40, doi:10.2174/1874467212666190809154518.
598. Sui, X.; Chen, R.; Wang, Z.; Huang, Z.; Kong, N.; Zhang, M.; Han, W.; Lou, F.; Yang, J.; Zhang, Q.; et al. Autophagy and Chemotherapy Resistance: A Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e838, doi:10.1038/cddis.2013.350.
599. Luan, W.; Pang, Y.; Li, R.; Wei, X.; Jiao, X.; Shi, J.; Yu, J.; Mao, H.; Liu, P. Akt/MTOR-Mediated Autophagy Confers Resistance To BET Inhibitor JQ1 In Ovarian Cancer. *Onco Targets Ther* **2019**, *12*, 8063–8074, doi:10.2147/OTT.S220267.
600. Li, Y.; Xiang, J.; Zhang, J.; Lin, J.; Wu, Y.; Wang, X. Inhibition of Brd4 by JQ1 Promotes Functional Recovery From Spinal Cord Injury by Activating Autophagy. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, 555591, doi:10.3389/fncel.2020.555591.
601. Dong, Y.; Wu, Y.; Zhao, G.-L.; Ye, Z.-Y.; Xing, C.-G.; Yang, X.-D. Inhibition of Autophagy by 3-MA Promotes Hypoxia-Induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2019**, *23*, 1047–1054, doi:10.26355/eurrev_201902_16992.
602. Sun, Y.; Han, J.; Wang, Z.; Li, X.; Sun, Y.; Hu, Z. Safety and Efficacy of Bromodomain and Extra-Terminal Inhibitors for the Treatment of Hematological Malignancies and Solid Tumors: A Systematic Study of Clinical Trials. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *11*.
603. Mele, L.; del Vecchio, V.; Liccardo, D.; Prisco, C.; Schwerdtfeger, M.; Robinson, N.; Desiderio, V.; Tirino, V.; Papaccio, G.; La Noce, M. The Role of Autophagy in Resistance to Targeted Therapies. *Cancer Treatment Reviews* **2020**, *88*, 102043, doi:10.1016/j.ctrv.2020.102043.
604. Li, Y.-J.; Lei, Y.-H.; Yao, N.; Wang, C.-R.; Hu, N.; Ye, W.-C.; Zhang, D.-M.; Chen, Z.-S. Autophagy and Multidrug Resistance in Cancer. *Chin J Cancer* **2017**, *36*, 52, doi:10.1186/s40880-017-0219-2.
605. Huang, J.; Ni, J.; Liu, K.; Yu, Y.; Xie, M.; Kang, R.; Vernon, P.; Cao, L.; Tang, D. HMGB1 Promotes Drug Resistance in Osteosarcoma. *Cancer Res* **2012**, *72*, 230–238, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2001.
606. Xiao, X.; Wang, W.; Li, Y.; Yang, D.; Li, X.; Shen, C.; Liu, Y.; Ke, X.; Guo, S.; Guo, Z. HSP90AA1-Mediated Autophagy Promotes Drug Resistance in Osteosarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 201, doi:10.1186/s13046-018-0880-6.
607. O'Donovan, T.R.; O'Sullivan, G.C.; McKenna, S.L. Induction of Autophagy by Drug-Resistant Esophageal Cancer Cells Promotes Their Survival and Recovery Following Treatment with Chemotherapeutics. *Autophagy* **2011**, *7*, 509–524, doi:10.4161/auto.7.5.15066.
608. Hogg, S.J.; Newbold, A.; Vervoort, S.J.; Cluse, L.A.; Martin, B.P.; Gregory, G.P.; Lefebvre, M.; Vidacs, E.; Tothill, R.W.; Bradner, J.E.; et al. BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members. *Mol Cancer Ther* **2016**, *15*, 2030–2041, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0924.
609. Wu, V.M.; Mickens, J.; Uskoković, V. Bisphosphonate-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of the Bromodomain Inhibitor JQ1 in the Treatment of Osteosarcoma. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 25887–25904, doi:10.1021/acsami.7b08108.

610. Bid, H.K.; Phelps, D.A.; Xiaio, L.; Guttridge, D.C.; Lin, J.; London, C.; Baker, L.H.; Mo, X.; Houghton, P.J. The Bromodomain BET Inhibitor JQ1 Suppresses Tumor Angiogenesis in Models of Childhood Sarcoma. *Molecular Cancer Therapeutics* **2016**, *15*, 1018–1028, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0567.
611. Kondo, Y.; Kondo, S. Autophagy and Cancer Therapy. *Autophagy* **2006**, *2*, 85–90, doi:10.4161/auto.2.2.2463.
612. Yang, Z.J.; Chee, C.E.; Huang, S.; Sinicrope, F.A. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 1533–1541, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0047.
613. Choi, K.S. Autophagy and Cancer. *Exp Mol Med* **2012**, *44*, 109–120, doi:10.3858/emm.2012.44.2.033.
614. Sakamaki, J.; Wilkinson, S.; Hahn, M.; Tasdemir, N.; O'Prey, J.; Clark, W.; Hedley, A.; Nixon, C.; Long, J.S.; New, M.; et al. Bromodomain Protein BRD4 Is a Transcriptional Repressor of Autophagy and Lysosomal Function. *Molecular Cell* **2017**, *66*, 517–532.e9, doi:10.1016/j.molcel.2017.04.027.
615. Wen, X.; Klionsky, D.J. BRD4 Is a Newly Characterized Transcriptional Regulator That Represses Autophagy and Lysosomal Function. *Autophagy* **2017**, *13*, 1801–1803, doi:10.1080/15548627.2017.1364334.
616. Tsai, F.D.; Lopes, M.S.; Zhou, M.; Court, H.; Ponce, O.; Fiordalisi, J.J.; Gierut, J.J.; Cox, A.D.; Haigis, K.M.; Philips, M.R. K-Ras4A Splice Variant Is Widely Expressed in Cancer and Uses a Hybrid Membrane-Targeting Motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 779–784, doi:10.1073/pnas.1412811112.
617. To, M.D.; Wong, C.E.; Karnezis, A.N.; Del Rosario, R.; Di Lauro, R.; Balmain, A. Kras Regulatory Elements and Exon 4A Determine Mutation Specificity in Lung Cancer. *Nat Genet* **2008**, *40*, 1240–1244, doi:10.1038/ng.211.
618. Lièvre, A.; Blons, H.; Laurent-Puig, P. Oncogenic Mutations as Predictive Factors in Colorectal Cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 3033–3043, doi:10.1038/onc.2010.89.
619. Hobbs, G.A.; Der, C.J.; Rossman, K.L. RAS Isoforms and Mutations in Cancer at a Glance. *Journal of Cell Science* **2016**, *129*, 1287–1292, doi:10.1242/jcs.182873.
620. Meng, M.; Zhong, K.; Jiang, T.; Liu, Z.; Kwan, H.Y.; Su, T. The Current Understanding on the Impact of KRAS on Colorectal Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2021**, *140*, 111717, doi:10.1016/j.biopha.2021.111717.
621. Luo, J. KRAS Mutation in Pancreatic Cancer. *Seminars in Oncology* **2021**, *48*, 10–18, doi:10.1053/j.seminoncol.2021.02.003.
622. Vural, H.; Kurar, E.; Güçlü, E.; Eroğlu, C.; Çelen, E.; ÇINAR AYAN, İ.; Şirin, S.; Elagöz, Ş. KRAS Mutations: A Possible Biomarker for Advanced Prostate Cancer. *Cancer Science & Research* **2018**, *1*, 1–4, doi:10.33425/2639-8478.1019.
623. Karachaliou, N.; Mayo, C.; Costa, C.; Magrí, I.; Gimenez-Capitan, A.; Molina-Vila, M.A.; Rosell, R. KRAS Mutations in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* **2013**, *14*, 205–214, doi:10.1016/j.clcc.2012.09.007.
624. The AACR Project GENIE Consortium; The AACR Project GENIE Consortium; André, F.; Arnedos, M.; Baras, A.S.; Baselga, J.; Bedard, P.L.; Berger, M.F.; Bierkens, M.; Calvo, F.; et al. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discovery* **2017**, *7*, 818–831, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0151.
625. Del Re, M.; Tiseo, M.; Bordi, P.; D'Incecco, A.; Camerini, A.; Petrini, I.; Lucchesi, M.; Inno, A.; Spada, D.; Vasile, E.; et al. Contribution of KRAS Mutations and c.2369C > T (p.T790M) EGFR to Acquired Resistance to EGFR-TKIs in EGFR Mutant NSCLC: A Study on Circulating Tumor DNA. *Oncotarget* **2016**, *8*, 13611–13619, doi:10.18632/oncotarget.6957.

626. Shimamura, T.; Chen, Z.; Soucheray, M.; Carretero, J.; Kikuchi, E.; Tchaicha, J.H.; Gao, Y.; Cheng, K.A.; Cohoon, T.J.; Qi, J.; et al. Efficacy of BET Bromodomain Inhibition in Kras-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **2013**, *19*, 6183–6192, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3904.
627. Jauset, T.; Massó-Vallés, D.; Martínez-Martín, S.; Beaulieu, M.-E.; Foradada, L.; Fiorentino, F.P.; Yokota, J.; Haendler, B.; Siegel, S.; Whitfield, J.R.; et al. BET Inhibition Is an Effective Approach against KRAS-Driven PDAC and NSCLC. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18734–18746, doi:10.18632/oncotarget.24648.
628. Wyce, A.; Matteo, J.J.; Foley, S.W.; Felitsky, D.J.; Rajapurkar, S.R.; Zhang, X.-P.; Musso, M.C.; Korenchuk, S.; Karpnich, N.O.; Keenan, K.M.; et al. MEK Inhibitors Overcome Resistance to BET Inhibition across a Number of Solid and Hematologic Cancers. *Oncogenesis* **2018**, *7*, doi:10.1038/s41389-018-0043-9.
629. Gonçalves, A.C.; Richiardone, E.; Jorge, J.; Polónia, B.; Xavier, C.P.R.; Salaroglio, I.C.; Riganti, C.; Vasconcelos, M.H.; Corbet, C.; Sarmiento-Ribeiro, A.B. Impact of Cancer Metabolism on Therapy Resistance – Clinical Implications. *Drug Resistance Updates* **2021**, *59*, 100797, doi:10.1016/j.drug.2021.100797.
630. Forkasiewicz, A.; Dorociak, M.; Stach, K.; Szelachowski, P.; Tabola, R.; Augoff, K. The Usefulness of Lactate Dehydrogenase Measurements in Current Oncological Practice. *Cell Mol Biol Lett* **2020**, *25*, 35, doi:10.1186/s11658-020-00228-7.
631. Feng, Y.; Xiong, Y.; Qiao, T.; Li, X.; Jia, L.; Han, Y. Lactate Dehydrogenase A: A Key Player in Carcinogenesis and Potential Target in Cancer Therapy. *Cancer Med* **2018**, *7*, 6124–6136, doi:10.1002/cam4.1820.
632. Gao, S.; Tu, D.-N.; Li, H.; Jiang, J.-X.; Cao, X.; You, J.-B.; Zhou, X.-Q. Pharmacological or Genetic Inhibition of LDHA Reverses Tumor Progression of Pediatric Osteosarcoma. *Biomed Pharmacother* **2016**, *81*, 388–393, doi:10.1016/j.biopha.2016.04.029.
633. Miao, P.; Sheng, S.; Sun, X.; Liu, J.; Huang, G. Lactate Dehydrogenase A in Cancer: A Promising Target for Diagnosis and Therapy. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 904–910, doi:10.1002/iub.1216.
634. Fu, Y.; Lan, T.; Cai, H.; Lu, A.; Yu, W. Meta-Analysis of Serum Lactate Dehydrogenase and Prognosis for Osteosarcoma. *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97*, e0741, doi:10.1097/MD.00000000000010741.
635. Li, G.; Li, Y.; Wang, D.-Y. Overexpression of MiR-329-3p Sensitizes Osteosarcoma Cells to Cisplatin through Suppression of Glucose Metabolism by Targeting LDHA. *Cell Biol Int* **2021**, *45*, 766–774, doi:10.1002/cbin.11476.
636. Das, C.K.; Parekh, A.; Parida, P.K.; Bhutia, S.K.; Mandal, M. Lactate Dehydrogenase A Regulates Autophagy and Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2019**, *1866*, 1004–1018, doi:10.1016/j.bbamcr.2019.03.004.
637. Manerba, M.; Di Ianni, L.; Govoni, M.; Comparone, A.; Di Stefano, G. The Activation of Lactate Dehydrogenase Induced by MTOR Drives Neoplastic Change in Breast Epithelial Cells. *PLoS One* **2018**, *13*, e0202588, doi:10.1371/journal.pone.0202588.
638. Guo, Y.-J.; Pan, W.-W.; Liu, S.-B.; Shen, Z.-F.; Xu, Y.; Hu, L.-L. ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis. *Exp Ther Med* **2020**, *19*, 1997–2007, doi:10.3892/etm.2020.8454.
639. Burotto, M.; Chiou, V.L.; Lee, J.-M.; Kohn, E.C. The MAPK Pathway across Different Malignancies: A New Perspective. *Cancer* **2014**, *120*, 3446–3456, doi:10.1002/cncr.28864.
640. Abstract 1115: BET Bromodomain Inhibition Synergizes with MEK Inhibitors in Uveal Melanoma | Cancer Research | American Association for Cancer Research Available online:

https://aacrjournals.org/cancerres/article/81/13_Supplement/1115/667070/Abstract-1115-BET-bromodomain-inhibition (accessed on 4 October 2022).

641. Zhao, B.; Cheng, X.; Zhou, X. The BET-Bromodomain Inhibitor JQ1 Mitigates Vemurafenib Drug Resistance in Melanoma. *Melanoma Res* **2018**, *28*, 521–526, doi:10.1097/CMR.0000000000000497.
642. Rose, A. a. N. Encorafenib and Binimetinib for the Treatment of BRAF V600E/K-Mutated Melanoma. *Drugs Today (Barc)* **2019**, *55*, 247–264, doi:10.1358/dot.2019.55.4.2958476.
643. Medina, T.M.; Lewis, K.D. The Evolution of Combined Molecular Targeted Therapies to Advance the Therapeutic Efficacy in Melanoma: A Highlight of Vemurafenib and Cobimetinib. *Onco Targets Ther* **2016**, *9*, 3739–3752, doi:10.2147/OTT.S86774.
644. Long, G.V.; Hauschild, A.; Santinami, M.; Atkinson, V.; Mandalà, M.; Chiarion-Sileni, V.; Larkin, J.; Nyakas, M.; Dutriaux, C.; Haydon, A.; et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* **2017**, *377*, 1813–1823, doi:10.1056/NEJMoa1708539.
645. Jing, Y.; Zhang, Z.; Ma, P.; An, S.; Shen, Y.; Zhu, L.; Zhuang, G. Concomitant BET and MAPK Blockade for Effective Treatment of Ovarian Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 2545–2554, doi:10.18632/oncotarget.6309.
646. Mendoza, M.C.; Er, E.E.; Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-MTOR Pathways: Cross-Talk and Compensation. *Trends Biochem Sci* **2011**, *36*, 320–328, doi:10.1016/j.tibs.2011.03.006.
647. Woodfield, S.E.; Zhang, L.; Scorsone, K.A.; Liu, Y.; Zage, P.E. Binimetinib Inhibits MEK and Is Effective against Neuroblastoma Tumor Cells with Low NF1 Expression. *BMC Cancer* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12885-016-2199-z.
648. Boespflug, A.; Thomas, L. Cobimetinib and Vemurafenib for the Treatment of Melanoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2016**, *17*, 1005–1011, doi:10.1517/14656566.2016.1168806.
649. Lugowska, I.; Kosęła-Paterczyk, H.; Kozak, K.; Rutkowski, P. Trametinib: A MEK Inhibitor for Management of Metastatic Melanoma. *Onco Targets Ther* **2015**, *8*, 2251–2259, doi:10.2147/OTT.S72951.
650. Dummer, R.; Schadendorf, D.; Ascierto, P.A.; Arance, A.; Dutriaux, C.; Di Giacomo, A.M.; Rutkowski, P.; Del Vecchio, M.; Gutzmer, R.; Mandala, M.; et al. Binimetinib versus Dacarbazine in Patients with Advanced NRAS-Mutant Melanoma (NEMO): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2017**, *18*, 435–445, doi:10.1016/S1470-2045(17)30180-8.
651. Li, X.; Baek, G.; Carreira, S.; Yuan, W.; Ma, S.; Hofstad, M.; Lee, S.; Gao, Y.; Bertan, C.; Fenor de la Maza, M. de L.D.; et al. Targeting Radioresistance and Replication Fork Stability in Prostate Cancer. *JCI Insight* **2022**, *7*, e152955, doi:10.1172/jci.insight.152955.
652. Chen, Y.; Xu, L.; Mayakonda, A.; Huang, M.-L.; Kanojia, D.; Tan, T.Z.; Dakle, P.; Lin, R.Y.-T.; Ke, X.-Y.; Said, J.W.; et al. Bromodomain and Extraterminal Proteins Foster the Core Transcriptional Regulatory Programs and Confer Vulnerability in Liposarcoma. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1353, doi:10.1038/s41467-019-09257-z.
653. Faivre, E.J.; Wilcox, D.M.; Hessler, P.; Uziel, T.; Tapang, P.; Magoc, T.; Albert, D.H.; Fang, G.; Rosenberg, S.; McDaniel, K.; et al. Abstract 4694: ABBV-075, a Novel BET Family Inhibitor, Disrupts Critical Transcription Programs That Drive Prostate Cancer Growth to Induce Potent Anti-Tumor Activity in Vitro and in Vivo. *Cancer Research* **2016**, *76*, 4694, doi:10.1158/1538-7445.AM2016-4694.
654. Faivre, E.J.; Wilcox, D.; Lin, X.; Hessler, P.; Torrent, M.; He, W.; Uziel, T.; Albert, D.H.; McDaniel, K.; Kati, W.; et al. Exploitation of Castration-Resistant Prostate Cancer

- Transcription Factor Dependencies by the Novel BET Inhibitor ABBV-075. *Mol Cancer Res* **2017**, *15*, 35–44, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0221.
655. Saenz, D.T.; Fiskus, W.; Qian, Y.; Manshouri, T.; Rajapakshe, K.; Raina, K.; Coleman, K.G.; Crew, A.P.; Shen, A.; Mill, C.P.; et al. Novel BET Protein Proteolysis-Targeting Chimera Exerts Superior Lethal Activity than Bromodomain Inhibitor (BETi) against Post-Myeloproliferative Neoplasm Secondary (s) AML Cells. *Leukemia* **2017**, *31*, 1951–1961, doi:10.1038/leu.2016.393.
 656. Liu, C.; Huang, Y.; Qin, T.; You, L.; Lu, F.; Hu, D.; Xiao, R.; Qin, X.; Guo, E.; Yang, B.; et al. AZD5153 Reverses Palbociclib Resistance in Ovarian Cancer by Inhibiting Cell Cycle-Related Proteins and the MAPK/PI3K-AKT Pathway. *Cancer Lett* **2022**, *528*, 31–44, doi:10.1016/j.canlet.2021.12.021.
 657. Healy, J.R.; Hart, L.S.; Shazad, A.L.; Gagliardi, M.E.; Tsang, M.; Elias, J.; Ruden, J.; Farrel, A.; Rokita, J.L.; Li, Y.; et al. Limited Antitumor Activity of Combined BET and MEK Inhibition in Neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **2020**, *67*, e28267, doi:10.1002/pbc.28267.
 658. Echevarría-Vargas, I.M.; Reyes-Urbe, P.I.; Guterres, A.N.; Yin, X.; Kossenkov, A.V.; Liu, Q.; Zhang, G.; Krepler, C.; Cheng, C.; Wei, Z.; et al. Co-Targeting BET and MEK as Salvage Therapy for MAPK and Checkpoint Inhibitor-Resistant Melanoma. *EMBO Mol Med* **2018**, *10*, e8446, doi:10.15252/emmm.201708446.
 659. Shigeta, S.; Lui, G.Y.L.; Shaw, R.; Moser, R.; Gurley, K.E.; Durenberger, G.; Rosati, R.; Diaz, R.L.; Ince, T.A.; Swisher, E.M.; et al. Targeting BET Proteins BRD2 and BRD3 in Combination with PI3K-AKT Inhibition as a Therapeutic Strategy for Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther* **2021**, *20*, 691–703, doi:10.1158/1535-7163.MCT-20-0809.
 660. Düvel, K.; Yecies, J.L.; Menon, S.; Raman, P.; Lipovsky, A.I.; Souza, A.L.; Triantafellow, E.; Ma, Q.; Gorski, R.; Cleaver, S.; et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of MTOR Complex 1. *Mol Cell* **2010**, *39*, 171–183, doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022.
 661. Srivastava, R.K.; Guroji, P.; Jin, L.; Mukhtar, M.S.; Athar, M. Combined Inhibition of BET Bromodomain and MTORC1/2 Provides Therapeutic Advantage for Rhabdomyosarcoma by Switching Cell Death Mechanism. *Mol Carcinog* **2022**, *61*, 737–751, doi:10.1002/mc.23414.

Titre : Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de protéines à bromodomaine et domaine extra-terminal dans l'ostéosarcome.

Mots clés : ostéosarcome – résistance aux inhibiteurs de protéines BET – autophagie – surexpression de KRAS

Résumé : L'ostéosarcome (OS) est une tumeur osseuse primaire agressive qui touche principalement les enfants et les jeunes adultes, avec un pic d'incidence à 18 ans. La survie à long terme avec les traitements actuels est de 70 % pour les patients non métastatiques, mais chute radicalement à 20 % pour les patients présentant des métastases ou mauvais répondeurs aux thérapies conventionnelles. Par conséquent, il est crucial de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour l'OS. Parmi celles-ci, les inhibiteurs sélectifs de protéines à bromodomaine et domaine extra-terminal (BET), notamment JQ1, ont été utilisés dans le but d'inhiber l'expression de l'oncogène C-MYC, amplifiée dans l'OS. Même si le traitement des cellules d'OS par le JQ1 a montré une efficacité antitumorale, il a également induit une augmentation de l'autophagie dite pro-survie, protégeant ainsi les cellules tumorales contre les inhibiteurs de BET. L'inhibition de l'autophagie, processus biologique amplifié dans les cellules traitées par des inhibiteurs de protéines BET, a potentialisé l'effet antitumoral, *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs BET dans les cellules d'OS. L'autophagie pro-survie, induite par les inhibiteurs de protéines BET a été décrit comme étant l'un des mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BET des cellules cancéreuses. Aucun mécanisme menant à la résistance

des inhibiteurs de protéines BET n'a pour le moment été identifié et décrit dans l'OS. Afin d'anticiper l'émergence de la résistance aux inhibiteurs de protéines BET dans l'OS, il est nécessaire d'identifier, de mieux comprendre et de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la résistance. À cette fin, une lignée d'OS résistante à JQ1 (HOS JQ1R) a été développée. Les HOS JQ1R présentent des mécanismes spécifiques de résistance aux inhibiteurs BET. Les cellules résistantes ont un transcriptome différent de celui des cellules naïves. En effet, les cellules résistantes à JQ1 présentent des voies de signalisation enrichies, telles que la voie de signalisation Ras, ainsi que des processus biologiques tels que l'autophagie par rapport aux cellules naïves. Des mécanismes tels que la surexpression de KRAS, la suractivation de l'autophagie mais aussi du métabolisme dans les cellules résistantes au JQ1 par rapport aux cellules naïves peuvent, en partie, expliquer la résistance du modèle résistant. L'inhibition de la voie MAPK, suractivée dans les cellules HOS JQ1R comparativement aux cellules HOS sensibles au JQ1, pourrait faire partie des nouvelles alternatives thérapeutiques permettant de potentialiser l'effet des inhibiteurs de protéine BET, d'anticiper l'apparition de résistance à ces inhibiteurs ou encore de traiter les patients ayant développé une résistance aux inhibiteurs de BET.

Title : Mechanisms of resistance to bromodomain and extra-terminal domain protein inhibitors in osteosarcoma

Keywords : osteosarcoma – BET inhibitors resistance - Autophagy – KRAS surexpression

Abstract : Osteosarcoma (OS) is an aggressive primary bone tumor that primarily affects children and young adults, with a peak incidence at 18 years of age. Long-term survival with current treatments is 70 % for non-metastatic patients, but drops dramatically to 20 % for patients with metastases or poor responders to conventional therapies. Therefore, it is crucial to develop new therapeutic approaches for OS. Among these, selective inhibitors of bromodomain and extra-terminal domain (BET) proteins, including JQ1, have been used to inhibit the expression of the C-MYC oncogene, which is amplified in OS. Although treatment of OS cells with JQ1 showed antitumor efficacy, it also induced an increase in so-called pro-survival autophagy, thus protecting tumor cells from BET inhibitors. Inhibition of autophagy, a biological process amplified in cells treated with BET protein inhibitors, potentiated the antitumor effect, *in vitro* and *in vivo* of BET inhibitors in OS cells. Pro-survival autophagy induced by BET protein inhibitors has been described as one of the mechanisms involved in the acquisition of resistance to BET inhibitors in cancer cells. No mechanism

leading to BET inhibitor resistance has yet been identified and described in OS. In order to anticipate the emergence of BET inhibitor resistance in OS, it is necessary to identify, better understand and characterize the cellular and molecular mechanisms involved in resistance. To this end, a JQ1-resistant OS line (HOS JQ1R) was developed. HOS JQ1R exhibit specific mechanisms of resistance to BET inhibitors. Resistant cells have a different transcriptome than naive cells. Indeed, JQ1-resistant cells exhibit enriched signaling pathways, such as the Ras signaling pathway, as well as biological processes such as autophagy compared to naive cells. Mechanisms such as overexpression of KRAS, overactivation of autophagy but also of metabolism in JQ1-resistant cells compared to naive cells may, in part, explain the resistance of the resistant model. Inhibition of the MAPK pathway, which is overactivated in HOS JQ1R cells compared to JQ1-sensitive HOS cells, could be one of the new therapeutic alternatives to potentiate the effect of BET inhibitors, to anticipate the development of resistance to these inhibitors or to treat patients who have developed resistance to BET inhibitors.