



**HAL**  
open science

# Utilisation de miRNAs thérapeutiques pour traiter les chondrosarcomes et les ostéosarcomes

Clément Veys

► **To cite this version:**

Clément Veys. Utilisation de miRNAs thérapeutiques pour traiter les chondrosarcomes et les ostéosarcomes. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC405 . tel-04068478

**HAL Id: tel-04068478**

**<https://theses.hal.science/tel-04068478v1>**

Submitted on 14 Apr 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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**  
**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

### **Utilisation de miRNAs thérapeutiques pour traiter les chondrosarcomes et les ostéosarcomes**

**Présentée et soutenue par**  
**Clement VEYS**

**Thèse à caractère confidentiel soutenue le 30/03/2021**  
**devant le jury composé de**

Mme ELISABETH MIOT-NOIRAULT	Maître de conférences HDR, Université Clermont Ferrand 1 Auvergne	Rapporteur du jury
M. JEAN THOMAS VILQUIN	Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur du jury
M. CHRISTOPHE DENOYELLE	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. JEROME LAFONT	Maître de conférences HDR, Université Lyon 1 Claude Bernard	Membre du jury
M. FREDERIC MALLEIN-GÉRIN	Directeur de recherche au CNRS, Université Lyon 1 Claude Bernard	Membre du jury
Mme FLORENCE LEGENDRE	Ingénieur de recherche, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. PHILIPPE GALERA	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse
Mme FRANCOISE REDINI	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Nantes	Président du jury

**Thèse dirigée par FLORENCE LEGENDRE et PHILIPPE GALERA, Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe d'accueil 7450 BioTARGen (Biologie Génétique et Thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires), plus particulièrement au sein de l'axe OERAGEN (Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du Développement). Cette unité de recherche est hébergée sur la plateforme Normandie Equine Vallée à Saint-Contest.



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Mon contrat doctoral a été financé par une allocation de recherche du Ministère de la Recherche.

Ces travaux de recherches ont pu être réalisés grâce au soutien financier de divers partenaires, dont les principaux sont l'Union Européenne par le biais du Fonds Européen de Développement Economique et Régional (FEDER), l'Etat, la région Normandie, l'Université de Caen Normandie, le centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, ainsi que la Ligue contre le Cancer.





# REMERCIEMENTS

---

La réalisation du doctorat a été un tournant important entre la fin de mes études et ma carrière professionnelle future. Ces trois années de recherche ont été très formatrices à tout niveau. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide d'un certain nombre de personnes, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Ces quelques lignes sont donc destinées à les remercier.

En premier lieu, je souhaite adresser mes sincères remerciements au docteur **Florence Legendre** qui m'a accompagné et encadré tout au long de ces travaux de thèse, mais également lors de mon stage de Master 2. Je te remercie pour tout l'investissement fourni durant toutes ces années, ta rigueur et ton sérieux dans le travail ont été un exemple pour moi. Je te remercie également d'avoir toujours pris le temps de me laisser m'exprimer et surtout d'avoir été à l'écoute. Apprendre à tes côtés était une expérience extrêmement enrichissante, donc tout simplement un grand merci à toi.

Je remercie également le professeur **Philippe Galéra**, qui m'a accordé sa confiance pour mener à bien ce projet de recherche. J'ai toujours pu compter sur ton soutien lors de mes moments de doutes ; ton grand optimisme est un atout précieux dans le domaine de la recherche. Malgré tes nombreuses missions d'enseignant chercheur, je te suis reconnaissant de toujours avoir pris le temps de me faire profiter de ton expertise et de ton expérience au regard des différents résultats, surtout lorsque ceux-ci allaient à l'encontre de nos attentes. Tes qualités humaines et professionnelles sont une source d'inspiration.

Je tiens à remercier le docteur **Elisabeth Miot-Noirault** et le docteur **Jean-Thomas Vilquin** d'avoir accepté de juger mon travail ; merci pour le temps accordé à la lecture de ce manuscrit. J'adresse aussi mes remerciements aux docteurs **Françoise Rédini**, **Frédéric Mallein-Gerin**, **Christophe Denoyelle** et **Jérôme Lafont** pour leur participation à ce jury de thèse. Je tiens à remercier plus particulièrement le docteur Françoise Rédini et le docteur Frédéric Mallein-Gerin de m'avoir accompagné durant ces trois dernières années en faisant partie de mon comité de suivi individuel de thèse ; votre recul et vos nombreux conseils ont été très importants pour moi. Mes remerciements s'adressent également au docteur Christophe Denoyelle qui a su se rendre disponible pour m'apporter son expertise sur les miRNAs lorsque cela a été nécessaire. C'est un honneur pour moi que vous soyez tous présents dans ce jury.

Merci au docteur **Magali Demoor** pour vos nombreux conseils. Le rôle de directeur d'un laboratoire de recherche implique de nombreuses responsabilités et occupe beaucoup de temps. Cependant, il est agréable de savoir que votre porte nous est toujours ouverte pour nous

écouter. Je suis reconnaissant de votre investissement pour ce laboratoire. Merci également de m'avoir permis de réaliser des enseignements à l'IUT Génie Biologique de Caen.

Je remercie également l'équipe Stress et Virulence de l'Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), le professeur **Axel Hartke**, le docteur **Aurélie Verneuil** et **Anne-Cécile Appourchaux**, pour toute l'aide apportée sur la partie concernant les bactéries. Notre collaboration interdisciplinaire fut une expérience très enrichissante.

Je tiens à remercier les personnes qui ont effectué leur stage de recherche sur mon projet. **Flavie Boulouard**, tu as réalisé ton année de recherche avec rigueur et sérieux sur une partie de mon sujet de thèse. **Maëlhia Guery** et **Pierre Cambier**, c'était un réel plaisir de vous avoir durant votre stage de M1. Puis, je remercie **Manon Jammes** qui a réalisé son stage de M1 puis de M2 à mes côtés ; je n'ai aucun doute sur ta réussite future dans la thèse que tu viens de commencer au sein du laboratoire.

Un grand merci à tous les doctorants qui m'ont entouré au laboratoire. Nos sujets de recherche parfois très éloignés nous ont permis d'avoir des échanges passionnants avec divers point de vue ; heureusement nous avons toujours pu compter sur la pâtisserie pour nous mettre d'accord. Je remercie tout particulièrement, **Bastien Bourdon** et ta patience, plus grande que la mienne, pour gérer les tâches administratives auxquelles nous devons faire face en tant que doctorant et chercheur d'un laboratoire. Merci à **Aurélie Culier**, pour ton dynamisme qui te sera utile durant cette seconde année de thèse. Je remercie également le tout jeune docteur **Côme Thieulant** et **Gabrielle Sutton** avec qui j'ai cohabité dans le bureau ; je vous remercie pour votre gentillesse et votre écoute. **Clovis Woutiers**, ta passion pour la science et le houblon nous a permis de passer de bons moments. Enfin, merci aux derniers arrivés. Certains entament déjà leur deuxième année, tandis que d'autres commencent, une pensée donc pour **Flora Carnet**, **Marine Pottier** et **Camille Normand**.

Je remercie chaleureusement les Docteurs **Thomas Branly**, **Romain Contentin**, **Rodolphe Rakic** et **Mélanie Desancé**. Vous étiez encore doctorants lors de mon arrivée au sein de l'équipe et vous avez su me donner de précieux conseils, me permettant de réussir pleinement mon intégration. Thomas et Romain, vous avez eu l'opportunité de prolonger votre contrat doctoral au laboratoire en tant qu'ingénieur de recherche. Cela a été un véritable atout scientifique pour nous, mais également une joie personnelle d'avoir l'occasion de continuer à travailler à côté d'amis. Je vous souhaite tous les 4, sincèrement le meilleur pour la suite. J'adresse mes remerciements également à une personne récemment arrivée dans l'équipe, le docteur **Frédéric Cassé**. Nous n'avons pas eu l'occasion de travailler longtemps ensemble. Néanmoins, merci pour le partage de tes connaissances et de tes expériences professionnelles ; c'est une véritable chance pour le laboratoire et les futurs étudiants.

Merci aux personnes avec qui nous avons cohabité sur la plateforme de recherche et qui ont pu être un soutien précieux. Je vous remercie pour votre gentillesse, vos nombreux conseils et votre bienveillance ; de nombreuses qualités qui permettent aux doctorants et l'ensemble des utilisateurs de la plateforme de travailler dans des conditions optimales. Une pensée donc pour **Christine Fortier, Marie-Pierre Toquet**, le docteur **Erika Hue** et **Sophie Castagnet**. J'adresse également mes remerciements aux docteurs **Albertine Léon, Stéphane Pronost** et **Romain Paillot** ; merci pour vos nombreux conseils et votre soutien. Je pense également à **Louise Jegard** et **Juliette Dupont-Viratelle**, que je remercie pour leur enthousiasme à toute épreuve.

De manière plus personnelle,

Je tiens à remercier mes amis de Caen ou d'ailleurs, toujours disponibles en cas de besoin. Je pense à **Joachim, Pauline, Maxime P, Maxime D, Baptiste, Raphaëlle, Emilie, Julien, Thibaud, Bastien**.

Puis je remercie également mes amis de plus longues dates, malgré la distance, le manque de temps, les projets professionnels ou personnels, vous avez toujours su être là pour moi : **Elisa, Kentin, Clément, Romain G, Romain L, Antoine, Paul** et **Estelle**.

J'adresse un remerciement tout particulier à **Camille**, future grande photographe. Malgré nos emplois du temps parfois chargés, les moments n'ont pas toujours été simples. Je te remercie malgré tout pour ton soutien infailible et ta patience.

Enfin je remercie de tout cœur ma **famille**, j'ai pu compter sur votre soutien durant ces trois dernières années, mais également sur l'ensemble de ma scolarité, ce qui commence à représenter un certain nombre d'années maintenant. Vous avez toujours su trouver les mots justes pour me faire avancer. Tout simplement, merci à vous.



# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	16
LISTE DES FIGURES	19
LISTE DES TABLEAUX	21
AVANT-PROPOS	22
INTRODUCTION	26
<b>A. CHONDROSARCOMES</b>	<b>27</b>
<b>I. Définitions et épidémiologie</b>	<b>27</b>
<b>II. Classification</b>	<b>27</b>
1. Critères de classification	27
2. Les tumeurs cartilagineuses bénignes	28
a. Enchondromes	28
b. Chondrome périosté ou juxtacortical	29
c. Ostéochondromes	29
d. Diagnostic différentiel	30
3. Les chondrosarcomes conventionnels centraux et périphériques	30
4. Les chondrosarcomes juxtacorticaux ou périostés	33
5. Les chondrosarcomes non conventionnels	33
a. Les chondrosarcomes dédifférenciés	33
b. Les chondrosarcomes mésoenchymateux	34
c. Les chondrosarcomes à cellules claires	35
<b>III. Les altérations génétiques et moléculaires les plus fréquentes dans les chondrosarcomes</b>	<b>37</b>
1. Contrôle moléculaire de l'ossification endochondrale	38
2. Changements précoces	39
3. Changements tardifs	40

<b>IV. Traitements conventionnels des chondrosarcomes</b>	<b>41</b>
1. Les chondrosarcomes de grade I	41
2. Les chondrosarcomes de grade II et III	41
3. La chimiothérapie	41
a. Principe	41
b. Cas du chondrosarcome	42
c. Mode d'action du cisplatine	42
d. Mécanismes de résistance au cisplatine	44
4. La radiothérapie	46
a. Principe	46
b. Cas du chondrosarcome	46
c. Mode d'action de la radiothérapie conventionnelle	47
<b>V. Mécanismes de résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels</b>	<b>48</b>
1. L'environnement tumoral des chondrosarcomes	48
2. Activité télomérase	49
3. Expression de la P-glycoprotéine	49
4. Rôle des facteurs pro- et anti-apoptotiques	49
5. Perte de l'expression de la protéine p16	50
<b>VI. L'hypoxie et les CS</b>	<b>51</b>
1. Hypoxie et cancer	51
2. Les facteurs HIFs	52
a. Structure	52
b. Régulation	53
3. Rôle des facteurs HIFs dans la croissance tumorale	55
a. Modification du métabolisme	56
b. La transition épithélio-mésenchymateuse	58
c. L'invasion tumorale	58
d. L'angiogenèse	59
e. L'autophagie	60
4. Rôle de l'hypoxie dans la résistance aux traitements conventionnels	63
<b>B. OSTEOSARCOMES</b>	<b>64</b>
<b>I. Définition et épidémiologie</b>	<b>64</b>
<b>II. Classification</b>	<b>65</b>
1. Critères de classification	65

2.	Les ostéosarcomes conventionnels	67
a.	L'ostéosarcome ostéoblastique	67
b.	L'ostéosarcome chondroblastique	68
c.	L'ostéosarcome fibroblastique	69
3.	Les autres types d'ostéosarcomes	70
a.	Autres OS centraux	70
b.	Les OS de surface	70
<b>III.</b>	<b>Diagnostic et évolution des ostéosarcomes</b>	<b>71</b>
1.	Diagnostic	71
2.	Evolution de la pathologie	72
<b>IV.</b>	<b>Modifications pathologiques de la physiologie osseuse dans les ostéosarcomes</b>	<b>72</b>
1.	L'environnement osseux	72
a.	Remodelage osseux non pathologique	72
b.	Remodelage osseux pathologique	74
2.	Le système immunitaire	76
3.	L'angiogenèse	78
<b>V.</b>	<b>Altérations génétiques et moléculaires dans les ostéosarcomes</b>	<b>79</b>
1.	Prédispositions moléculaires de l'ostéosarcome	79
2.	Principales voies de signalisation altérées dans l'ostéosarcome	80
<b>VI.</b>	<b>Traitements conventionnels des OS</b>	<b>83</b>
1.	La chirurgie de l'ostéosarcome	83
a.	Résection de la tumeur primaire	83
b.	Résection des métastases	83
2.	La chimiothérapie	84
a.	Les traitements actuels	84
b.	Chimiorésistance des ostéosarcomes	84
3.	La radiothérapie	85
<b>C.</b>	<b>TRAITEMENTS « NON CONVENTIONNELS » DES CHONDROSARCOMES ET DES OSTEOSARCOMES</b>	<b>86</b>
1.	L'hadronthérapie	86
a.	Principe	86
b.	Données précliniques et cliniques pour les OS et les CS	88
2.	Létalité synthétique	89
3.	L'immunothérapie	90

a.	Ciblage des macrophages associés aux tumeurs	91
b.	Les cellules dendritiques	92
c.	Infiltration lymphocytaire	93
d.	Les lymphocytes génétiquement modifiés	94
e.	La thérapie à base de cytokines	95
f.	Blocage des points de contrôle immunitaire	96
4.	Les thérapies ciblées	97
a.	Les inhibiteurs des IDH	97
b.	Les inhibiteurs de l'angiogenèse	98
c.	Les inhibiteurs des Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK)	100
d.	Les Inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase	101
e.	Les Inhibiteurs de la voie de signalisation mTOR	102
f.	Les inhibiteurs de la voie de signalisation Hedgehog	103
g.	Les inhibiteurs épigénétiques	104
<b>D.</b>	<b>MIRNA ET CANCERS</b>	<b>107</b>
<b>I.</b>	<b>Généralités</b>	<b>107</b>
1.	Découverte du mécanisme d'interférence par l'ARN	107
2.	Découverte des miRNAs	107
3.	Nomenclature des miRNAs	109
<b>II.</b>	<b>Biogenèse et mécanismes d'action</b>	<b>110</b>
1.	Organisation génomique des gènes codants les miRNAs	110
2.	Régulation de la maturation des miRNAs	111
a.	Transcription	111
b.	Clivage des pri-miRNAs par le microprocesseur	112
c.	Export des pré-miRNAs du noyau vers le cytoplasme	113
d.	Maturation par le complexe Dicer	114
e.	Prise en charge par le complexe RISC	115
3.	Appariement	116
a.	Les interactions des miRNAs et leur cible 3'UTR	118
b.	Prédiction des cibles et bioinformatique	120
4.	Mécanismes moléculaires d'interférence par les miRNAs	121
a.	Principe	121
b.	Dégradation des ARNm consécutive à la déstabilisation de l'ARNm	122
c.	Inhibition de la traduction	123
d.	Cas particulier : activation de la transcription ou de la traduction par les miRNAs	124

<b>III. miRNAs et cancer</b>	<b>125</b>
1. Dérégulation de l'expression des miRNAs dans les cancers	125
2. Mécanismes de dérégulation des miRNAs	126
3. Les miRNAs, une implication au cœur du réseau d'expression protéique	128
4. Les miRNAs comme biomarqueurs tumoraux	130
5. Rôles des miRNAs au cours du développement des tissus osseux et cartilagineux	132
6. MiRNAs et tumeurs osseuses primaires	133
a. MiRNAs et chondrosarcome	133
b. MiRNAs et ostéosarcome	136
<b>IV. Utilisation de miRNAs thérapeutiques</b>	<b>140</b>
1. Le potentiel thérapeutique des miRNAs et les limites à leur utilisation	140
2. Les différentes stratégies d'utilisation des miRNAs <i>in vivo</i>	141
a. Inhibition des miRNAs oncogéniques	141
b. Réexpression des miRNAs suppresseurs de tumeurs	144
3. Système de délivrance de miRNAs thérapeutiques	145
4. Essais cliniques avec des miRNAs mimétiques ou des antimirs	148
a. Exemples d'essais cliniques avec des miRNAs mimétiques ou des antimirs	148
b. Etudes pré-cliniques avec des miRNAs chez le CS	150
c. Etudes pré-cliniques avec des miRNAs chez l'OS	151
<b>E. UTILISATION DES BACTERIES EN THERAPIE ANTI-CANCEREUSE</b>	<b>154</b>
<b>I. Le potentiel thérapeutique des bactéries</b>	<b>154</b>
1. Lien entre bactéries et tumeurs (historique)	154
2. Intérêt des bactéries	156
3. La colonisation bactérienne spécifique des tumeurs	158
<b>II. Les différentes stratégies thérapeutiques utilisant des bactéries</b>	<b>160</b>
1. Toxicité bactérienne naturelle	160
a. Expression de toxines	160
b. Bactéries et immunothérapie	161
2. La bactofection	161
3. La thérapie génique utilisant les bactéries comme vecteur d'agent anticancéreux	162
4. Les bactéries comme vecteur d'ARNs interférents	165
a. tkRNAi	165
b. bmRNAi	169
c. miRNAs	170

RESULTATS	171
A.    ROLE SUPPRESSEUR DE TUMEUR DU MIR-342-5P ET DU MIR-491-5P DANS LES CELLULES DE CHONDROSARCOME HUMAIN	172
I.    Contexte de la publication	172
II.   Publication n°1	174
III.  Principaux résultats et conclusions de l'étude	226
B.    ROLE SUPPRESSEUR DE TUMEUR DU MIR-342-5P ET DU MIR-491-5P DANS LES CELLULES D'OSTEOSARCOME HUMAIN	229
I.    Contexte de la publication	229
II.   Publication n°2	230
III.  Principaux résultats et conclusions de l'étude	266
C.    ROLE SUPPRESSEUR DE TUMEUR DU MIR-4270 DANS LES CELLULES D'OSTEOSARCOME HUMAIN	267
I.    Contexte de la publication	267
II.   Publication n°3	268
III.  Principaux résultats et conclusions de l'étude	310
D.    VECTORISATION D'UN MIRNA ANTI-TUMORAL A L'AIDE D'UNE BACTERIE COLONISATRICE DE CHONDROSARCOMES ET D'OSTEOSARCOMES	312
I.    Introduction	312
II.   Matériel et méthodes	313
III.  Résultats	316
1.    Etude des effets de petits ARNs extraits de la souche <i>Eh</i> modifiée sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome	316

2. Etude des effets des ARNs extraits de la souche <i>Eh</i> sauvage sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome	320
3. Etude des effets du pré-miR-342 produit par transcription <i>in vitro</i> sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome	322
4. Etude des effets du pré-miR-342 produit par la souche <i>Eh</i> modifiée sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome.	326
<b>IV. Conclusion</b>	<b>328</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>330</b>
1. Approche haut débit par xCELLigence	330
2. Validation des effets cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs des miRNAs	333
3. Caractérisation des effets cytotoxiques et cibles moléculaires des miRNAs	337
4. Modèle d'étude : lignée cellulaire, hypoxie et culture en 3D	347
5. Utilisation des bactéries pour la vectorisation des miRNAs	349
6. Conclusion	352
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>353</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>379</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

## A

$\alpha$ -KG :  $\alpha$ -cétoglutarate  
Ago : Argonaute  
Akt : Protéine Kinase B  
ARNdb : ARN double brin  
ASO : Oligonucléotides anti-sens  
ATG : Autophagy Related Genes  
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated  
ATP7A : Copper-transporting ATPase 1  
ATP7B : ATPase, Cu<sup>2+</sup> transporting, beta polypeptide

## B

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer  
Bax : Bcl-2-associated X  
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2  
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large  
Bid : BH3 interacting-domain death agonist  
Bim : Bcl-2-like protein 11  
BioTARGen : Biologie, Génétique et Thérapies  
ostéoArticulaires et Respiratoires  
BioTICLA : Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers  
de l'Ovaire  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
bmRNAi : ARNi à médiation bactérienne  
BNIP3 : Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein  
3  
BRCA : Breast Cancer

## C

CAR-T : Chimeric Antigen Receptor T Cell  
CBP : CREB Binding Protein  
CCL5 : Chemokine (C-C motif) ligand 5  
CCND1 : Gène de la Cycline D1  
CCR4-NOT : Carbon Catabolite Repression-Negative On  
TATA-less  
CDDP : Cis-diaminedichloroplatine  
CDK : Cyclin Dependent Kinase

CDKN2 : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2  
ClyA ou HlyE : Cytolysine A  
CMF : Cytométrie en flux  
CS : Chondrosarcome  
CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses  
CTR1 : Copper Transporter 1

## D

DCP2 : Decapping Enzyme  
DDX6 : DEAD Box Helicase 6  
DGCR8 : Digeorge Syndrome Critical Region gene 8  
DHFR : Dihydrofolate Réductase  
DOPC : 1,2-dioléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

## E-F-G

*E.coli* : Escherichia coli  
EDV : EnGeneIC Delivery Vehicle nanocells  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
ELN : Emulsions Lipidiques Neutres  
ERBB : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase  
ETV5 : ETS Variant Transcription Factor 5  
EXP5 : Exportine-5  
EXT : Exostine  
FDA : Food and Drugs Administration  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
GalNAc : N-acétyl-D-Galactosamine  
GD2 : Disialoganglioside  
GLUT : Transporteurs de glucose  
GSH : Glutathion réduit  
Gy : Gray

## H

HDAC4 : Histone Désacétylase 4  
2-HG : 2-hydroxyglutarate  
HIF : Hypoxia Inducible Factor  
Hsp90 ou Hsp70 : Heat-Shock Protein 90 ou 70

HSPGs : Protéoglycanes à héparanes sulfates  
HSVtk : Thymidine kinase du virus de l'herpès simplex

### I-J-K

IDH : Isocitrate Déshydrogénase  
IFN : Interféron  
IGF : Insulin-like Growth Factor  
IHH : Indian Hedgehog  
IL-1, IL-6... : Interleukine-1 ou -6...  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

### L

*L. monocytogenes* : *Listeria monocytogenes*  
LDH-A : Lactate Déshydrogénase A  
LLC : Leucémies Lymphoïdes Chroniques  
LMA : Leucémie Myéloïde Aiguë  
LNA : Locked Nucleic Acid  
lncRNA : Longs ARNs non codants

### M-N-O

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia-1  
MDR-1 : Multi Drug Resistance-1  
MEC : Matrice Extracellulaire  
MEK/ERK : Mitogen-activated protein kinase  
miRNA ou miR : microARN  
MMP : Matrix Metalloproteinase  
MMR : Réparation des bases mésappariées  
MRP2 : Multidrug Resistance-associated Protein 2  
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin Kinase  
MTX : Méthotrexate  
NER : Réparation par excision de nucléotides  
NK : Natural Killer  
ODD : Oxygen-dependent Degradation Domain  
OErAGen : Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du Développement  
OPG : Ostéoprotégérine  
OS : Ostéosarcome

### P

PABPC : Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PAN2-PAN3 : Poly(A)-Nuclease2-Poly(A)-Nuclease3  
PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase  
PAZ : PIWI-Argonaute-Zwille  
PDK-1 : Pyruvate Deshydrogenase Kinase-1  
PD-L1 : Programmed cell Death Ligand 1  
PEG : Poly Ethylene Glycol  
PEI : Polyéthylèneimine synthétique  
PHD : Prolyl-Hydroxylases  
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase  
PLGA : Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)  
pRB : Retinoblastoma protein  
pré-miRNA : miRNA précurseur  
pri-miRNA : miRNA primaire  
PTEN : Phosphatase and Tensin homolog  
PTHrP : Parathyroid-Hormone-related Protein  
pVHL : Von Hippel- Lindau tumor suppressor

### Q-R

Raf : Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase  
RANK-L : Receptor Activator of NF Kappa B-Ligand  
RISC : RNA Induced Silencing Complex  
RLC : RISC Loading Complex  
RNAi : ARN interférent  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2

### S

*S. flexneri* : *Shigella flexneri*  
*S. typhimurium* : *Salmonella typhimurium*  
shRNA : Short hairpin RNA  
siRNA : Small interfering RNA  
SMIR : Small Molecule Inhibitor to target specific miRNA  
SOX9 : SRY-box 9  
SRY : Sex-determining Region of Y chromosome  
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

## T

TAM : *Macrophages associés à la tumeur*

TAZ : *Transcriptional co-activator with PDZ binding motif*

TCF : *T-Cell factor*

TEL : *Haut transfert d'Énergie Linéique*

TEM : *Transition Epithélio-Mésenchymateuse*

TGF- $\beta$  : *Transforming Growth Factor- $\beta$*

tkRNAi : *transkingdom RNAi*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing  
Ligand*

TRAP : *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*

TRBP : *Trans-activation Response (TAR) RNA Binding  
Protein*

TRIP : *Plasmide tkRNAi*

## U-V-W-X-Y-Z

U2RM : *Unité de Recherche Risques Microbiens*

uPA : *Urokinase Plasminogen Activator*

UTR. : *Untranslated Region*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VHL : *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*

XIAP : *X-linked inhibitor of Apoptosis Protein*

*Y. pseudotuberculosis* : *Yersinia pseudotuberculosis*

YAP : *Hippo/Yes-Associated Protein*

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Radiographie d'un chondrosarcome conventionnel intramédullaire..	31
Figure 2 : Représentation schématique illustrant le système de gradation du chondrosarcome conventionnel ..	32
Figure 3 : Histologie d'un chondrosarcome dédifférencié. ....	34
Figure 4 : Histologie d'un chondrosarcome mésoenchymateux. ....	35
Figure 5 : Histologie d'un chondrosarcome à cellules claires. ....	36
Figure 6 : Développement des tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression vers le CS. ....	37
Figure 7 : Représentation des signaux d'IHH/PTHLH au sein de la plaque de croissance. ....	38
Figure 8 : Aperçu des voies impliquées dans la médiation des effets cellulaires du cisplatine. ....	44
Figure 9 : Mécanismes de résistance au cisplatine. ....	45
Figure 10 : Représentation schématique des dommages de l'ADN. ....	47
Figure 11 : Rôle de l'hypoxie sur le développement des tumeurs. ....	51
Figure 12 : Structure des HIF-1/2/3 $\alpha$ et de leurs partenaires transcriptionnels. ....	52
Figure 13 : Régulation d'HIF- $\alpha$ en condition normoxique et hypoxique. ....	54
Figure 14 : L'hypoxie et les HIFs régulent de nombreux mécanismes impliqués dans la tumorigenèse. ....	56
Figure 15 : Les multiples points de contrôle de l'effet Warburg. ....	57
Figure 16 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie. ....	61
Figure 17 : Diversité histopathologique des variants d'ostéosarcomes. ....	66
Figure 18 : Histologie d'un ostéosarcome ostéoblastique. ....	68
Figure 19 : Histologie d'un ostéosarcome chondroblastique. ....	69
Figure 20 : Histologie d'un ostéosarcome fibroblastique. ....	69
Figure 21 : Radiographie du genou montrant un ostéosarcome dense du fémur au dessus du genou. ....	71
Figure 22 : Relation entre les cellules de l'environnement osseux et l'ostéosarcome. ....	75
Figure 23 : Relation entre les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules immunitaires. ....	76
Figure 24 : Développement de l'ostéosarcome. ....	80
Figure 25 : Courbe de rendement en profondeur : photons, électrons protons et ions carbonés. ....	86
Figure 26 : Effet biologique relatif (pic de Bragg étalé). ....	87
Figure 27 : Concept de létalité synthétique. ....	90
Figure 28 : Nomenclature des miRNAs. ....	109
Figure 29 : Vue d'ensemble de la voie canonique de la biogenèse des miRNAs. ....	112
Figure 30 : Caractéristiques et reconnaissance du pri-miRNA. ....	113
Figure 31 : Aperçu de la biogenèse des miARN et de leurs modes d'action. ....	117
Figure 32 : Sites cibles canoniques des miRNAs chez les Mammifères. ....	119
Figure 33 : Les sites cibles atypiques des miRNAs chez les Mammifères. ....	120

<i>Figure 34 : Aperçu de l'inhibition de l'expression des ARNm ciblés par les miRNAs.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 35 : Mécanisme de déstabilisation de l'ARNm. ....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 37 : Mécanismes de dérégulation des miRNAs.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 38 : Implication de différents miRNAs au cœur de différents réseaux et processus biologiques.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 39 : Action d'un miRNA sur plusieurs cibles.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 41 : Les 20 miRNAs les plus abondants exprimés dans les chondrosarcomes centraux conventionnels de grades I, II et III.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 42 : Résumé des étapes clés pour le développement de miRNAs thérapeutiques.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 43 : Les bactéries comme des usines robotisées « parfaites » pour lutter contre les cancers.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 44 : Les différentes approches thérapeutiques utilisant les vecteurs bactériens.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 45 : Modèle de conception d'une bactérie invasive d'une cellule cancéreuse.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 46 : Imagerie bioluminescente des bactéries. ....</i>	<i>163</i>
<i>Figure 47 : Deux systèmes permettant la délivrance d'ARNi par les bactéries au sein d'une cellule.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 48 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de petits ARNs produits par la souche Eh modifiée sur la lignée de CS SW1353.....</i>	<i>317</i>
<i>Figure 49 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de petits ARNs produits par la souche Eh modifiée sur d'autres lignées de CS.....</i>	<i>319</i>
<i>Figure 50 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques potentiels des petits et grands ARNs de la souche Eh sauvage sur la lignée de CS SW1353. ....</i>	<i>321</i>
<i>Figure 51 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de différentes formes du miR-342 sur la lignée de CS SW1353.....</i>	<i>323</i>
<i>Figure 52 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de différentes formes du miR-342 sur d'autres lignées de CS.....</i>	<i>325</i>
<i>Figure 53 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques du pré-miR-342 produit par la souche Eh modifiée sur la lignée de CS SW1353.....</i>	<i>327</i>
<i>Figure 54 : Représentation schématique des deux voies, intrinsèque et extrinsèque, contrôlant l'apoptose.. ....</i>	<i>338</i>

# LISTE DES TABLEAUX

---

<i>Tableau I : Vue d'ensemble des caractéristiques cliniques des sous-types de chondrosarcomes.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau II : Classifications cliniques et fréquences des ostéosarcomes.....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau III : Aperçu des altérations récurrentes observées dans les ostéosarcomes conventionnels. ....</i>	<i>79</i>
<i>Tableau IV : MiRNAs dérégulés dans le chondrosarcome. ....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau V : MiRNAs suppresseurs de tumeurs dans l'ostéosarcome. ....</i>	<i>137</i>
<i>Tableau VI : Rôles des miRNAs dans l'ostéosarcome en réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie.....</i>	<i>139</i>
<i>Tableau VII : Sélection de miRNAs impliqués dans les cancers et leurs utilisations thérapeutiques dans des modèles précliniques. ....</i>	<i>141</i>
<i>Tableau VIII : Liste de miRNAs thérapeutiques en essais cliniques.....</i>	<i>149</i>
<i>Tableau IX : Résumé des patients traités avec les toxines de Coley avant 1940. ....</i>	<i>155</i>
<i>Tableau X : Les essais publiés sur l'Homme utilisant des thérapies bactériennes contre le cancer.....</i>	<i>158</i>
<i>Tableau XI : Exemples de stratégies thérapeutiques utilisant des vecteurs bactériens aux niveaux précliniques et cliniques.....</i>	<i>164</i>
<i>Tableau XII : Bilan des différents effets du miR-491-5p dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome. ....</i>	<i>340</i>
<i>Tableau XIII : Bilan des différents effets du miR-342-5p dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome. ....</i>	<i>342</i>
<i>Tableau XIV : Bilan des différents effets du miR-4270 dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome. ....</i>	<i>346</i>

# AVANT-PROPOS

---

Aujourd'hui, les traitements privilégiés de nombreux cancers continuent d'être la chimiothérapie et la radiothérapie en association avec la chirurgie. Ces traitements ont permis de marquer un net recul sur la mortalité engendrée par les cancers. Cependant, ce type de traitement présente une toxicité importante pour les tissus adjacents aux tumeurs. De plus, certains types de tumeurs comme le chondrosarcome (CS), développent une résistance accrue à ce type d'approches thérapeutiques. Néanmoins, grâce aux nombreux progrès de la biologie moléculaire et de la génétique, le mécanisme de ces pathologies est mieux compris permettant d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, au vu des caractéristiques propres à chaque type de cancer, la recherche prend progressivement en compte les possibilités de thérapies ciblées (anticorps ciblés, anti-angiogéniques, inhibiteurs enzymatiques). Les tumeurs osseuses comme le CS et l'ostéosarcome (OS) n'échappent pas à cette recherche de nouvelles approches thérapeutiques. Pour le CS, la chimiothérapie est totalement inefficace et les cellules sont également résistantes à la radiothérapie. De plus, ce type de tumeur dite « cartilagineuse » a tendance à récidiver localement. La chirurgie présente de bons résultats selon l'étendue de la tumeur et sa localisation. Toutefois, l'intervention chirurgicale est parfois impossible lorsque la tumeur se trouve par exemple à la base du crâne et donc trop proche de structures nerveuses vitales. Les cellules tumorales d'OS produisent du tissu ostéoïde. Le traitement par chimiothérapie combiné à la radiothérapie et à la chirurgie apporte de bons résultats. Toutefois, cette tumeur présente un fort potentiel métastatique qui impacte considérablement les résultats thérapeutiques (80 % des patients présenteraient des métastases souvent indétectables lors du diagnostic). Au-delà de la nécessité d'améliorer les techniques de détection précoce des sarcomes osseux, la communauté scientifique s'accorde sur la nécessité d'identifier les altérations moléculaires afin de mettre en place une thérapie personnalisée.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de recherches développés par l'équipe OErAGen (Ossification Endochondrale et Anomalies Génétiques du Développement) de l'unité BioTARGen (Biologie, Génétique et Thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires), et en particulier sur l'utilisation de miRNAs à visée thérapeutique pour le traitement innovant des CS. Cette approche a été initiée en 2012 grâce à un financement du Conseil Régional de Basse Normandie (projet Emergence) en collaboration avec l'équipe BioTICLA (Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers de l'Ovaire,

UNICAEN). Il a permis de mettre en évidence par criblage haut débit d'une banque de 1200 microARNs (miRNAs ou miRs), 21 miRNAs potentiellement cytotoxiques pour le CS et 30 miRNAs chimiosensibilisateurs. L'unité a ensuite fait le choix d'une approche innovante, financée par une dotation de la LIGUE contre le Cancer, de la vectorisation de miRNAs tueurs par des bactéries colonisatrices des CS (projet BaChoSamiR), en collaboration avec l'équipe Stress et Virulence de l'Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM, UNICAEN).

La plus grande partie de mes travaux s'est donc intéressée au rôle des miRNAs comme agents thérapeutiques des CS et OS. Les miRNAs constituent une classe particulière d'ARNs non-codants endogènes de petite taille (~20 nucléotides). Présents dans toutes les cellules, ils sont capables de réguler l'expression génique. Des centaines de miRNAs peuvent réguler le même gène, tout comme un miRNA peut agir sur la régulation de plusieurs centaines de gènes différents. Les miRNAs agissent donc de manière coordonnée sur des réseaux de cibles, encore trop peu caractérisés. Néanmoins, dans le contexte du cancer, il est clairement établi que certains miRNAs vont fonctionner, soit comme des oncogènes, soit comme des suppresseurs de tumeurs, en fonction de leurs cibles. Les miRNAs jouent donc ainsi un rôle important dans la progression et le développement des cancers. En effet, tout comme pour les gènes codant les protéines, des altérations génétiques ou épigénétiques peuvent altérer leur expression.

Ainsi, la validation fonctionnelle individuelle des miRNAs définis comme potentiellement cytotoxiques chez les cellules de CS lors du criblage haut débit a représenté le cœur de mon projet. Cette étude a été réalisée en parallèle dans des cellules d'OS pour évaluer la spécificité de l'effet des miRs mis en évidence. Je me suis donc attaché à caractériser leur mode d'action et à identifier les cibles de ces miRNAs d'intérêt dans le but d'améliorer la compréhension des voies de signalisations impliquées dans la survie, le développement et la chimiorésistance des cellules tumorales de CS. Cela, avec l'objectif d'une utilisation de ces miRNAs cytotoxiques comme agent thérapeutique pour le traitement des CS.

Le mode d'administration des miRNAs *in vivo* n'a toujours pas été résolu par le développement de vecteurs viraux et non viraux. Le dernier volet de ma thèse s'est intéressé à la vectorisation de ces miRNAs basée sur l'utilisation de bactéries. L'utilisation de bactéries dans la régression de certaines formes de cancer est connue depuis plus d'un siècle. En effet, une régression complète de certaines tumeurs a été observée à la suite d'infections bactériennes post-opératoires. Depuis, plusieurs études ont démontré que, suite à l'injection de diverses espèces bactériennes, ces microorganismes sont capables non seulement de s'accumuler

spécifiquement dans des tumeurs solides, mais également de s'y multiplier. Certaines bactéries, telles que *Clostridium* ou *Salmonella* possèdent des activités oncolytiques naturelles. Toutefois, la stratégie privilégiée à ce jour passe par une modification génétique des bactéries visant à engendrer une cytotoxicité sélective basée sur l'expression de toxines, de cytokines, d'antigènes tumoraux, de facteurs inducteurs d'apoptose et de siRNAs/shRNAs/miRNAs. Antérieurement à mon projet de thèse, l'équipe OErAGen associée à l'équipe STRESS et Virulence, en collaboration avec l'UMR990 INSERM (Clermont-Ferrand) et l'URM INSERM 1238 (Nantes) sont parvenues à mettre en évidence deux souches de bactéries lactiques Gram+ capables de coloniser de manière spécifique 4 modèles de CS et d'OS générés en site orthotopique intramusculaire paratibial. Ces souches, que nous nommerons Eh et EfS1, ont colonisé de manière spécifique, ce modèle innovant de CS humain généré par xénogreffe chez la souris immunodéprimée et ce modèle de CS murin généré par allogreffe chez le rat immunocompétent. Ces bactéries ont aussi colonisé un modèle d'OS humain généré par xénogreffe en site orthotopique intramusculaire paratibial chez la souris immunodéprimée et un modèle d'OS murin généré par allogreffe en site orthotopique intramusculaire paratibial chez la souris immunocompétente. Ces résultats sont tout à fait novateurs, d'autant plus que ces souches sont non pathogènes pour l'Homme. Ils ont conduit l'équipe Stress et Virulence à reprogrammer génétiquement ces deux souches, et en particulier la souche Eh, qui est la meilleure colonisatrice pour qu'elle exprime le meilleur miRNA sélectionné dans mon projet de thèse. Dans cette continuité, la dernière partie de mon projet de thèse a été consacrée à vérifier la fonctionnalité du miRNA produit par la bactérie. Cette étape est indispensable avant d'envisager d'autres modifications génétiques (module d'invasion et d'autolyse) permettant *in fine* de délivrer le miRNA synthétique dans les cellules tumorales *in vitro*, puis *in vivo* grâce à la bactérie Eh.

Afin de permettre la compréhension de mes travaux, ce manuscrit de thèse comprend dans un premier temps une introduction générale présentant les CS et les OS, avec les problématiques rencontrées sur l'échec des traitements conventionnels pour ces types de tumeurs. Ensuite, une grande partie de l'introduction sera dédiée aux miRNAs afin de présenter leur rôle dans la régulation des voies métaboliques des cellules, en passant par leurs dérégulations qui favorisent le développement et la progression tumorale. Les champs d'application possibles de l'utilisation des miRNAs en cancérologie et leurs limites, notamment à cause de leurs modes de vectorisation, sont également décrits. Enfin, les différentes pistes

étudiées pour la vectorisation des miRNAs sont présentées, avec un accent sur la présentation des bactéries comme vecteurs possibles pour délivrer des miRNAs au sein des tumeurs.

A la suite de cette introduction bibliographique, mon manuscrit de thèse présente les principaux résultats obtenus sous la forme d'articles scientifiques, tout en intégrant le contexte et la démarche menée pour la réalisation de chaque article. Après la présentation de l'ensemble des résultats, une discussion générale présente les perspectives de ce travail de thèse.

# **INTRODUCTION**

---

## **A. Chondrosarcomes**

### **I. Définitions et épidémiologie**

Les sarcomes osseux sont des tumeurs rares qui représentent moins de 1 % de tous les cancers. Parmi ceux-ci, les chondrosarcomes (CS) correspondent à un groupe hétérogène de tumeurs osseuses malignes associées à la production d'une matrice cartilagineuse semblable au cartilage hyalin et qui produisent rarement des métastases. Du fait de la nature chondrogénique du tissu et l'absence de vascularisation, ces tumeurs évoluent dans un microenvironnement hypoxique. Ces tumeurs sont considérées comme résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Le meilleur traitement proposé aux patients consiste à une exérèse de la tumeur pouvant aller jusqu'à l'amputation du membre touché. Malgré tout, ces tumeurs présentent un risque de récurrence relativement élevé, avec un pronostic plus mauvais que celui de la tumeur initiale. Donc, le pronostic est fortement conditionné par la rapidité de la prise en charge du CS et l'efficacité de la chirurgie.

Cette pathologie est peu symptomatique en raison d'une évolution lente de ces tumeurs. Il peut s'agir d'une douleur, d'une tuméfaction. La découverte de ces tumeurs est souvent due à une fracture pathologique. Le CS est une tumeur relativement rare (25 % des tumeurs osseuses primaires et malignes), mais qui représente la deuxième tumeur osseuse maligne la plus fréquente après l'ostéosarcome (OS). L'âge des patients atteints est compris entre 40 et 70 ans avec une légère prédominance masculine. L'incidence dans la population est de 1/200 000 par an.

### **II. Classification**

#### **1. Critères de classification**

Ce type de tumeur a été décrit pour la première fois par Liechtenstein et Jaffe en 1943. Ils ont établi les critères diagnostiques et cytologiques. Les années suivantes, des formes particulières ont été décrites. Aujourd'hui, les CS sont classés d'après des critères histologiques et anatomiques (Tableau I). Ainsi, la classification histologique permet la distinction des CS conventionnels (85% des CS) des autres CS (dédifférenciés, mésenchymateux et à cellules claires). On distinguera également, selon leur mode d'apparition, les CS primaires et

secondaires. Ces derniers se développent à partir de chondromes ou d'ostéochondromes préexistants. D'après la classification anatomique, les CS sont soit centraux (développement à partir de la région médullaire de l'os), soit périphériques, soit juxtacorticaux/périostés (Dai et al., 2011; Kim et al., 2011). De très rares cas de CS myxoïdes extra-squelettiques ont aussi été rapportés (Drilon et al., 2008).

Différents sous-types de CS	CS conventionnels		CS rares		
	Primaires centraux	Secondaires périphériques	Dédifférenciés	Mésenchymateux	A cellules claires
%	~ 75 %	~ 10 %	~ 10 %	< 2 %	< 2 %
Localisation préférentielle	Bassin	Bassin, ceinture scapulaire	Fémur et bassin	65-86 % squelette et 14-43 % extra-osseux	Epiphyse de l'humérus et de la tête fémorale
Age	> 50 ans	+ jeunes que les CS centraux	Age médian 59 ans	Tout âge	Tout âge
Grade histologique	Grade I-III		Grade élevé	Grade élevé	Grade faible
Survie	Grade I : 83 % ; II : 64 % ; III : 29 % ; à 10 ans		24 % à 5 ans	28 % à 10 ans	89 % à 10 ans
Sensibilité à la chimiothérapie	Aucune	Aucune	Incertaine	Possible si le % de cellules rondes est élevé	Aucune
Sensibilité à la radiothérapie	Faible	Faible	Faible	Possiblement élevée	Faible

**Tableau I : Vue d'ensemble des caractéristiques cliniques des sous-types de chondrosarcomes (adapté d'après Gelderblom et al., 2008).**

## 2. Les tumeurs cartilagineuses bénignes

L'apparition des CS peut survenir à la suite du développement d'une tumeur osseuse bénigne. Différents types de tumeurs bénignes du cartilage sont décrites comme les ostéochondromes, les enchondromes, les chondromes périostés ou juxtacorticaux, les chondroblastomes et les fibromes myxoïdes (Bovée et al., 2010). Nous décrirons les 3 formes les plus courantes.

### a. *Enchondromes*

L'enchondrome est un chondrome qui se développe dans l'os intramédullaire et qui se compose principalement de cartilage hyalin (Flemming and Murphey, 2000; Mulligan, 2019).

L'enchondrome solitaire représente 3 à 17 % de toutes les tumeurs osseuses primaires (Flemming and Murphey, 2000)

La prévalence des enchondromes est probablement sous-estimée car la plupart de ces lésions sont asymptomatiques, mais il arrive parfois que ces tumeurs entraînent une fracture pathologique ou un gonflement indolore d'un doigt. Ces tumeurs bénignes apparaissent à partir de 30 ou 40 ans et il n'y a pas de prédilection pour le sexe.

Les localisations les plus courantes pour l'enchondrome sont les os de la main. Cela représente 40 à 65 % des enchondromes avec une préférence pour les phalanges proximales (40 à 50 %), suivies des métacarpiens (15 à 30 %) et des phalanges moyennes (20-30 %). L'implication des phalanges distales (5-15 %) et des os carpiens sont très rares. La localisation sur les os longs (radius, cubitus, péroné) est peu fréquente. Les localisations sur les os plats (côtes, bassin, colonne vertébrale) sont extrêmement rares et celles-ci doivent faire suspecter un CS (Mulligan, 2019). L'enchondromatose, c'est à dire le développement de multiples enchondromes (maladie d'Ollier), augmente chez le patient la probabilité de développer un CS.

Les cellules présentes au sein de la tumeur sont des chondrocytes « piégés » dans l'os, conservant leurs caractéristiques chondroïdes, formant une zone de cartilage en croissance (Flemming and Murphey, 2000).

#### *b. Chondrome périosté ou juxtacortical*

Le chondrome périosté est localisé entre le tissu périosté et la corticale osseuse, plus souvent en regard des zones d'insertion ligamentaire et tendineuse. Il est moins fréquent que les enchondromes (moins de 2 % de l'ensemble des chondromes).

Sa localisation anatomique diffère, elle est plus fréquente au niveau des os longs qu'au niveau des mains et des pieds. La tumeur a un aspect cartilagineux blanc nacré, elle est lobulée et peut contenir de calcifications et des plages d'ossification enchondrale. Elle est plus cellularisée que l'enchondrome (Delaunay-Lemarié, 2011).

#### *c. Ostéochondromes*

Les ostéochondromes, communément appelés exostoses, sont les tumeurs osseuses bénignes les plus fréquentes. Ils touchent principalement les adultes de moins de 30 ans ainsi que les enfants (Alabdullrahman and Byerly, 2020). Ces tumeurs sont des excroissances osseuses à la surface de l'os composé de cartilage hyalin mature.

La localisation préférentielle se trouve au niveau de la métaphyse des os longs dans 90 % des cas (fémur distal, humérus proximal, tibia proximal) (Alabdullrahman and Byerly, 2020). Néanmoins, de multiples formes d'ostéochondromes existent.

Les personnes développant des ostéochondromes multiples ont une probabilité plus importante de développer un CS.

#### *d. Diagnostic différentiel*

La difficulté principale rencontrée durant le diagnostic est de faire la différence entre une tumeur bénigne du cartilage et un CS de bas grade. L'identification se fait à partir de l'observation clinique (Mulligan, 2019). Le CS présente, par rapport à un chondrome, une rupture de la corticale osseuse, un envahissement des parties molles et une réaction périostée. Néanmoins, l'interprétation reste difficile et la biopsie reste indispensable pour établir le diagnostic.

D'un point de vu histologique, le CS se distingue du chondrome par une légère augmentation de la cellularité, une binucléation plus importante, la présence de faibles atypies cellulaires.

Il existe peu de marqueurs moléculaires permettant de discriminer le chondrome des CS. Par exemple PTHrP (« Parathyroid-hormone-Related protein ») et Bcl-2 (« B-cell lymphoma-2 ») pourraient permettre de différencier les CS périphériques des ostéochondromes (Bovée et al., 2000). Par ailleurs, le marqueur de prolifération Ki-MCM6 (« Minichromosome Maintenance protein 6 ») a été étudié comme marqueur diagnostique entre l'enchondrome et le CS. L'indice de marquage des cellules par Ki-MCM6 pourrait être corrélé au grade histologique de la tumeur et permettrait la différenciation entre l'enchondrome et le CS de grade 1 (Helfenstein et al., 2004).

### **3. Les chondrosarcomes conventionnels centraux et périphériques**

#### **▪ Epidémiologie**

Les formes de CS les plus communes sont les CS conventionnels primaires centraux (75 % des CS localisés au centre de la cavité médullaire), puis les CS conventionnels secondaires périphériques (10%) (Tableau I). Ces derniers se développent à la surface de l'os, résultant dans la majorité des cas, d'une transformation maligne à l'intérieur de la coiffe du cartilage d'un ostéochondrome préexistant.

## ▪ Localisation

Les CS se localisent préférentiellement au niveau :

- du Pelvis (24-38 %) ;
- du fémur proximal (16-27 %) ;
- de l'humérus proximal (9 %) ;
- des côtes (8 %) ;
- du fémur distal (6 %).

Quelques localisations rachidiennes ont été mise en évidence, mais elles sont relativement rares (Gelderblom et al., 2008). Les CS centraux sont plus souvent localisés au niveau des os longs, tandis que les CS périphériques vont plus souvent être localisés au sein des os plats.

## ▪ Imagerie

L'imagerie tient une place importante dans le diagnostic des tumeurs cartilagineuses. Les aspects radiologiques de cette pathologie sont souvent corrélés à leur sous-type histologique. En effet, la matrice cartilagineuse est radio-transparente, donc seuls les foyers de calcifications ou d'ossification apparaissent en radiologie standard (**Figure 1**).

La tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) présentent un intérêt certain dans la visualisation des critères d'agressivité. Un scanner permet de détecter et de caractériser la matrice minéralisée ainsi que l'atteinte endostéale. L'IRM est idéale pour décrire l'extension médullaire et la visualisation de l'œdème péri-tumoral (Murphey et al., 2003).

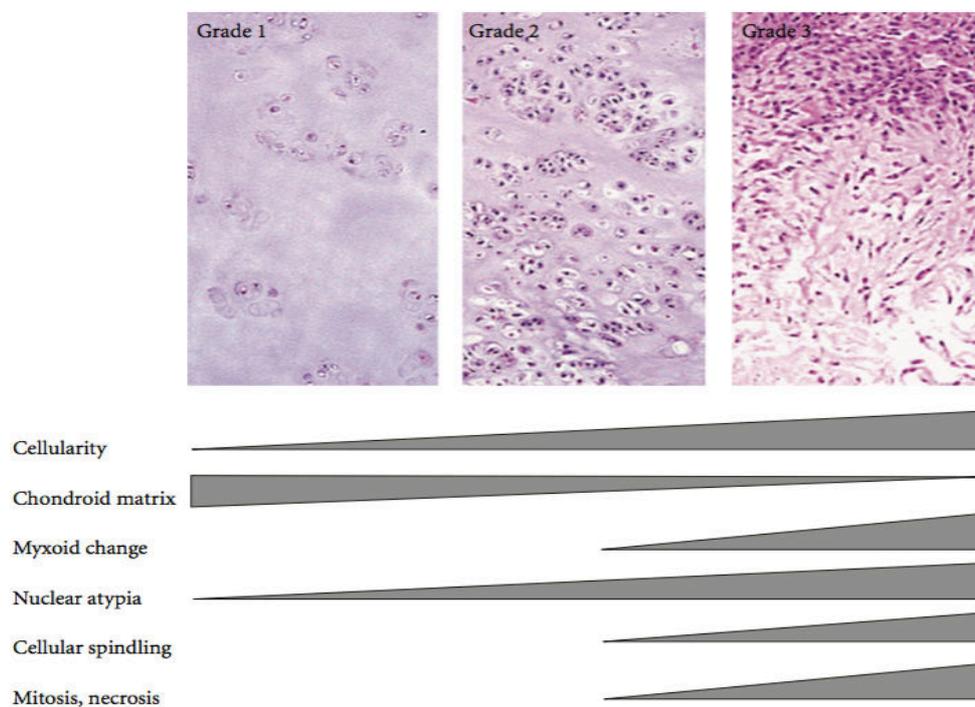
**Figure 1 : Radiographie d'un chondrosarcome conventionnel intramédullaire.** Les radiographies antéro-postérieures et latérales présentent une lésion tibiale diaphysaire étendue à prédominance lytique. Des zones de minéralisation matricielle chondroïde sont observées en haut (grande flèche), un foyer de festonnage profond (petites flèches), de remodelage cortical, et de réaction périostéale (pointes de flèche) (d'après Murphey et al., 2003).

---



### ▪ Grade histologique des CS conventionnels

La classification histologique des CS est basée sur leur aspect microscopique (Kim et al., 2011). Les chondrocytes de CS sont atypiques, ils présentent des binucléations et un polymorphisme. Des zones de nécrose peuvent être présentes dans les tumeurs. La matrice extracellulaire (MEC) peut être chondroïde ou myxoïde (riche en protéoglycanes et en mucopolysaccharides). Les CS conventionnels sont gradés de 1 à 3, selon une classification proposée en 1952 par O’Neal et Ackerman (O’Neal and Ackerman, 1952) et reprise par Evans (Evans et al., 1977) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Représentation schématique illustrant le système de gradation du chondrosarcome conventionnel (d’après Kim et al., 2011).**

**Grade 1 :** C’est une tumeur cartilagineuse très bien différenciée qui pose le problème du diagnostic différentiel avec un chondrome. Néanmoins, par rapport à ce dernier, le CS de grade 1 présente une cellularité légèrement augmentée. Les noyaux des chondrocytes de CS possèdent une chromatine très dense. De volumineuses calcifications sont présentes. Les remaniements myxoïdes sont réduits et il n’y a pas ou peu d’activité mitotique.

**Grade 2 :** La tumeur est de nature cartilagineuse et maligne. La cellularité est plus importante que pour le grade 1. Il y a également une augmentation des atypies nucléaires, les noyaux sont hyperchromatiques et d'un volume plus important. La matrice devient myxoïde.

**Grade 3 :** La tumeur est maligne avec une différenciation cartilagineuse difficile à établir. La tumeur est très cellularisée avec des cellules fusiformes. Les chondrocytes tumoraux sont de grande taille et les mitoses sont facilement observables. Les remaniements myxoïdes et nécrotiques sont très marqués. Les calcifications sont rares voir absentes.

- **Evolution**

Ce type de tumeur est peu métastasique, néanmoins les métastases sont le plus souvent pulmonaires. Elles peuvent également être osseuses, cérébrales ou ganglionnaires. Les risques de récurrence locale, de métastases et la survie globale sont corrélés avec le grade histologique. Pour les CS conventionnels, le pronostic est corrélé avec le grade de la tumeur ainsi que sa localisation : 82 à 99 % de survie à 5 ans pour les grades 1, 63 à 92 % pour les grades 2, et 39 à 77 % pour les grades 3 (Nota et al., 2015).

#### **4. Les chondrosarcomes juxtacorticaux ou périostés**

Les CS juxtacorticaux/périostés représentent une faible minorité des CS qui se développent à la surface de l'os (environ 1 %). Ils pourraient provenir du périoste et ont une histologie semblable à celle des CS conventionnels. Ils se distinguent des CS secondaires périphériques par un meilleur pronostic après une chirurgie locale.

#### **5. Les chondrosarcomes non conventionnels**

Les CS dits non conventionnels sont également rares, ils représentent moins de 10-15 % de l'ensemble des CS totaux (Gelderblom et al., 2008).

##### *a. Les chondrosarcomes dédifférenciés*

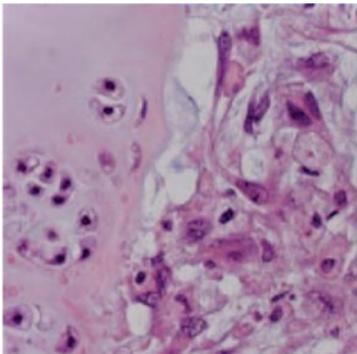
- **Epidémiologie, localisation**

Les CS dédifférenciés correspondent à une tumeur non cartilagineuse de haut grade ayant un mauvais pronostic juxtaposé à une tumeur cartilagineuse bien différenciée. Cette co-localisation entre ces deux types tumoraux est bien distincte avec une transition nette. Ils représentent environ 10 % des CS. Ils siègent au niveau du pelvis, du fémur et de l'humérus.

L'âge de survenue est identique aux CS conventionnels. Cependant l'évolution tumorale est plus rapide que pour les CS conventionnels.

- **Histologie**

La composante cartilagineuse de ce type de tumeur correspond à un CS de bas grade, tandis que la composante sarcomateuse de haut grade peut correspondre à un histiocytofibrome malin, à un OS ou à un fibrosarcome (**Figure 3**).



**Figure 3 : Histologie d'un chondrosarcome dédifférencié. Présence d'un chondrosarcome (à gauche) avec un fibrosarcome (à droite) (coloration hématoxyline et éosine, x500 ; d'après Gelderblom et al., 2008).**

---

- **Evolution**

Cette tumeur est souvent liée à un mauvais pronostic. La survie à 5 ans est inférieure à 10 %. Les métastases sont fréquentes avec une localisation pulmonaire, puis viscérale et osseuse. 90 % des patients décèdent dans les 2 ans qui suivent le diagnostic.

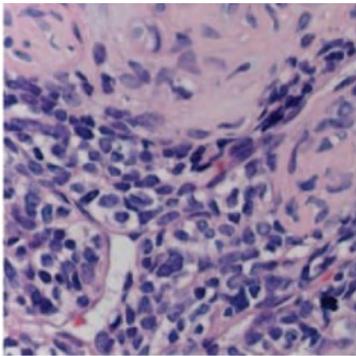
*b. Les chondrosarcomes mésenchymateux*

- **Epidémiologie, localisation**

Le CS mésenchymateux est retrouvé plus souvent chez des patients plus jeunes. Il correspond à une tumeur hautement maligne des os et des tissus mous. Sa caractéristique principale est qu'il est composé d'un mélange de cartilage hyalin contenant des chondrocytes différenciés et de cellules rondes indifférenciées. Ces deux caractéristiques n'ont pas de démarcation nette entre elles, à la différence des CS dédifférenciés. Ce type de CS ne représente que 2 % des CS. L'âge de survenue est en moyenne de 26 ans (Bovée et al., 2010). Il se localise majoritairement au niveau de la région craniofaciale (15 à 30 %) (Kim et al., 2011). Le taux de survie à 10 ans se situe bien en dessous de 50 %.

- **Histologie**

Les CS mésenchymateux correspondent à l'association d'un contingent chondrosarcomateux de bas grade à un contingent indifférencié de cellules rondes (**Figure 4**). La vascularisation est de type hémangiopéricytaire. Ces deux contingents ne sont pas démarqués l'un de l'autre de façon nette. On peut voir des cellules géantes multinucléées « osteoclast-like ».



**Figure 4 : Histologie d'un chondrosarcome mésenchymateux avec présence de cellules rondes indifférenciées (marquage bleu). Coloration hématoxyline et éosine, x500 ; d'après Gelderblom et al., 2008).**

---

- **Evolution**

Ils sont considérés comme des CS malins de haut grade. Les métastases sont assez fréquentes. Le risque de récurrence et de métastases est élevé même après un long recul post-chirurgical. Les sites métastatiques sont les poumons, les os, les tissus mous et les ganglions.

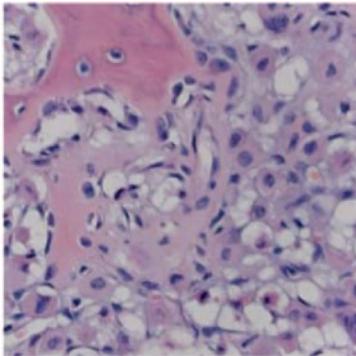
*c. Les chondrosarcomes à cellules claires*

- **Epidémiologie, localisation**

Le CS à cellules claires est une tumeur maligne de faible grade associant un contingent cartilagineux hyalin. Elle est caractérisée par la présence de cellules malignes dont le cytoplasme est clair et vide, avec des chondrocytes hypertrophiques. Ce type de tumeur ne représente que 2 à 6 % des CS. L'âge de survenue est compris entre 25 et 50 ans avec une moyenne à 34 ans. Sa localisation est préférentiellement située sur l'extrémité proximale du fémur et de l'humérus (2/3 des cas), mais il peut se développer sur l'épiphyse des os longs. De plus, les métastases sont rares mais peuvent survenir jusqu'à 24 ans après le diagnostic initial.

- **Histologie**

Les cellules tumorales ont un cytoplasme abondant, clair et des limites membranaires bien visibles (**Figure 5**). Les mitoses sont rares. On trouve dans ces tumeurs des cellules géantes multinuclées « osteoclast-like ». Des zones de CS conventionnel de bas grade comprenant parfois des calcifications ou des zones d'ossifications réactionnelles sont associées à ces tumeurs.



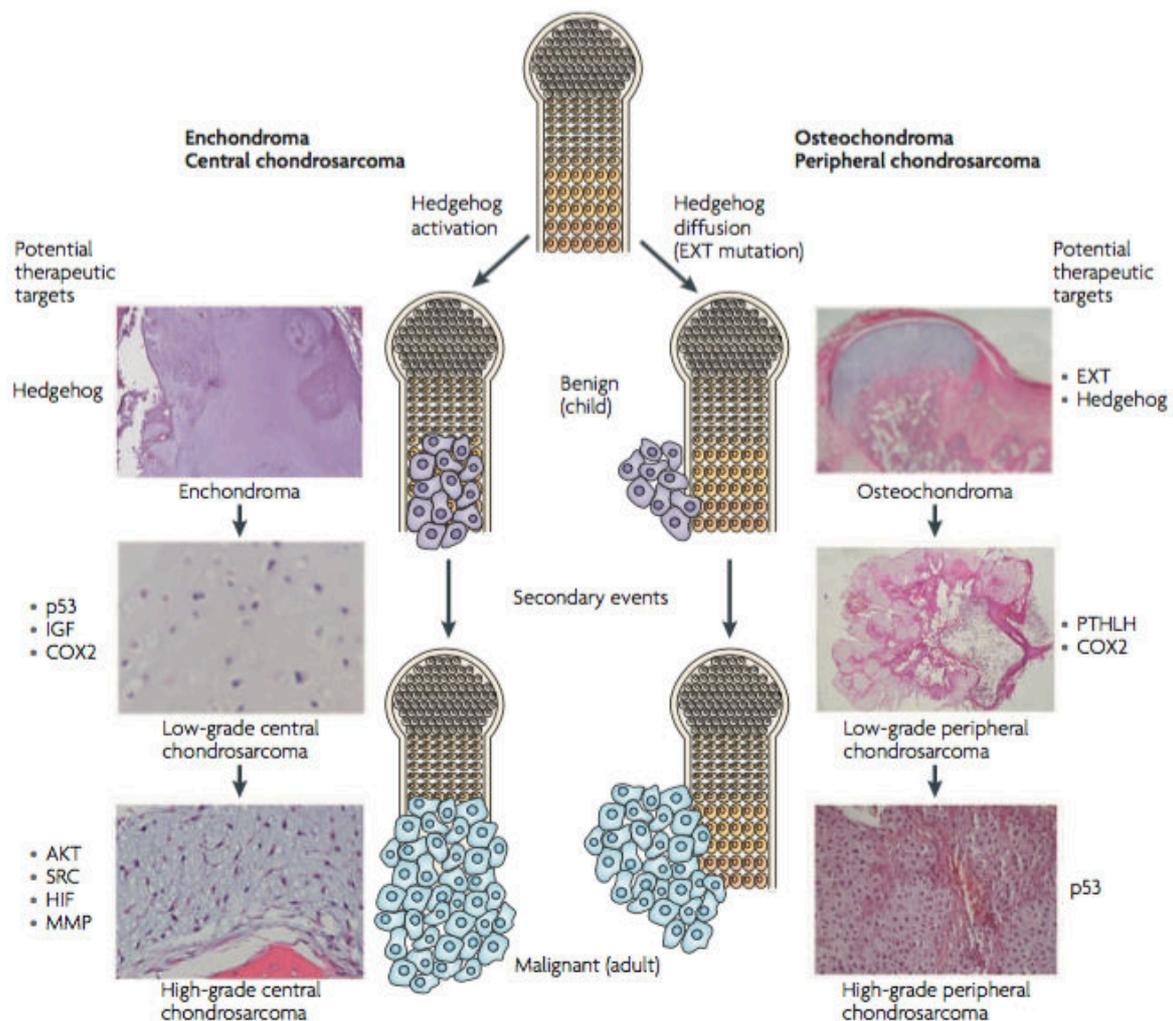
**Figure 5 : Histologie d'un chondrosarcome à cellules claires présentant des chondrocytes avec un cytoplasme clair et abondant, une matrice cartilagineuse et un dépôt d'ostéoïde (coloration hématoxyline et éosine, x500 ; d'après Gelderblom et al., 2008).**

- **Evolution**

Ces tumeurs sont considérées comme des CS malins de bas grade. Les récurrences et les métastases sont peu fréquentes. Les localisations métastatiques préférentielles sont les poumons, le cerveau et les os (Kim et al., 2011).

### III. Les altérations génétiques et moléculaires les plus fréquentes dans les chondrosarcomes

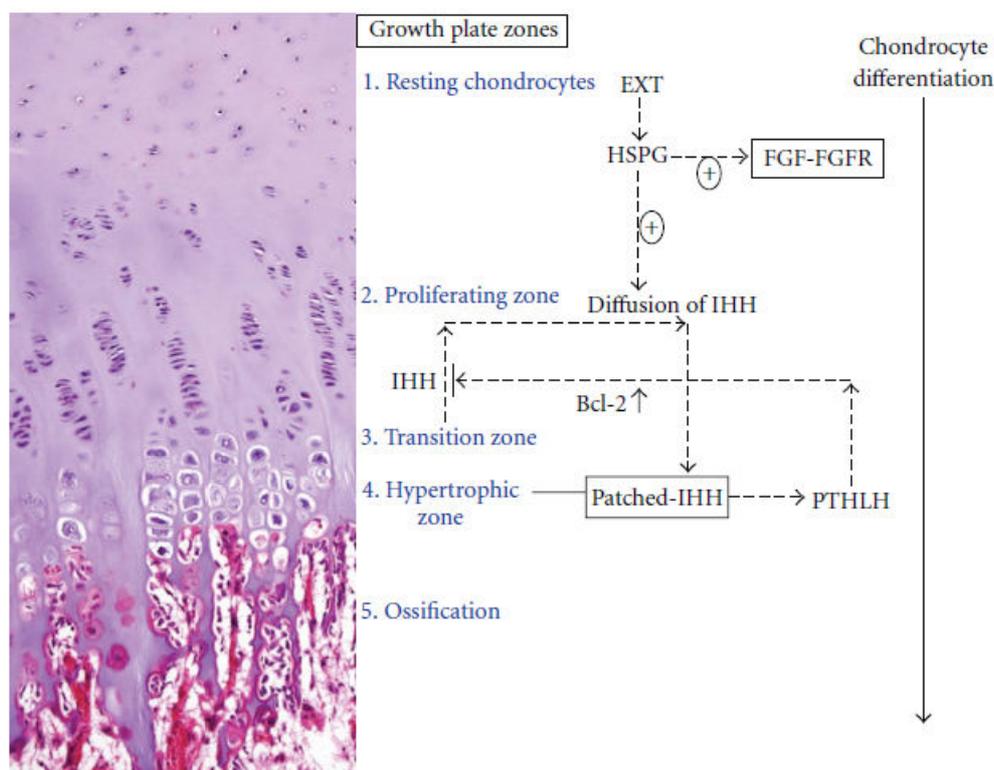
L'origine cellulaire des différents types de CS a été mise en évidence depuis plusieurs années. En revanche, les bases moléculaires du développement des CS commencent tout juste à être bien établi (de Jong et al., 2016). Des changements moléculaires précoces vont affecter le devenir des chondrocytes, tandis que des changements plus tardifs vont mener au phénotype malin (**Figure 6**) (Bovée et al., 2010; Samuel et al., 2014).



**Figure 6 : Développement des tumeurs cartilagineuses bénignes et leur progression vers le CS.** Au cours du stade précoce, les mutations IDH1/2 (Isocitrate déshydrogénase) et de la voie IHH/PTHrP (Indian Hedgehog/ Parathyroid Hormone related Protein) sont retrouvées au sein de lésions cartilagineuse bénignes ainsi que dans les tumeurs malignes. Celles-ci ne sont pas impliquées directement dans la transformation vers le phénotype malin, mais affectent le comportement des chondrocytes normaux. Par ailleurs, les modifications des gènes *EXT* (Exostine) favorisent l'apparition de mutations supplémentaires dans les chondrocytes normaux. Lors des stades tardifs, des mutations dans les voies p53 et pRB favorisent le développement tumoral. Les gains et pertes aléatoires de régions chromosomiques peuvent résulter des mutations de ces gènes, mais également d'autres gènes suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes (d'après Bovée et al., 2010).

## 1. Contrôle moléculaire de l'ossification endochondrale

La plaque de croissance est composée de chondrocytes à différents stades de différenciation durant la croissance longitudinale de l'os. Ce phénomène est régulé par la voie de signalisation IHH (« Indian Hedgehog »)/PTHrP (« Parathyroid Hormone related Protein »). Les trois ligands « Sonic Hedgehog » (SHH), « Desert Hedgehog » (DHH) et IHH peuvent activer la voie de signalisation « Hedgehog ». La protéine IHH est exprimée par les chondrocytes de la zone de transition, où elle diffuse et se lie à Patched dans la zone hypertrophique, ce qui stimule l'expression de PTHrP, qui se lie à son récepteur dans la zone de transition. Cela entraîne une sur-expression de Bcl-2, qui inhibe la différenciation des chondrocytes et diminue la sécrétion d'IHH. D'autre part, les gènes de la famille EXT (Exostine) codent des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de chaînes d'héparane-sulfate entrant dans la composition des protéoglycanes. Ces protéoglycanes à héparane-sulfate (HSPGs) jouent un rôle dans la diffusion d'IHH, PTHrP et du « Fibroblast Growth Factor » (FGF) dans la matrice (Kim et al., 2011) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Représentation des signaux d'IHH/PTHrP au sein de la plaque de croissance.** La plaque de croissance est composée de chondrocytes à différents stades de différenciation, ce qui conduit finalement à une croissance osseuse longitudinale. Ce processus est étroitement régulé par la signalisation IHH/PTHrP. L'IHH, exprimé par les chondrocytes de la zone de transition, diffuse au sein de la plaque de croissance (d'après Kim et al., 2011).

## 2. Changements précoces

Les gènes IDH1 et IDH2 codent respectivement l'isocitrate déshydrogénase (IDH) 1 et 2. Ces enzymes convertissent l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) au cours du cycle de Krebs. Leurs mutations provoquent un gain de fonction et induisent une conversion supplémentaire de  $\alpha$ -KG en oncométabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG), ce qui entraîne des hyperméthylations des histones et de l'ADN (Dang et al., 2009). Des mutations hétérozygotes des gènes IDH1 et IDH2 sont fréquemment rencontrées dans les CS centraux, dédifférenciés, périostaux et intra-crâniens. Environ 59 % des CS conventionnels possèdent cette mutation, 54 % des CS dédifférenciés, 100 % des CS périostés et 87 % des enchondromes (Amary et al., 2011; Pansuriya et al., 2011). Une étude suggère que ces mutations auraient la capacité de modifier les propriétés de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse (Jin et al., 2015). En effet, l'étude propose que la mutation IDH1 R132C soit à l'origine d'une dérégulation de la différenciation chondrogénique et ostéogénique, *via* une hyperméthylation des histones des CSM. Cette hyperméthylation exerce une régulation épigénétique permettant une surexpression des gènes *SOX9* (« SRY-box 9 »), *RUNX2* (« Runt-related transcription factor 2 »), *Osterix*, *COL2A1* (« gène codant la chaîne alpha 1 du collagène de type II ») et *COL10A1* (« gène codant la chaîne alpha 1 du collagène de type X »). La famille des gènes *SOX* est fortement impliquée dans la chondrogenèse en régulant notamment l'expression de *COL2A1*, *COL9A1*, *COL11A1* et *ACAN* (gène codant l'agrécan) (Lefebvre, 2019).

IHH est exprimé par les chondrocytes pré-hypertrophique. IHH stimule la synthèse de PTHrP par les cellules périphériques. En retour, PTHrP inhibe la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance et l'expression d'IHH. La voie IHH/PTHrP est activée de manière constitutive dans les CS centraux. L'activation de la voie Hedgehog, constant au cours de la progression tumorale, permettrait aux cellules tumorales de rester dans un état prolifératif (Bovée et al., 2010; Tarpey et al., 2013). De plus, une étude immunohistochimique met en évidence qu'une augmentation du niveau d'expression de PTHrP et de son récepteur PTHR est corrélée au grade tumoral. PTHrP pourrait donc être un marqueur de progression tumorale dans les CS (Samuel et al., 2014). Néanmoins, d'autres études ont montré que dans les CS périphériques de haut grade, la voie de signalisation IHH est diminuée (Bovée et al., 2010; Gelderblom et al., 2008).

*EXT1* et *EXT2* sont deux gènes codant l'exostine (Samuel et al., 2014). Ils sont impliqués dans la synthèse de l'héparane-sulfate. Les PG à héparane-sulfate se lient au ligand

Hedgehog dans la matrice extracellulaire des plaques de croissance, réduisant ainsi la diffusion d'IHH. Il en résulte une diminution de la prolifération des chondrocytes et l'augmentation de la différenciation hypertrophique (Bovée et al., 2010). Tarpey et al. (2013) ont mis en évidence dans les CS périphériques de grade I une mutation hétérozygote des gènes *EXT1* et *EXT2*. Ces mutations provoquent une altération de l'expression d'héparane-sulfate et entraînent une accumulation d'IHH dans la MEC. Cette accumulation peut entraîner une perte de l'organisation polaire et donc une croissance des chondrocytes dans le sens inverse de la plaque de croissance (Bovée et al., 2010). En revanche, l'exostine ne serait pas impliquée dans l'apparition des CS centraux (Gelderblom et al., 2008).

### 3. Changements tardifs

Les modifications moléculaires précoces permettent d'initier une prolifération cellulaire anormale. En effet, comme nous l'avons vu, certaines de ces modifications peuvent également être retrouvées au sein de tumeurs cartilagineuses bénignes. Cependant, d'autres modifications plus tardives sont nécessaires afin de permettre à la tumeur d'évoluer efficacement vers le phénotype malin (Bovée et al., 2010; Samuel et al., 2014) (**Figure 6**). Ces modifications comprennent de nombreuses anomalies chromosomiques et des modifications d'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs.

La protéine p53 codée par le gène *TP53* a été très étudiée dans les cancers car elle est un régulateur clef dans la progression du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose. Le gène *TP53* est également fréquemment muté dans les tumeurs. 96 % des CS présentent une altération de la voie p53 (Bovée et al., 2010). Son rôle est donc important pour la progression tumorale et son niveau d'expression est corrélé au grade de la tumeur.

La protéine pRB (« Retinoblastoma protein ») est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Elle inhibe le facteur de transcription E2F, qui contrôle l'entrée en phase S du cycle cellulaire. La protéine pRB est elle-même inhibée par la « Cyclin dependent Kinase 4 » (CDK4), elle-même inhibée par la protéine p16 (gène *CDKN2*). Dans le CS, de nombreuses preuves ont été apportées sur la dérégulation de la voie pRB au niveau de p16 ou des cyclines (Tarpey et al., 2013). Samuel et al. (2014) expliquent par exemple que la perte d'expression de p16 est hautement liée au grade tumoral.

La voie « phosphoinositide 3-kinase/protein Kinase B/ Mammalian Target Of Rapamycin Kinase » (PI3K)/Akt/mTOR) est constitutivement activée dans de nombreux cancers. Elle diminue l'activation de l'apoptose et permet la prolifération cellulaire. Une fois

activée, la signalisation par Akt peut être propagée à un large éventail d'enzymes de signalisation dont mTOR. mTOR sert de point de convergence pour de nombreux stimuli de croissance cellulaire et contribue donc à l'initiation et au maintien de la carcinogenèse. Une étude a montré une forte activation de mTOR dans 69 % des CS conventionnels (Zhang et al., 2013b).

## **IV. Traitements conventionnels des chondrosarcomes**

### **1. Les chondrosarcomes de grade I**

Pour les CS de bas grade, le traitement actuel consiste en un curetage intra-lésionnel extensif suivi d'une thérapie adjuvante locale (phénolisation et cryochirurgie), puis d'un remplissage de la cavité par une greffe osseuse (Gelderblom et al., 2008). Cette technique montre des résultats cliniques prometteurs et un contrôle local satisfaisant.

### **2. Les chondrosarcomes de grade II et III**

La résection chirurgicale est le traitement privilégié pour les CS intermédiaires et de haut grade. Cependant, elle peut conduire à des complications considérables ainsi qu'une reconstruction plus ou moins complexe en fonction de l'emplacement de la tumeur (Gelderblom et al., 2008). Les CS sont considérés comme relativement résistants à la radiothérapie, mais un traitement par radiothérapie peut malgré tout être effectué après une résection incomplète de la tumeur. Cependant cela entraîne souvent un pronostic défavorable pour le patient (Dai et al., 2011).

### **3. La chimiothérapie**

#### *a. Principe*

La chimiothérapie vise à détruire les cellules cancéreuses ou les empêcher de se multiplier. Généralement, une combinaison d'agents chimiothérapeutiques est utilisée pour agir sur des cibles cellulaires différentes. Ils sont classés selon leur mode d'action. Les agents alkylants, comme le cisplatine, le cyclophosphamide ou encore l'ifosfamide, forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN et inhibent ainsi la réplication. Les agents anti-métabolites (gencitabine, fludarabine, méthotrexate...) bloquent une ou plusieurs voies

desynthèse de l'ADN. Les antibiotiques cytotoxiques (docétaxel, vincristine...) inhibent la division cellulaire en s'intercalant à l'ADN ou en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les inhibiteurs de topoisomérase, tels la doxorubicine ou l'étoposide, perturbent la structure, la réplication et la transcription de l'ADN.

### *b. Cas du chondrosarcome*

Les traitements chimiothérapeutiques, par leur mode d'action, sont efficaces sur des cellules avec un fort potentiel de division, ce qui n'est pas le cas des CS de bas grade ou de grade intermédiaire, qui ont une faible capacité proliférative. De plus, l'abondante MEC des CS et leur faible vascularisation empêchent l'accès des drogues aux cellules. D'autres facteurs sont aussi responsables de la résistance à la chimiothérapie. L'ensemble de ces mécanismes agissent simultanément au sein de la cellule tumorale. La résistance est donc multifactorielle. La chimiothérapie n'a pas montré d'effet sur les CS conventionnels de bas grade, les CS à cellules claires et les CS périostés. Toutefois, elle peut être proposée pour les CS de haut grade, ou pour les CS dédifférenciés, ainsi que pour les CS mésoenchymateux (Gelderblom et al., 2008; Whelan and Davis, 2018). Les agents chimiothérapeutiques employés seuls ou en association pour le traitement des CS de haut grade, dédifférenciés ou mésoenchymateux sont principalement : le cisplatine, le méthotrexate (MTX), la doxorubicine et l'ifosfamide.

L'étude d'Italiano et al. montre que la chimiothérapie conventionnelle a une efficacité limitée pour les CS avancés, avec toutefois de meilleurs résultats pour les CS mésoenchymateux et dédifférenciés (Italiano et al., 2013). De plus, les auteurs constatent que la combinaison de plusieurs agents chimiothérapeutiques n'augmente pas la survie globale. Dans leur cohorte de 180 patients (âge médian de 52 ans), traités soit par chimiothérapie combinée (54,5%), soit par un seul agent chimiothérapeutique (45,5%), la survie médiane globale était seulement de 18 mois. Le taux de survie global à 2 ans était de 37%.

### *c. Mode d'action du cisplatine*

Le cisplatine également appelé cis-diaminedichloroplatine (CDDP) est une molécule dérivée du platine appartenant à une classe d'agents anticancéreux et décrit pour la première fois en 1845 par le chimiste italien Michele Peyrone. 120 ans plus tard, Rosenberg et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle antiprolifératif du CDDP sur des cultures d'*Escherichia Coli* (Rosenberg et al., 1965), et par la suite dans des xénogreffes de tumeurs

solides et hématopoïétiques. Depuis, le CDDP est l'un des plus puissants agents anti-tumoraux connus et il est employé couramment en clinique pour lutter contre de nombreux cancers (Galluzzi et al., 2014).

Deux mécanismes permettent l'entrée du CDDP à l'intérieur de la cellule. Il diffuse passivement à travers la membrane plasmique, mais le mécanisme majoritaire est une entrée active *via* des transporteurs de cuivre dont le principal est CTR1 (« Copper Transporter 1 »). Par ailleurs, le CDDP peut également être expulsé à l'extérieur de la cellule par d'autres transporteurs de cuivre comme ATP7B (« ATPase, Cu<sup>2+</sup> transporting, beta polypeptide ») et ATP7A (« copper-transporting ATPase 1 ») et des transporteurs de la membrane plasmique tels que MRP2 (« Multidrug Resistance-associated Protein 2 ») et ATP11B (ATPase, class VI, type 11B) (Galluzzi et al., 2014).

Lorsque le CDDP entre dans la cellule, l'un ou ses deux groupements *cis*-chloro est/sont remplacé(s) par une molécule d'eau et il devient alors très électrophile. Il a alors une action génotoxique et/ou cytotoxique. Plusieurs mécanismes de cytotoxicité du CDDP dans le cytosol ont été proposés (Galluzzi et al., 2014). Parmi ceux-ci, le CDDP hydraté électrophile se lie de façon covalente à la méthionine et à beaucoup de protéines contenant des cystéines, comme le glutathion réduit (GSH) et les métallothionéines. Cela contribue à son inactivation, mais réduit aussi le pool d'anti-oxydants et engendre une accumulation des ROS qui contribuent aux dommages à l'ADN et à la cytotoxicité du CDDP.

Le CDDP hydraté se lie aussi avec une forte affinité à l'ADN mitochondrial et nucléaire, plus particulièrement sur les purines au niveau des sites N7 nucléophiles. Cela favorise la génération de complexes ADN-ADN hétérotypiques et des adduits à l'ADN tels que des réticulations intra-brins adénine-guanine ou guanine-guanine et des réticulations inter-brins (Roos and Kaina, 2013; Siddik, 2003).

Si la quantité de lésions de l'ADN est limitée, celles-ci peuvent être reconnues et éliminées par plusieurs systèmes de réparation. Il en résulte la phosphorylation des kinases Akt et ATM (« Ataxia Telangiectasia Mutated ») entraînant un arrêt transitoire du cycle cellulaire en phase S et l'activation des voies de réparation telles que la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des bases mésappariées (MMR) et la recombinaison homologue (RH).

Si les lésions provoquées par le CDDP sont irréversibles, la cellule meurt *via* l'activation des voies intrinsèque (mitochondriale) et/ou extrinsèque (récepteurs de mort) de l'apoptose (Figure 8).

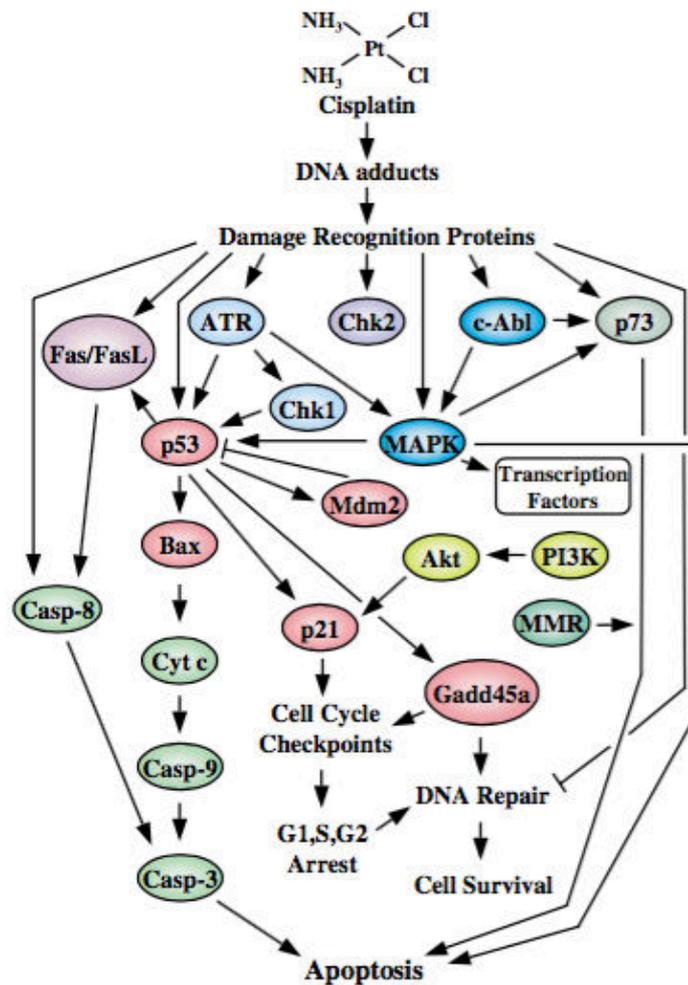


Figure 8 : Aperçu des voies impliquées dans la médiation des effets cellulaires du cisplatine (d'après Siddik, 2003).

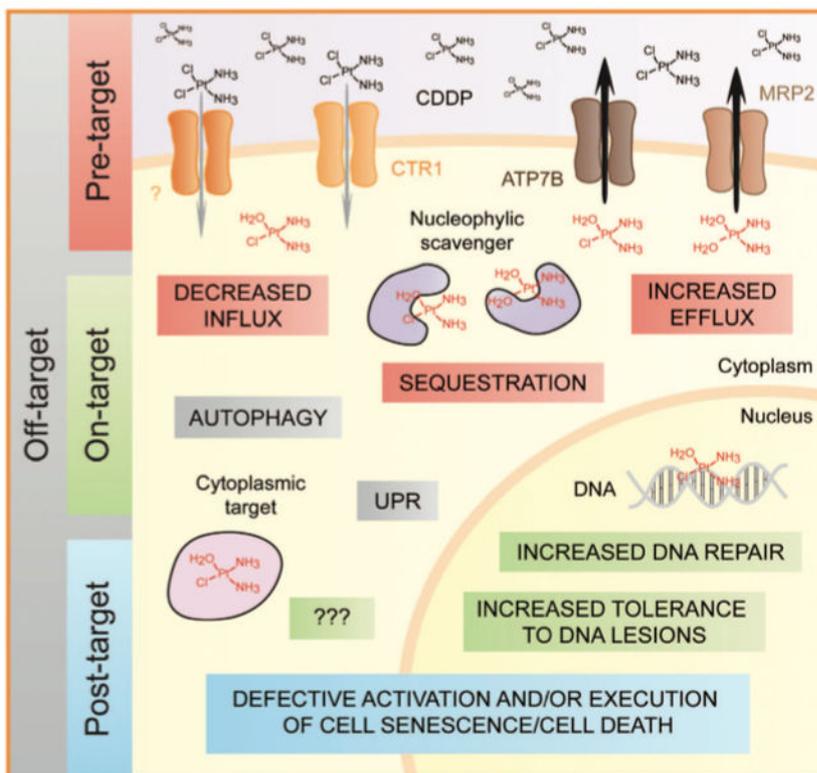
#### d. Mécanismes de résistance au cisplatine

La chimiothérapie anticancéreuse a pour but d'induire la mort des cellules tumorales. Le CDDP est un inducteur d'apoptose. Cependant, une résistance peut être acquise à cause de phénomènes intrinsèques ou d'une exposition chronique (Figure 9).

L'effet « pre-target » : la résistance des cellules peut être liée à des altérations réduisant la quantité de CDDP dans le cytoplasme. Deux mécanismes sont responsables : une réduction de l'accumulation du CDDP intracellulaire ou/et une augmentation de la séquestration du CDDP par les GSH (Glutathion) et les métallothionéines. En effet, dans des modèles

précliniques et chez des patients atteints d'un cancer, des altérations du niveau d'expression, de la localisation et/ou de la fonctionnalité des transporteurs CTR1 et ATP7B ont été associées à la résistance au CDDP (Galluzzi et al., 2014). Le transporteur MRP2, responsable de l'efflux du CDDP, est aussi impliqué dans la résistance. Ce transporteur est surexprimé par les cellules résistantes au CDDP (Siddik, 2003).

L'effet « on-target » : la présence d'un système efficace de réparation de l'ADN entraîne une diminution de la sensibilité aux effets cytotoxiques induit par le CDDP. Les principales voies utilisées pour réparer les lésions de l'ADN sont les voies NER et MMR. Une augmentation de l'efficacité de ces voies est corrélée avec une augmentation de la résistance (Galluzzi et al., 2014).



**Figure 9 : Mécanismes de résistance au cisplatine.** Les cellules malignes peuvent perdre leur sensibilité à l'effet cytostatique/cytotoxique du cisplatine. Ces altérations peuvent : affecter les processus qui précèdent la liaison effective du cisplatine à ses cibles (effet « pre-target ») ; potentialiser la capacité des cellules à réparer les dommages moléculaires causés par le cisplatine (effet « on-target ») ; altérer la transmission des signaux qui induisent l'activation de la sénescence ou l'apoptose suite aux dommages causés à l'ADN (effet « post-target ») ; stimuler la transmission des signaux de survie (effet « off-target ») (d'après Galluzzi et al, 2014).

L'effet « post-target » : la résistance peut être également liée à une altération des systèmes cellulaires permettant l'activation et l'expression des signaux de mort cellulaire. En effet, une mutation du gène p53 est corrélée avec une réponse faible des cellules en contact avec le CDDP (Siddik, 2003). Ensuite, des protéines anti-apoptotiques telles que la survivine et XIAP (« X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein ») interviennent dans la résistance au CDDP. Dans les cellules résistantes, elles diminuent l'activité des caspases 3, 8 et 9 de manière directe

ou indirecte. Enfin, une surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 est corrélée à la résistance au CDDP (Galluzzi et al., 2014).

L'effet « off-target » : le CDDP peut également induire indirectement l'activation de voies de signalisation de survie : sur-expression d'oncogènes, activation de kinases... (Galluzzi et al., 2014).

## 4. La radiothérapie

### a. Principe

La radiothérapie utilise les propriétés des radiations ionisantes pour détruire ou ralentir la croissance des cellules tumorales. Aujourd'hui, ce type de traitement est utilisé dans deux tiers des traitements, seul ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie. Les protocoles de radiothérapie dépendent du type de tumeur, de sa localisation, de sa taille, de son extension et de son grade. Classiquement, la dose totale de radiation est délivrée par fraction de 2 Gray (Gy) : une fraction par jour, 5 jours par semaine. Ce *ratio* est souvent un bon compromis entre l'efficacité anti-tumorale et la tolérance des tissus sains aux irradiations. En effet, cet étalement et ce fractionnement de la dose d'irradiation permettent une régénération des tissus sains traversés par le faisceau d'irradiation qui est plus rapide que pour les cellules tumorales. Cependant, certaines tumeurs acquièrent une résistance aux irradiations.

### b. Cas du chondrosarcome

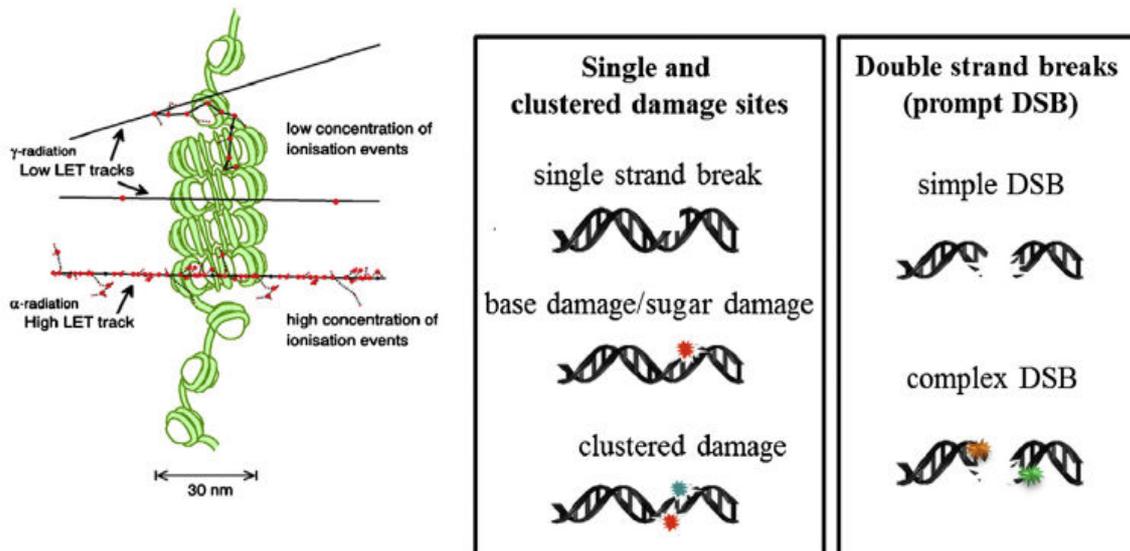
Le CS est initialement résistant aux rayonnements donc dans le cas d'une résection incomplète ou impossible, une dose élevée de radiothérapie doit être utilisée (supérieure à 60 Gy). Dans l'analyse rétrospective réalisée par Catanzano et al., le taux de survie global à 5 ans de patients atteints d'un CS et ayant subis une radiothérapie conventionnelle était de 48% (294 patients entre 2004 et 2015 aux Etats-Unis, doses palliatives (<40Gy) à des doses >60Gy) (Catanzano et al., 2019). L'étude d'une autre cohorte de 264 patients atteints d'un CS primaire associé à la présence de métastases entre 2000 et 2013 en Chine, donne un taux de survie global de la cohorte à 5 ans de 28,4% (Wang et al., 2019). L'analyse multivariée réalisée a montré que la radiothérapie (doses non précisées) n'avait pas eu d'effet sur la survie globale. Ainsi, la survie médiane était de  $6 \pm 1,7$  mois sans traitement, de  $7 \pm 0,9$  mois avec uniquement de la

radiothérapie, de  $30 \pm 10,3$  mois avec uniquement une chirurgie, et de  $22 \pm 7,8$  mois avec une chirurgie associée à une radiothérapie.

*c. Mode d'action de la radiothérapie conventionnelle*

▪ Les lésions induites.

La radiothérapie conventionnelle utilise les rayons X et les rayons gamma ( $\gamma$ ). Ils sont capables de créer des lésions de manière directe ou indirecte, par l'intermédiaire des ROS provenant de la radiolyse de l'eau (Kim et al., 2015; Lomax et al., 2013; Roos and Kaina, 2013). Les altérations se traduisent par des modifications de base, des cassures de l'ADN simple-brin, des cassures double-brin ou encore des pontages inter- ou intra-brins (**Figure 10**). En fonction du nombre de cassures et de l'altération des mécanismes de réparation, les irradiations conduisent à la mort cellulaire essentiellement par apoptose et catastrophe mitotique. 40 % des lésions de l'ADN sont une conséquence directe de dépôts d'énergie au sein des cellules tumorales et 60 % sont liées aux effets indirects de l'irradiation.



**Figure 10 : Représentation schématique des dommages de l'ADN.** Les dommages à l'ADN comprennent des dommages simples et groupés et des cassures double-brin simples ou complexes. Ils sont formés par le passage du rayonnement. Les rayonnements à faible transfert d'énergie induisent des concentrations plus faibles d'évènements d'ionisation et donc des sites de dommages à l'ADN moins complexes que les rayonnements à haut transfert d'énergie. Les étoiles colorées représentent des lésions sur les bases ou sur les sucres (d'après Lomax et al., 2013).

- **Signalisation des lésions à l'ADN.**

Les radiations ionisantes causent des dommages irréversibles à l'ADN, mais déclenchent parfois des mécanismes de défense (Kim et al., 2015). Des mécanismes de surveillance détectent des lésions et entraînent les cellules vers la mort ou vers la réparation. Ces mécanismes sont totalement dépendants du type cellulaire, de la fonction et de l'état de prolifération des cellules au sein de l'organisme. Par exemple, une étude sur le CS a analysé l'implication des protéines IDH1/2 dans la résistance de ce type de tumeur à la radiothérapie. En effet, dans le gliome, les mutations IDH1R132H et IDH2R172K sensibilisent les cellules à la radiothérapie, et augmentent la survie des patients (Li et al., 2013a; Molenaar et al., 2015). En revanche, les résultats de l'étude menée sur le CS n'a pas montré de corrélation entre les mutations IDH1/2 et la radiorésistance (de Jong et al., 2019).

## **V. Mécanismes de résistance des chondrosarcomes aux traitements conventionnels**

La compréhension des mécanismes de résistance représente un enjeu majeur pour, à terme, parvenir à trouver de nouvelles cibles moléculaires afin d'améliorer ou remplacer les méthodes de traitements actuels. Les hypothèses expliquant ces phénomènes de résistance sont présentées ci-dessous.

### **1. L'environnement tumoral des chondrosarcomes**

Le contexte microenvironnemental et physiopathologique des CS permet d'expliquer en partie leur résistance face aux traitements conventionnels. En effet, les CS synthétisent une MEC abondante, présentent une faible vascularisation et possèdent également un faible pourcentage de division cellulaire. Dans ce contexte, l'efficacité de la distribution et la diffusion des drogues au sein de ces tumeurs peuvent être altérées.

De plus, la faible vascularisation confère un environnement hypoxique au sein des tumeurs cartilagineuses. Le taux d'oxygène varie de 1 % d'O<sub>2</sub> au centre de la tumeur à 6 % à sa périphérie. Or, l'hypoxie peut induire directement une résistance par privation de molécules d'O<sub>2</sub>, car la chimiothérapie et la radiothérapie nécessitent de l'oxygène intra-tumoral afin d'être pleinement efficaces (Graham and Unger, 2018).

Les voies de signalisation induites spécifiquement par l'hypoxie et les mécanismes de

résistance inhérents à un environnement hypoxique seront développées dans le chapitre VI.

## **2. Activité télomérase**

Les télomères, localisés aux extrémités des chromosomes, sont des régions au sein desquelles se trouvent des séquences d'ADN répétées non codantes, leur fonction est de protéger les régions codantes de l'ADN vis-à-vis de la dégradation. Les régions codantes sont localisées entre les télomères et le centromère des chromosomes. Certaines cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'exprimer une enzyme : la télomérase, dont le rôle est de maintenir la longueur des extrémités télomériques constante par addition de ces séquences d'ADN répétées, en sachant que lors de chaque division cellulaire/cycle de réplication de l'ADN, les extrémités télomériques sont raccourcies. La télomérase peut ainsi conférer à une cellule une « immortalité cellulaire ». Au sein des CS, l'activité de cette enzyme et son expression sont corrélées au grade tumoral. Une étude a démontré que les lignées de CS possédant une faible activité télomérase sont plus sensibles à l'apoptose induite par le CDDP (Parsch et al., 2008).

## **3. Expression de la P-glycoprotéine**

La P-glycoprotéine est codée par le gène *MDR-1* (« Multi Drug Resistance-1 »). C'est une pompe transmembranaire ATP dépendante. Son expression et son rôle dans l'efflux des drogues au sein des CS sont bien établis (Kim et al., 2009a). L'expression de *MDR-1* permet aux CS de résister aux effets cytotoxiques d'agents chimiothérapeutiques tels que le cyclophosphamide, le CDDP, la doxorubicine et la vincristine. En utilisant des siRNA (« small interfering RNA »), Kim et al. ont montré que la diminution de l'expression de *MDR-1* augmentait la chimiosensibilité jusqu'à 4,1 fois (Kim et al., 2009a). De plus, l'inhibition de la glycoprotéine-P combinée avec l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et XIAP a permis une augmentation de la chimiosensibilité jusqu'à 5,5 fois (Kim et al., 2009a).

## **4. Rôle des facteurs pro- et anti-apoptotiques**

L'ensemble des cellules de notre organisme expriment des protéines que nous définissons comme pro- ou anti-apoptotiques. Ces protéines permettent de réguler différentes voies de signalisations comme la survie, la prolifération ou la mort cellulaire. Ces différents mécanismes sont contrôlés par une balance entre les signaux pro- ou anti-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques, telles que Bax (« Bcl-2-associated X »), Bak (« Bcl-2 homologous antagonist/killer ») et Bim (« Bcl-2-like protein 11 »), favorisent la mort cellulaire. Tandis que

les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-xL « B-cell lymphoma-extra large »), Bcl-2 et XIAP, favorisent la prolifération, la survie, la migration ou encore la différenciation cellulaire.

Dans les tumeurs de CS, le niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et XIAP est élevé. Ce taux d'expression est supérieur à celui des chondrocytes non tumoraux (Kim et al., 2007). Les irradiations induisent une augmentation de l'expression de ces protéines de manière dépendante de la dose. Cela suggère que la signalisation de la voie anti-apoptotique joue un rôle essentiel dans la radiorésistance. Ainsi, il a été montré que l'utilisation de siRNAs dirigés contre Bcl-2, Bcl-xL, XIAP ou la survivine augmente la radiosensibilité des CS ainsi que la sensibilité vis-à-vis de la chimiothérapie (Kim et al., 2007; Lechler et al., 2011).

D'autres études plus récentes ont confirmé le rôle clef de certaines protéines anti-apoptotiques dans les CS. Par exemple, la restauration de l'expression des membres de la famille Bcl-2, à l'aide d'un BH3 mimétique, l'ABT-737, dans différentes lignées de CS a permis de restaurer la sensibilité des cellules à la doxorubicine et au cisplatine et permet également d'inhiber la croissance tumorale (de Jong et al., 2016; Morii et al., 2014; van Oosterwijk et al., 2012). Dernièrement, la même équipe a été plus loin en confirmant que le niveau d'expression de Bcl-2 et Bcl-xL est corrélé au grade de la tumeur et que Bcl-xL est le membre le plus important des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour la croissance et la survie des CS (de Jong et al., 2018)

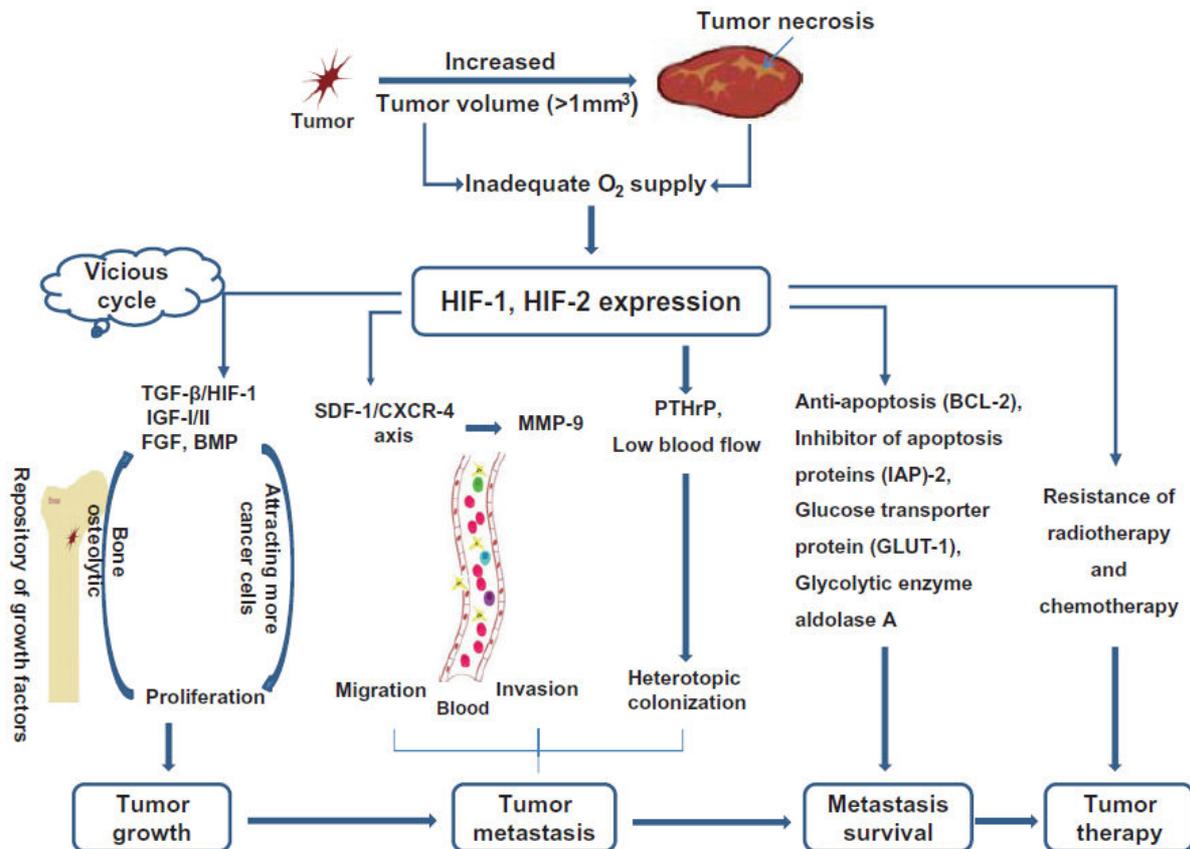
## **5. Perte de l'expression de la protéine p16**

La perte de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur joue un rôle majeur dans la progression tumorale et dans la radiorésistance. Parmi ces gènes, le gène *CDKN2* (« Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2 »), codant la protéine p16, voit son expression diminuée dans les CS de haut grade, alors qu'elle n'est pas modifiée dans les tumeurs cartilagineuses bénignes. Cela signifie que p16 jouerait un rôle dans l'évolution de la tumeur vers un phénotype agressif et malin (Onishi et al., 2011). Une étude a montré que le rétablissement du niveau d'expression de p16 par transduction virale, augmente la sensibilité des cellules de CS à la radiothérapie par induction d'une catastrophe mitotique (Moussavi-Harami et al., 2006).

## VI. L'hypoxie et les CS

### 1. Hypoxie et cancer

L'hypoxie correspond à une diminution des taux d'oxygène disponibles pour la cellule. L'hypoxie peut être physiologique (processus de chondrogenèse, physioxie du cartilage, différenciation des lymphocytes T...), mais également pathologique (ischémie cérébrale, cancers...). Le maintien du taux d'oxygène dans les cellules est essentiel pour leur fonctionnement et leur survie. Un manque d'oxygène induit un stress environnemental entraînant des réponses cellulaires comme la mort cellulaire par apoptose ou nécrose des régions exposées à l'hypoxie (Karakashev and Reginato, 2015). Pour les cellules tumorales, l'effet de l'hypoxie entraîne des réponses différentes. Ces cellules sont capables de s'adapter à cet environnement : l'hypoxie permet l'activation de mécanismes cellulaires comme la glycolyse, l'autophagie, la prolifération, l'invasion, la progression tumorale ou encore la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Karakashev and Reginato, 2015; Paolicchi et al., 2016; Shannon et al., 2003) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Rôle de l'hypoxie sur le développement des tumeurs (d'après Zeng et al., 2011).**

L'implication de l'hypoxie dans le développement des tumeurs osseuses est également importante (Zeng et al., 2011). Dans le CS, les voies de signalisation de l'hypoxie semblent corrélées avec le grade tumoral et le devenir de ces tumeurs (Boeuf et al., 2010; Kubo et al., 2008).

## 2. Les facteurs HIFs

### a. Structure

Les facteurs HIFs (« Hypoxia-Inducible Factor ») sont les médiateurs clés de la réponse cellulaire à l'hypoxie. Ils appartiennent à la superfamille des protéines bHLH/PAS (« basic Helix-Loop-Helix/ Per-ARNT-Sim ») (Wu and Rastinejad, 2017).

Le facteur HIF est un hétérodimère comprenant une des 3 sous-unités HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$  et une unité constitutive HIF-1 $\beta$  exclusivement nucléaire. Ils forment trois isoformes de ce facteur : HIF-1, HIF-2 et HIF-3. Les sous-unités sont codées par des gènes différents mais de structures proches (Wigerup et al., 2016) (**Figure 12**).

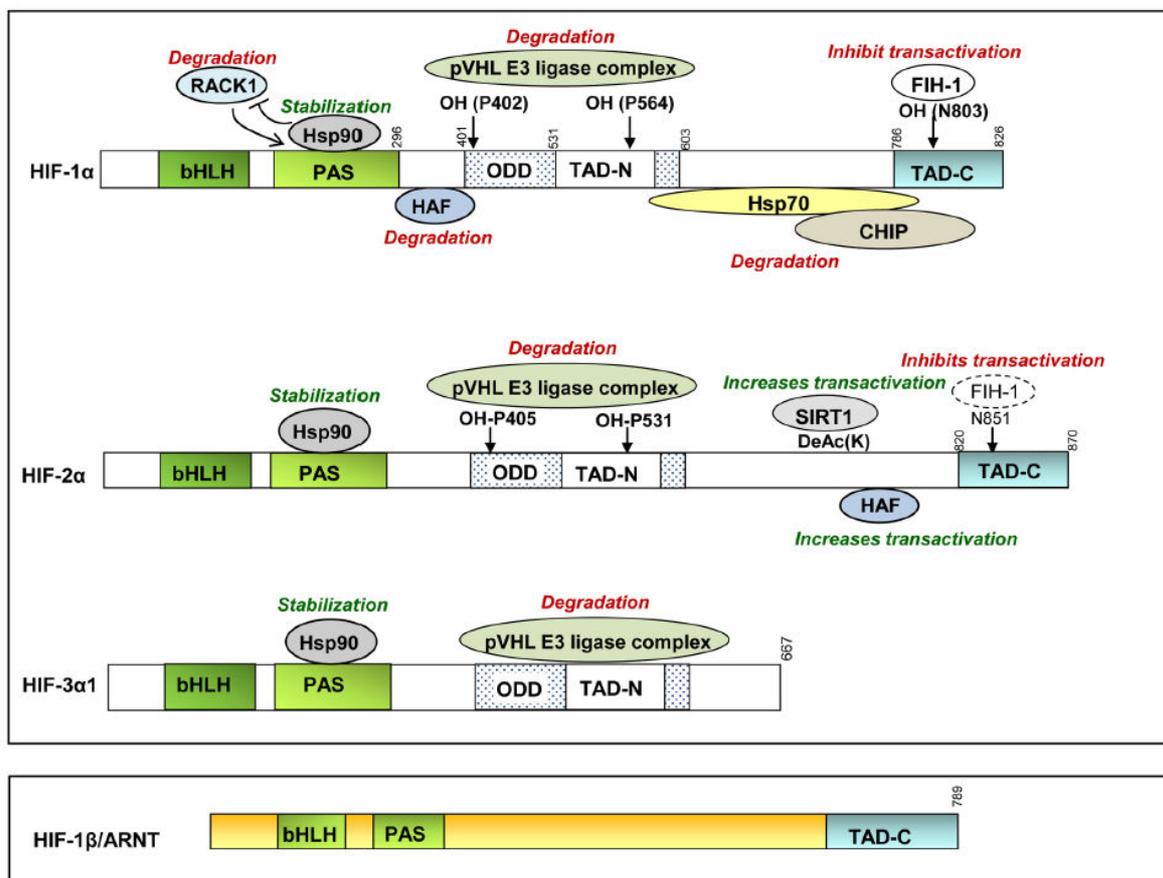


Figure 12 : Structure des HIF-1/2/3 $\alpha$  et de leurs partenaires transcriptionnels (d'après Koh and Powis 2012).

Plusieurs domaines composent les facteurs HIFs :

- le motif bHLH est impliqué dans la dimérisation des deux sous-unités ainsi que dans la liaison directe d'HIF à l'ADN.
- Le domaine PAS forme un second domaine de dimérisation entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .
- Le domaine ODD (« Oxygen-dependent Degradation Domain ») est le domaine de dégradation de la sous-unité  $\alpha$  dépendante de l'oxygène. Ce domaine permet une régulation post-transcriptionnelle d'HIF-1 $\alpha$  et -2 $\alpha$  en fonction de la teneur en O<sub>2</sub>. Il contient des résidus proline (pour HIF-1 $\alpha$  et -2 $\alpha$ ) reconnus et hydroxylés par les prolyl-hydroxylases en normoxie.
- Les domaines N-terminal (N-TAD) et C-terminal (C-TAD) sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle.

Le facteur HIF-3 $\alpha$ , bien que très similaire à HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , ne possède pas de domaine de transactivation C-terminal. Il se présente sous forme de nombreux variants d'épissage dont le plus étudié est l'inhibiteur du domaine protéique PAS (IPAS) qui détient un rôle d'inhibiteur d'HIF-1 $\alpha$  (Koh and Powis, 2012; Wigerup et al., 2016).

### *b. Régulation*

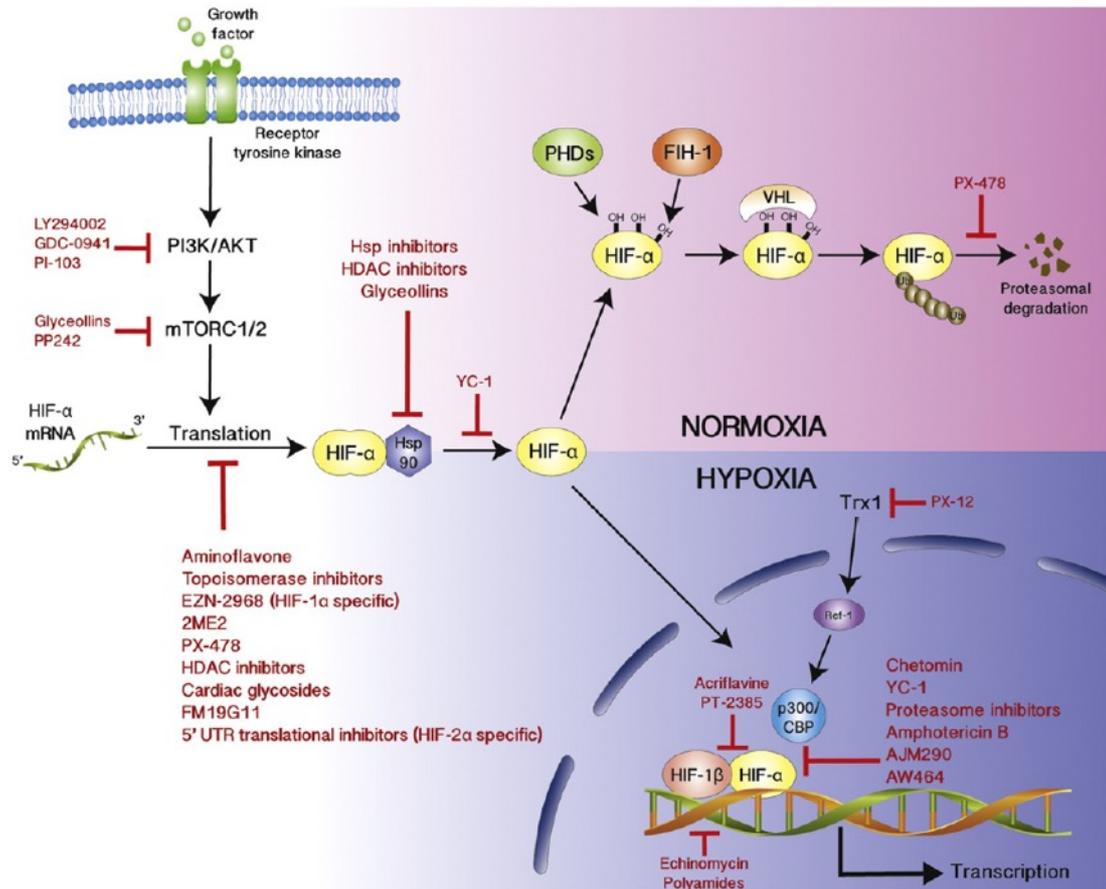
Les facteurs HIFs sont régulés par la teneur en oxygène intracellulaire selon plusieurs mécanismes :

#### ▪ Voie de régulation canonique des HIFs

Seule la sous-unité  $\alpha$  est soumise à une régulation post-traductionnelle. La sous-unité HIF-1 $\beta$  est synthétisée de manière constitutive. En normoxie, des enzymes ayant une activité dépendante de l'oxygène, appelées prolyl-hydroxylases (PHD), induisent l'hydroxylation des résidus proline des sous-unités  $\alpha$  au niveau du domaine ODD : PHD1, PHD2 (active préférentiellement pour HIF-1 $\alpha$ ) et PHD3 (active préférentiellement pour HIF-2 $\alpha$ ). Ces hydroxylations permettent la liaison des sous-unités  $\alpha$  à une protéine appelée « Von Hippel-Lindau tumor suppressor » (pVHL) appartenant au complexe ubiquitine ligase 3. Il s'ensuit donc l'ubiquitination de la sous-unité  $\alpha$ , puis *in fine* sa dégradation par le protéasome (**Figure 13**).

En condition hypoxique, la teneur en oxygène n'est pas suffisante pour activer ces PHD. Donc, la sous-unité HIF-1 $\alpha$ , par exemple, est stabilisée et s'accumule dans le cytoplasme, puis est transloquée dans le noyau. Au niveau nucléaire, HIF-1 $\alpha$  se dimérise avec HIF-1 $\beta$ , exprimé

de manière constitutive, pour former HIF-1. Cet hétérodimère peut alors se fixer sur les « Hypoxia Responsive Elements » (HRE) de différents gènes cibles (Wigerup et al., 2016).



**Figure 13 : Régulation d'HIF- $\alpha$  en condition normoxique et hypoxique.** Dans les conditions normoxiques, HIF- $\alpha$  subit une hydroxylation, processus modulé par les PHD et les enzymes inhibitrices du facteur HIF-1. L'hydroxylation par les PHD favorise la déstabilisation de la protéine HIF- $\alpha$ , et inhibe l'activité transcriptionnelle en empêchant l'interaction avec le co-facteur transcriptionnel p300/CBP. La dégradation d'HIF- $\alpha$  est sous le contrôle d'un processus dépendant de l'ubiquitine exécuté par le complexe VHL. En hypoxie, les PHD sont inactivées, permettant une stabilisation d'HIF- $\alpha$ , suivie d'une translocation dans le noyau et une dimérisation avec HIF- $\beta$ , formant le facteur de transcription HIF. Avec le co-activateur p300/CBP, les HIF induisent la transcription d'une pléthore de gènes cibles lors de l'hypoxie (d'après Wigerup et al., 2016).

#### ▪ Voies de régulation alternatives des HIF

Des voies alternatives de régulation d'HIF ont été mises en évidence (Koh and Powis, 2012; Wigerup et al., 2016) (**Figure 13**).

- FIH-1 (« Factor Inhibiting HIF-1 ») est une enzyme dépendante de l'oxygène dont l'efficacité est plus faible que les PHD. Elle hydroxyle les résidus asparagines 803 du domaine C-TAD du facteur HIF-1 $\alpha$  et du domaine N851 C-TAD du facteur HIF-2 $\alpha$ . Ces hydroxylations gênent

l'interaction entre le domaine C-TAD d'HIF et le co-activateur transcriptionnel p300/CBP (« CREB Binding Protein »). Ces hydroxylations sont inhibées en hypoxie conduisant donc à des interactions entre p300/CBP et les facteurs HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ .

- HAF (« Hypoxia-Associated Factor ») est une ubiquitine ligase E3 dégradant HIF-1 $\alpha$ . Elle induit une transactivation du facteur HIF-2 $\alpha$  lors d'une hypoxie prolongée.

- Le récepteur RACK (« Receptor Activated Protein Kinase C »), dépendant de l'oxygène, contribue à la dégradation d'HIF-1 $\alpha$  lorsque la protéine Hsp90 (« Heat-Shock Protein 90 ») est inhibée.

- Le complexe Hsp70/CHIP (« Heat-Shock Protein 70/ Carboxyl terminus of HSP70-Interacting protein ») permet de dégrader le facteur HIF-1 $\alpha$  en hypoxie prolongée ou en présence de fortes concentrations de glucose. Ce complexe n'a aucun effet sur HIF-2 $\alpha$ .

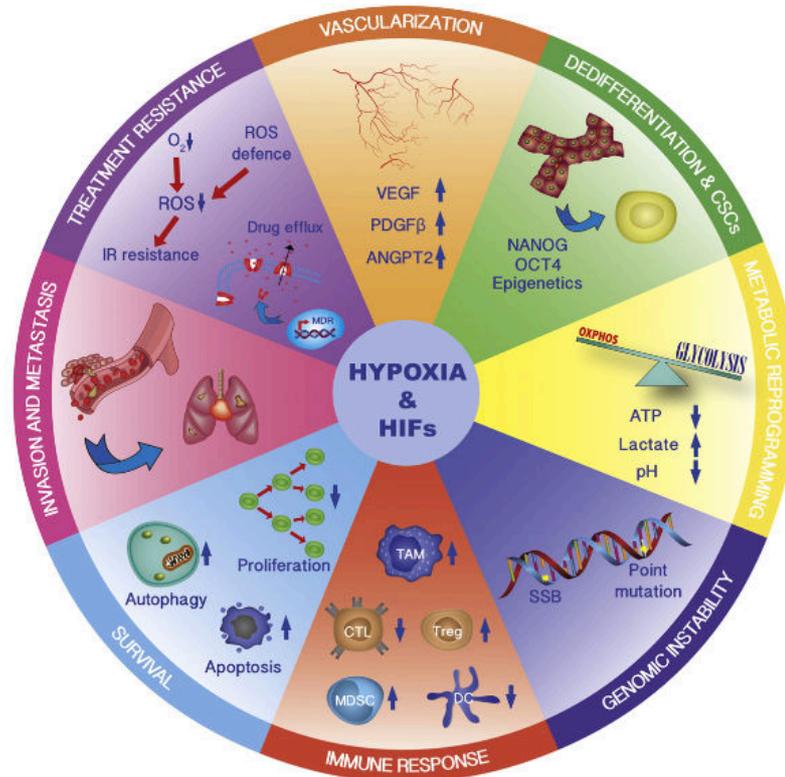
Les cellules tumorales peuvent aussi moduler l'expression des HIFs *via* des mécanismes indépendants de l'oxygène impliquant l'activation d'oncogènes (Ras, Raf (« Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase », PI3K, Akt, c-Myc) ou la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (p53, PTEN (« Phosphatase and Tensin homolog ») ou VHL (« Von Hippel-Lindau tumor suppressor »)) (Chiche et al., 2010; Karakashev and Reginato, 2015; Wigerup et al., 2016). HIF-1 $\alpha$  est exprimé dans presque tous les types cellulaires évoluant en hypoxie, ce qui n'est pas le cas pour HIF-2 $\alpha$  (Keith et al., 2011).

Dans le CS, le rôle d'HIF-1 n'est pas encore totalement élucidé. HIF-1 $\alpha$  est exprimé de manière constitutive dans les CS de haut grade (Boeuf et al., 2010). HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont impliqués dans la prolifération cellulaire (Kubo et al., 2008), HIF-1 $\alpha$  permet également d'augmenter la synthèse d'ARNm codant le VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor ») (Lin et al., 2004) et il augmente la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Chen et al., 2011a).

### 3. Rôle des facteurs HIFs dans la croissance tumorale

Les facteurs HIFs contrôlent la transcription de gènes inductibles par l'hypoxie et interviennent dans l'angiogenèse, l'invasion tumorale, la régulation du pH, le métabolisme glucidique et le contrôle de la prolifération cellulaire. Des changements biochimiques (pH, taux de glucose, concentration en oxygène) s'opèrent dans l'environnement tumoral lors de la croissance des tumeurs (**Figure 14**). Parmi ces modifications microenvironnementales,

l'adaptation à l'hypoxie va contribuer à la progression tumorale et va permettre également d'accroître la résistance des cellules à la chimiothérapie ou à la radiothérapie (Muz et al., 2015).



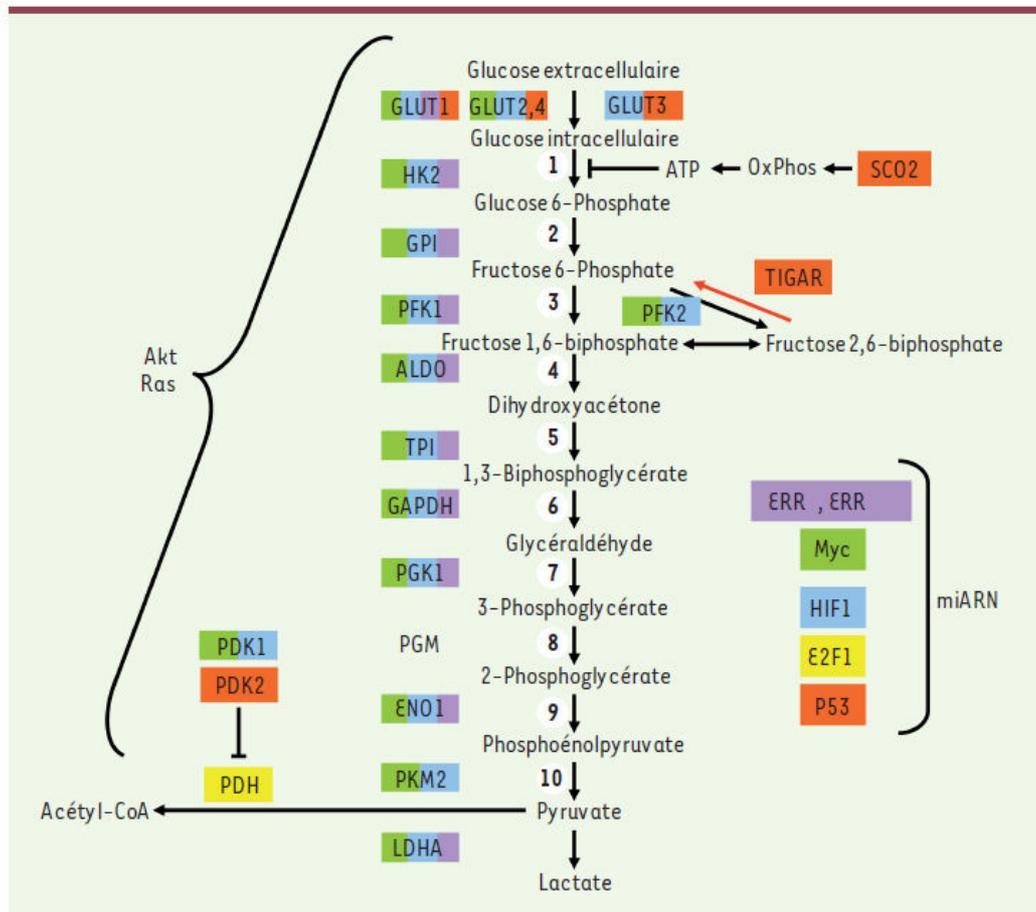
**Figure 14 : L'hypoxie et les HIFs régulent de nombreux mécanismes impliqués dans la tumorigénèse (d'après Wigerup et al., 2016).**

*a. Modification du métabolisme*

La glycolyse anaérobie est favorisée dans un environnement tumoral où l'apport en oxygène est limité. Le glucose est catabolisé en lactate pour générer de l'énergie sous forme d'ATP (Chiche et al., 2010). On parle de l'effet Warburg du nom de celui qui l'a mis en évidence dans les années 1930 (Razungles et al., 2013). Beaucoup de facteurs vont contrôler la cascade de la glycolyse anaérobie (**Figure 15**). Le facteur HIF-1 $\alpha$ , en particulier, stimule l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse plutôt que dans la phosphorylation oxydative, tels que des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3), des enzymes glycolytiques (Héxokinase-2 ou HK-2), la pyruvate déshydrogénase kinase-1 (PDK-1) qui inactive la pyruvate déshydrogénase responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, et la lactate déshydrogénase A (LDH-A) qui convertit le pyruvate en lactate (Semenza, 2008).

Lors de la conversion du pyruvate en lactate, un proton H<sup>+</sup> est libéré. Des pompes ATPases, des échangeurs sodium/proton NHE1, le co-transporteur MCT-4 et l'anhydrase

carbonique IX permettent d'exclure ces protons H<sup>+</sup> hors de la cellule. Cela entraîne une acidification du pH extracellulaire qui favorise la survie des cellules tumorales, l'invasion cellulaire et la formation de métastases *via* l'activation de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire (Chiche et al., 2010).



**Figure 15 : Les multiples points de contrôle de l'effet Warburg.** De nombreux effecteurs vont contrôler la cascade de la glycolyse. Les oncogènes Akt, Ras et Myc vont favoriser cette voie métabolique (d'après Razungles *et al.*, 2013).

Dans les CS, peu d'études se sont intéressées à la glycolyse anaérobie. Néanmoins, l'une d'entre elles a mis en évidence une suractivation de la LDH-A, l'enzyme qui convertit le pyruvate en lactate (**Figure 16**), dans les CS. Cette étude montre également une corrélation entre la résistance des CS à la doxorubicine et l'activation de la LDH-A. Ainsi, une inhibition de la LDH-A permet d'améliorer la sensibilité des cellules de CS à la doxorubicine (Hua et al., 2014)

### *b. La transition épithélio-mésenchymateuse*

L'hypoxie favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui modifie le comportement migratoire et invasif des cellules tumorales. La TEM est un processus physiologique actif durant l'embryogenèse, la régénération tissulaire, mais également la carcinogenèse (Mittal, 2018). La TEM induite par l'hypoxie se caractérise par une perte d'expression de protéines d'adhésion comme la cadhérine-E et la  $\beta$ -caténine. Par ailleurs, l'hypoxie va induire une surexpression de protéines mésenchymateuses telles que SNAIL, la vimentine, la N-Cadhérine et TWIST (Mittal, 2018; Paolicchi et al., 2016; Wigerup et al., 2016). L'ensemble de ces changements aboutit à une modification de la morphologie des cellules tumorales, une augmentation de la prolifération des cellules et de leur capacité migratoire vers les tissus environnants.

### *c. L'invasion tumorale*

Les facteurs HIF-1 et HIF-2 régulent l'expression des gènes impliqués dans la dégradation de la MEC pour favoriser la migration des cellules tumorales et l'apparition de métastases. Ces gènes codent pour des métalloprotéases matricielles (MMP) et l'uPA (« urokinase Plasminogen Activator »). Afin d'envahir les tissus adjacents, les cellules tumorales doivent franchir la membrane basale et dégrader la MEC. Pour cela, les cellules ont besoin de la participation de plusieurs enzymes comme les MMP2 et MMP9 ou l'uPA (Sullivan and Graham, 2007). Ce dernier est activé lorsqu'il est lié à son récepteur uPAR. L'uPA actif convertit le plasminogène en plasmine, une peptidase qui est directement impliquée dans la dégradation de diverses protéines de la MEC et dans l'activation de facteurs de croissance et de MMP. Par ailleurs, uPAR peut interagir et réguler la fonction d'autres protéines de surface cellulaire telles que les intégrines, les récepteurs de facteurs de croissance et les récepteurs couplés aux protéines G pour favoriser la migration cellulaire. Notamment, uPAR peut agir comme un récepteur pour la vitronectine et promouvoir l'adhésion des cellules à la MEC, tandis que l'interaction entre uPAR et certaines intégrines conduit à la suppression de leur adhésion aux protéines de la MEC.

Les MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 et MMP-13 sont fréquemment exprimées dans les tissus de CS (Boehme et al., 2018; Kawashima et al., 1997). Une forte expression de MMP-1 est associée à un mauvais pronostic chez les patients (Kawashima et al., 1997). La MMP-2 est fortement exprimée pour les CS centraux de haut grade (Boeuf et al.,

2010; Hsu et al., 2013). L'expression de MMP-3, MMP-7 et MMP-13 augmente également avec le grade de la tumeur (Sugita et al., 2004).

Les métastases peuvent se produire lorsque les cellules cancéreuses sont capables de se fixer et de proliférer dans un microenvironnement étranger. Dans le cas du CS, les poumons sont le principal site de métastase, bien que rare (Boehme et al., 2018).

#### *d. L'angiogenèse*

L'angiogenèse, correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. C'est un processus primordial pour la croissance tumorale ainsi que pour le développement des métastases. L'hypoxie induit un déséquilibre dans la production de facteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur de la formation rapide et désorganisée de nouveaux vaisseaux sanguins.

Les facteurs HIF-1 et HIF-2 participent à la néo-vascularisation tumorale. Ils induisent ainsi la prolifération de cellules endothéliales en régulant l'expression du VEGF, de son récepteur VEGF-R1 et de l'angiopoïétine (Simon et al., 2008; Wigerup et al., 2016). Alors que l'angiopoïétine-1 contribue à la maturation et à la stabilisation des nouveaux vaisseaux sanguins, l'angiopoïétine-2 surexprimée en hypoxie participe au remodelage des vaisseaux en les destabilisant.

Sans néo-vascularisation, la taille d'une tumeur est intrinsèquement limitée à 1-5 mm en raison de la disponibilité limitée de l'oxygène et des nutriments (McGough et al., 2002a). Les CS restent peu vascularisés par rapport à d'autres tumeurs (Cintra et al., 2014; Kalinski et al., 2009). Les CS de grade I ont un faible taux de vascularisation et cette vascularisation augmente avec le grade, ce qui favorise la possibilité d'invasion vers d'autres tissus (Cintra et al., 2014).

Le VEGF et le FGF2 sont les deux principaux facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse des CS et leurs effets sont gouvernés par HIF-1 $\alpha$  (Lin et al., 2004; McGough et al., 2002b). Récemment, une équipe a comparé les enchondromes et les CS en effectuant un marquage immunohistochimique d'HIF-1 $\alpha$  et du VEGF. Les enchondromes présentent un marquage double négatif HIF-1 $\alpha$  et VEGF, alors que les CS de haut grade présentent une coloration double positive VEGF ou HIF-1 $\alpha$  (Kouvaras et al., 2019).

## e. L'autophagie

### ▪ Rôle de l'autophagie

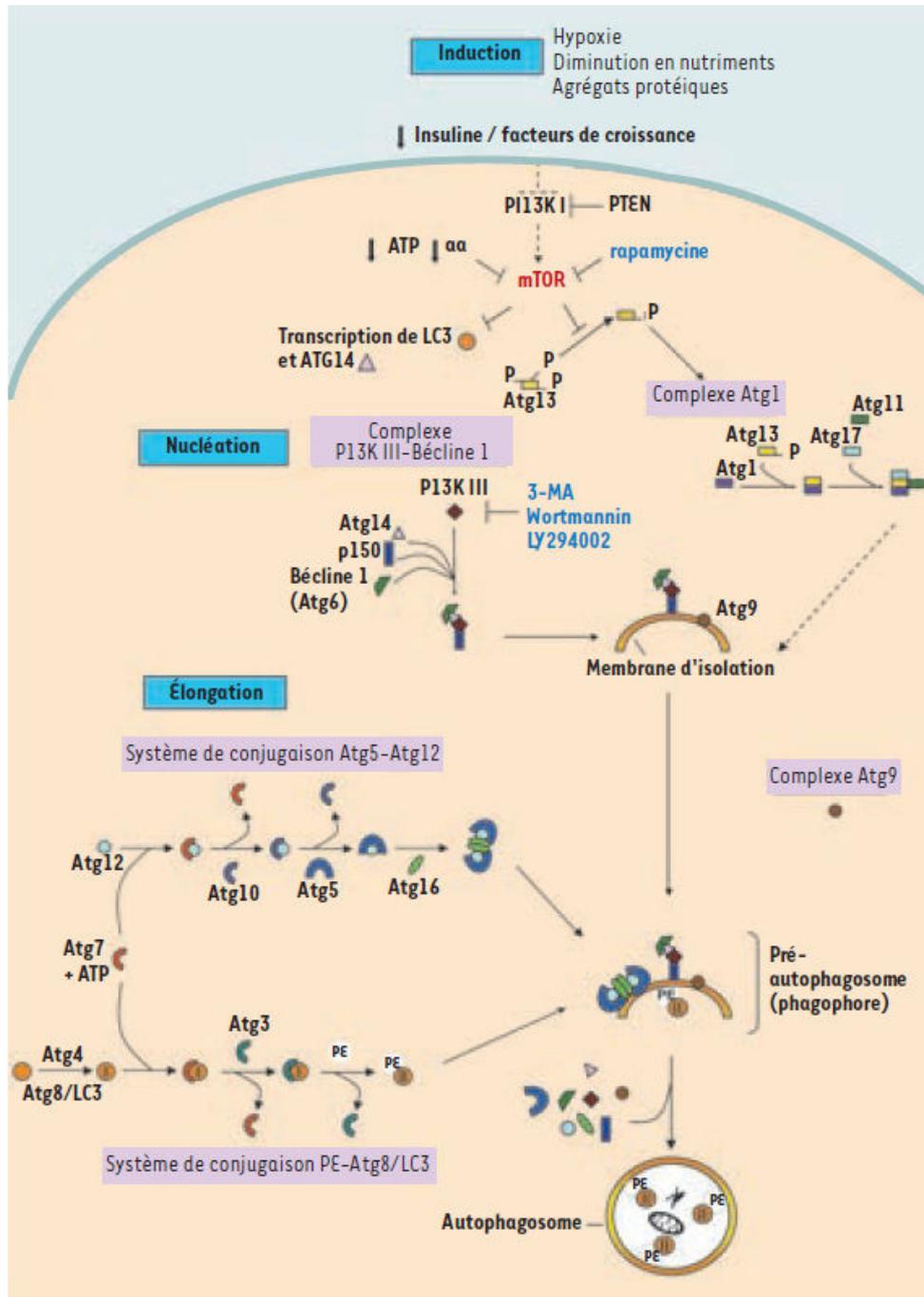
L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion permettant la dégradation de composants intracellulaires (protéines et organites) par le lysosome. L'autophagie est importante dans des fonctions cellulaires physiologiques clés comme la dégradation de protéines à longue durée de vie, le renouvellement des organites, l'adaptation face à une carence en nutriments, l'allongement de la durée de vie, le développement et la différenciation cellulaire et l'anti-vieillessement. Cependant l'autophagie joue également des rôles pathologiques. Trop ou pas assez d'autophagie sont des événements liés à l'infection par des agents pathogènes (fourniture de nutriments), à la neurodégénérescence (en permettant l'accumulation de protéines agrégées), ou encore à des troubles musculaires causés par l'accumulation d'autophagosomes altérant les fonctions cellulaires. Dans le cancer, l'autophagie agit bien souvent comme un mécanisme protecteur contre certains traitements anticancéreux et empêche la mort cellulaire dans un microenvironnement hostile (Mazure and Pouyssegur, 2010). Cependant, dans certaines conditions, l'autophagie peut induire la mort cellulaire (Yu et al., 2004a).

### ▪ Mécanismes moléculaires de la (macro-)autophagie

Il existe 3 différents types d'autophagie : la micro-autophagie, l'autophagie modifiée par des protéines chaperonnes et la forme principale, la macro-autophagie plus communément appelée autophagie.

- Dans la micro-autophagie, une partie du cytoplasme est directement séquestrée par le lysosome.
- L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes concerne spécifiquement les protéines portant une séquence précise de 5 acides aminés (KFERQ) qui sont prises en charge par des protéines chaperonnes, qui les adressent vers les lysosomes.
- Dans la macro-autophagie, une portion entière du cytoplasme à digérer est séquestrée dans une vésicule nommée autophagosome, qui va ensuite fusionner avec le lysosome pour former l'auto-lysosome, dans lequel les enzymes lysosomales digèrent le contenu de l'autophagosome.

L'autophagie est un processus complexe comportant plusieurs étapes : induction, nucléation, puis élongation des vésicules et fusion (Puyal et al., 2009) (**Figure 16**).



**Figure 16 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie (d'après Puyal et al., 2009).**

La protéine kinase mTor, inhibiteur de l'autophagie, est l'acteur central dans le contrôle de l'induction de l'autophagie. La diminution en nutriments (manque en acides aminés et en énergie [ATP]) et par conséquent la diminution en facteurs de croissance ou en insuline, sont des inducteurs importants de l'autophagie. En effet, dans de telles conditions, mTor est inhibée suite notamment à l'activité de la phosphatase PTEN qui inhibe la phosphoinositol 3 kinase de classe I. Ainsi Atg13 est partiellement déphosphorylée (mTor contrôlant son état de

phosphorylation), ce qui permet sa liaison avec Atg1. Ce complexe se lie ensuite à Atg11 et Atg17 induisant ainsi une augmentation de l'autophagie. En parallèle, l'inactivation de mTor permet également l'activation de la PP2A (Protein Phosphatase 2A) et la translocation de Gln3 (Glutaminase) dans le noyau où il active la transcription de gènes autophagiques tels que LC3 et Atg14. Suite à cette phase d'induction, les étapes de nucléation vésiculaire (dans laquelle le complexe Béclin 1/PI3KIII joue un rôle indispensable) et d'élongation (assurée par l'action concomitante des deux systèmes de conjugaisons Atg12-Atg5 et PE-Atg8/LC3) sont activées. Tout au long du processus d'élongation, le complexe Atg9 (Atg9, Atg2 et Atg18) joue un rôle essentiel dans le recrutement de ces différentes protéines. Ainsi le pré-autophagosome (ou phagophore) s'allonge, entoure les constituants à dégrader, puis se referme pour former un autophagosome doté le plus souvent d'une double membrane.

La rapamycine est un activateur de l'autophagie (elle inhibe mTor) (Puyal et al., 2009). Bcl-2 et Bcl-xL sont des inhibiteurs essentiels de la voie intrinsèque de l'apoptose en séquestrant les molécules pro-apoptotiques (comme Bax et Bak). Bcl-2 et Bcl-xL peuvent aussi interagir avec le domaine BH3 de Béclin et ainsi inhiber l'autophagie (Maiuri et al., 2007; Pattingre et al., 2005).

- **Hypoxie et autophagie**

L'induction de l'autophagie par l'hypoxie dépendante de HIF a été démontrée par Bellot et ses collaborateurs (Bellot et al., 2009). Les cellules HIF-1 $\alpha$  « knock-out » possèdent des niveaux d'expression des marqueurs d'autophagie Beclin-1 et LC3B-II diminués (Deng et al., 2014). HIF active l'autophagie par l'intermédiaire de BNIP3 (« Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 »). BNIP3 possède un domaine BH3. Elle a pour fonction de libérer Beclin-1 liée à Bcl-2 et Bcl-xL en entrant en compétition avec ces protéines anti-apoptotiques (Tracy et al., 2007).

Plusieurs études ont montré que l'induction de BNIP3 par l'hypoxie était suffisante pour induire la mort cellulaire par autophagie (Azad et al., 2008), alors que d'autres études montrent que sa surexpression n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire par autophagie (Bellot et al., 2009; Tracy et al., 2007; Zhang et al., 2008). Zhang et al. (2008) suggèrent en fait que l'autophagie mitochondriale est induite par l'hypoxie et que cela requiert BNIP3, Beclin-1 et Atg5. Dans les cellules soumises à une hypoxie prolongée, l'autophagie mitochondriale serait une réponse métabolique adaptative et nécessaire pour prévenir l'augmentation des ROS et la mort cellulaire (Rouschop et al., 2009; Zhang et al., 2008).

#### ▪ Autophagie et CS

L'autophagie a été peu étudiée dans les CS. Une étude associe un niveau élevé d'HIF-2 $\alpha$  et une faible expression de Beclin-1. L'expression de Beclin associée à l'autophagie serait donc favorable à la survie des patients (Chen et al., 2011b). Dans le CS, l'autophagie pourrait soit être directement responsable de la mort cellulaire (Lohberger et al., 2016), soit sensibiliser les cellules à la mort par apoptose (Jiao et al., 2014). Au contraire, d'autres travaux ont mis en évidence que l'autophagie protège des lignées cellulaires de CS des effets des drogues (Reumann et al., 2016). L'autophagie pourrait donc soit inhiber ou favoriser la croissance tumorale, en fonction du contexte cellulaire et du stimulus.

### 4. Rôle de l'hypoxie dans la résistance aux traitements conventionnels

L'efficacité de la radiothérapie repose sur la présence de l'oxygène afin de créer des radicaux libres et des cassures à l'ADN (Kim et al., 2015). L'hypoxie limite la formation des ROS responsables des cassures simple et double brins de l'ADN (Onishi et al., 2011). Les dommages à l'ADN sont donc plus limités en hypoxie.

Concernant la chimiothérapie, la résistance induite par l'hypoxie peut s'expliquer par le fait que l'hypoxie permet une augmentation de l'activité des enzymes de réparation de l'ADN, ainsi que la création d'un gradient de pH qui inhibe l'accumulation intracellulaire des drogues (Shannon et al., 2003). L'hypoxie inhibe des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak ou Bid (« BH3 interacting-domain death agonist »)) et favorise l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2-Bcl-xL...) (Karakashev and Reginato, 2015; Sermeus et al., 2012). Dans le CS, l'expression de Bcl-xL est également associée à une induction par l'hypoxie (Chen et al., 2011a).

Par ailleurs, l'hypoxie ralentit l'avancement dans le cycle cellulaire, voir induit un arrêt en phase G0/G1 (Shannon et al., 2003). Du fait que certains agents chimiothérapeutiques agissent sur la phase de synthèse de l'ADN, leur efficacité s'en trouve altérée. De plus, l'hypoxie augmente l'expression d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. Ceci rend inefficace les agents chimiothérapeutiques comme les agents alkylants et les composés à base de platine (Harris, 2002). Enfin, l'hypoxie favorise l'efflux des drogues hors de la cellule notamment en induisant l'expression de la p-glycoprotéine codée par le gène *MDR-1* (Karakashev and Reginato, 2015). Dans le CS, comme nous l'avons déjà vu, l'expression de *MDR-1* permet aux CS de résister aux effets cytotoxiques d'agents chimiothérapeutiques (Kim et al., 2009a).

## B. Ostéosarcomes

### I. Définition et épidémiologie

L'ostéosarcome (OS) est le premier type de tumeur osseuse. Son incidence est de 1 à 4,7 par million d'habitants et par an dans les pays occidentaux, ce qui représente en France, 150 à 200 nouveaux cas par an (Longhi et al., 2006; Mirabello et al., 2009). Cette pathologie est plus fréquente chez les enfants et les adolescents. L'OS représente 6 à 7 % des cancers chez les moins de 18 ans. C'est le 3<sup>ème</sup> cancer des adolescents après les lymphomes et les tumeurs du système nerveux central (Hui, 2016). La forme pédiatrique de la tumeur est la plus fréquente (60 à 75 % des cas OS), affectant une majorité de garçons (Longhi et al., 2006; Mirabello et al., 2009). L'âge moyen de diagnostic est de 17 ans. Ce type de tumeur affecte aussi l'adulte (Durfee et al., 2016). De ce fait, il existe deux pics de survenue : un pic de diagnostic chez l'adulte de plus de 40 ans et un autre pic chez l'enfant.

L'OS de l'adulte est différent de celui de l'enfant. La forme pédiatrique est en général une tumeur primaire. L'OS développé par l'adulte survient généralement dans un contexte génétique particulier comme la maladie de Paget (Hansen et al., 2006) et peut apparaître secondairement à une autre tumeur.

L'OS se développe majoritairement au niveau les os longs. Il correspond à une production de matrice ostéoïde par les cellules tumorales. Aujourd'hui le traitement de l'OS non métastasé comprend une résection de la tumeur associée à une polychimiothérapie pré- et post-opératoire. L'optimisation des traitements chimiothérapeutiques ainsi que les avancées techniques de la chirurgie, ont amélioré la qualité de vie des patients, mais également le pronostic lié à la pathologie. Le taux de survie global à 5 ans des patients atteints d'OS non métastatique atteint 60 à 70 %. Cependant, en cas de rechute locale ou/et métastatique, le taux de survie chute à 20-30 %. Pour ces patients, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par ailleurs, l'OS reste une tumeur agressive dont le seul traitement efficace est la chimiothérapie, en dehors de l'intervention chirurgicale. Or, différentes observations cliniques ont mis en évidence une acquisition de résistance aux traitements, ce qui rend parfois difficile la prise en charge de cette pathologie.

## II. Classification

### 1. Critères de classification

L'OS est une tumeur complexe tant au niveau histologique que moléculaire. Plusieurs critères entrent en jeu pour sa classification. La localisation, les caractères histologiques et le grade sont des paramètres pris en compte pour définir le sous-type et l'agressivité de l'OS. Cette classification permet ensuite d'adapter le traitement.

#### ▪ Localisation

Au niveau de la localisation, on distingue les OS centraux ou intra-médullaires et les OS de surface. Les premiers sont les plus fréquents (75 % des cas) (Jo and Doyle, 2016). Ils sont différents des OS de surface en termes de survie, évolution et potentiel métastatique. Ces deux catégories sont-elles mêmes subdivisées en différents sous-types (**Tableau II**).

L'OS adulte ou pédiatrique survient majoritairement au niveau de la métaphyse des os longs (Misaghi et al., 2018).

- Fémur distal (40 à 70 % des cas),
- Le tibia proximal (16 à 25 % des cas)
- L'humérus (5 à 15 % des cas)

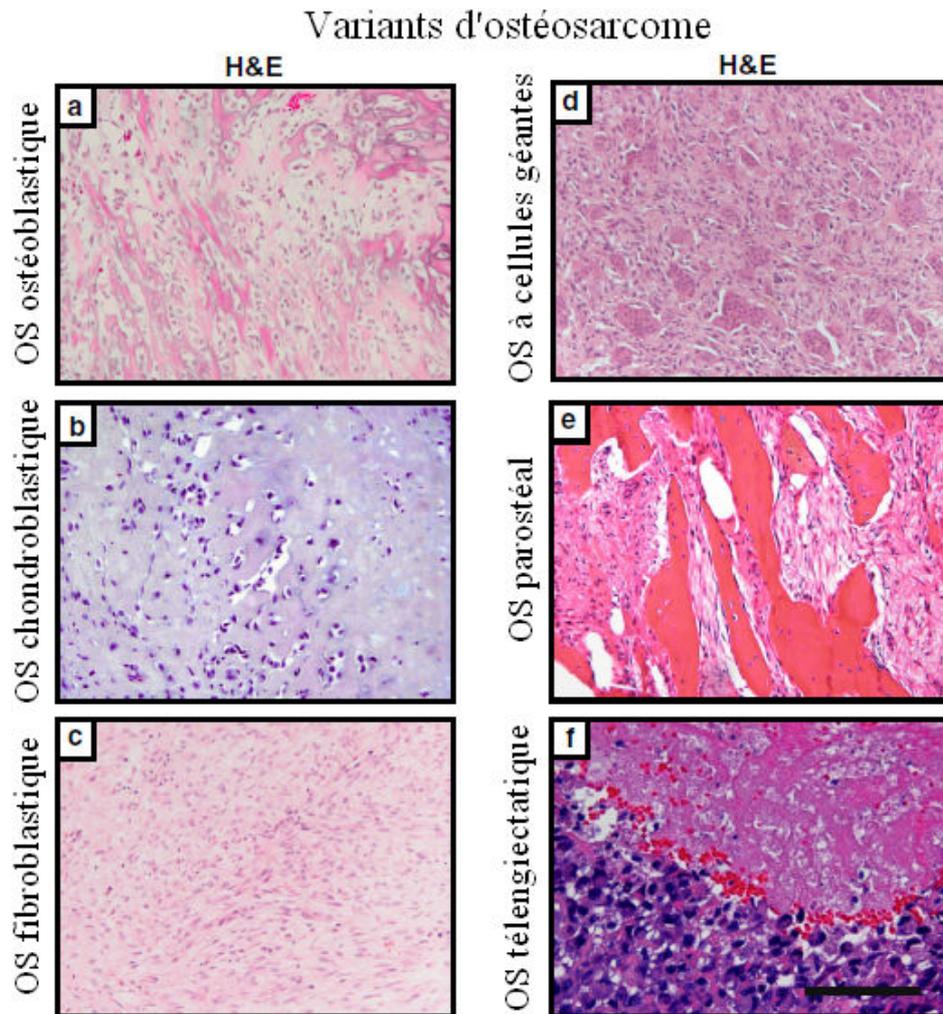
D'autres localisations comme la mandibule ou l'omoplate sont parfois retrouvées.

	Ostéosarcomes	
	Central	De surface
Haut grade	Conventionnel (80%): - Ostéoblastique (60%) - Fibroblastique (10%) - Chondroblastique (10%) Télangiectasique (4%) A petites cellules (1-2%)	De haut grade (<1%)
Bas grade	De bas grade (1-2%)	Périosté (2-3%) Parostéal (4-6%)

**Tableau II : Classifications cliniques et fréquences des ostéosarcomes (adapté d'après Misaghi et al., 2018).**

- **Classification histologique**

Il existe différents sous-types d'OS en fonction de leur capacité à produire la matrice osseuse (**Figure 17**) (Chang et al., 2015 ; Misaghi et al., 2018).



**Figure 17 : Diversité histopathologique des variants d'ostéosarcomes.** a : OS ostéoblastique avec une histologie de l'os de type filigrane. b : OS chondroblastique avec des zones chondroïdes prédominantes. c : OS fibroblastique présentant de grandes zones de différenciation fibroblastique avec une matrice ostéoïde peu visible. d : OS à cellules géantes présentant une histologie particulière avec de nombreuses cellules géantes. e : OS parostéal présentant une différenciation typique à double fibre. f : OS télangiectatique avec une zone hémorragique et de fibrine ; il présente des cellules tumorales pléomorphes (coloration à l'hématoxyline et éosine) (Chang et al., 2015).

## ▪ Grade histologique

La classification des grades utilisée pour les OS est celle de la « Musculoskeletal Tumor Society » connue également sous le nom de « système Enneking ».

Les OS sont classés uniquement en deux grades de sévérité. La tumeur est de bas grade ou de grade élevée (I ou II). La localisation de l'OS est classée également : tumeur intra-médullaire ou de surface. Si des métastases sont présentes, la tumeur est automatiquement classée au grade II. Les OS centraux sont classés comme des tumeurs de haut grade tandis que les OS de surface sont considérés comme des tumeurs de bas grade (**Tableau II**).

## 2. Les ostéosarcomes conventionnels

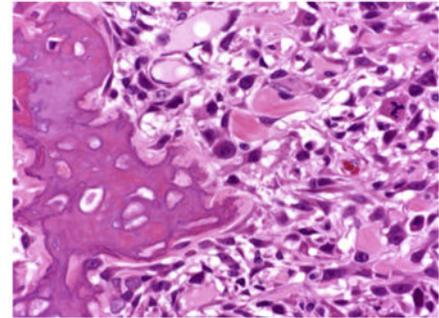
Parmi les OS conventionnels appartenant aux OS intra-médullaires, nous distinguons 3 principaux sous-types. Les cellules ont des formes polyédriques ou fusiformes. Les noyaux sont pléomorphes et hyperchromatiques. Les figures mitotiques sont facilement observables, et des figures mitotiques atypiques peuvent également être identifiées. Les cellules tumorales vont produire une MEC qui peut être osseuse, cartilagineuse ou fibreuse dans différentes proportions. Ainsi, historiquement, l'OS conventionnel a été divisé en sous-types ostéoblastique, chondroblastique et fibroblastique en fonction du type prédominant de matrice produite. Cette séparation est simplement histologique, car il n'y a aucune différence statistique dans la survie des patients atteints par l'OS conventionnel et le traitement est le même pour les 3 sous-types (Klein and Siegal, 2006; Zhang and Rosenberg, 2017).

### a. L'ostéosarcome ostéoblastique

L'OS ostéoblastique représente 50 à 80 % des OS conventionnels. Ce type de tumeur produit une abondante matrice osseuse, formant une tumeur dense et compacte. Les cellules malignes avec un phénotype ostéoblastique sont majoritaires. Elles sont de grandes tailles, pléomorphes, polyédriques ou fusiformes (**Figure 18**). Les noyaux sont hyperchromatiques, en position centrale ou excentrique, et peuvent contenir des nucléoles proéminents. Le cytoplasme est éosinophile et son volume est en corrélation avec la taille des cellules. Les cellules tumorales sont intimement liées aux surfaces de l'os néoplasique et, comme la matrice les entoure et les emprisonne, elles deviennent plus petites et semblent moins atypiques ; Ce phénomène est connu sous le nom de normalisation. L'os néoplasique est tissé en architecture, varie en quantité et se dépose sous forme de travées primitives et désorganisées qui produisent un motif grossier,

semblable à de la dentelle (Fox and Trotta, 2013; Klein and Siegal, 2006; Zhang and Rosenberg, 2017).

**Figure 18 : Histologie d'un ostéosarcome ostéoblastique caractérisé par des cellules malignes associées à un os néoplasique d'aspect type filigrane ou dentelle (coloration hématoxyline et éosine) (d'après Zhang & Rosenberg, 2017).**

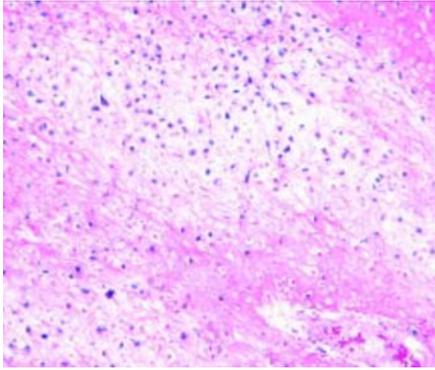


### *b. L'ostéosarcome chondroblastique*

L'OS chondroblastique représente 5 à 25 % des OS conventionnels. Le type cellulaire majoritaire est le chondrocyte. Ce type de tumeur synthétise une abondante matrice cartilagineuse composée de différents types de cartilage de plus ou moins bonne qualité (Fox and Trotta, 2013; Klein and Siegal, 2006). L'OS chondroblastique se différencie du CS car l'OS touche en général des patients plus jeunes que le CS. De plus, contrairement aux CS, il ne touche que très rarement le pelvis.

Sur le plan anatomo-pathologique, même si les OS chondroblastiques ont une matrice majoritairement cartilagineuse, ils possèdent toujours une ostéogenèse tumorale, même minime (**Figure 19**). De plus, l'architecture du cartilage est plutôt en dentelle/filigrane tandis que le cartilage du CS est lobulé et les cellules de l'OS ont un aspect fusiforme (Kim et al., 2011; Klein and Siegal, 2006; Zhang and Rosenberg, 2017).

Un diagnostic différentiel se pose entre l'OS chondroblastique et le CS dédifférencié présentant une différenciation hétérologue ostéosarcomateuse. D'un point de vu histologique, l'anatomopathologiste se concentre sur l'observation du cartilage. Le CS dédifférencié comporte une composante cartilagineuse bien différenciée et de bas grade avec une séparation nette et abrupte. Tandis que, la composante cartilagineuse de l'OS chondroblastique est en général de haut grade avec une continuité entre la composante cartilagineuse et ostéosarcomateuse. De plus, les données cliniques ainsi que la présence de mutation IDH1/2 propre au CS apporte une aide pour poser le diagnostic (Wadhwa, 2014).



**Figure 19 : Histologie d'un ostéosarcome chondroblastique. La tumeur présente un cartilage hyalin, elle est de haut grade, mais elle présente quelques formation ostéoïde en haut à droite de l'image (coloration Hématoxyline et éosine) (d'après Klein & Siegal et al., 2006).**

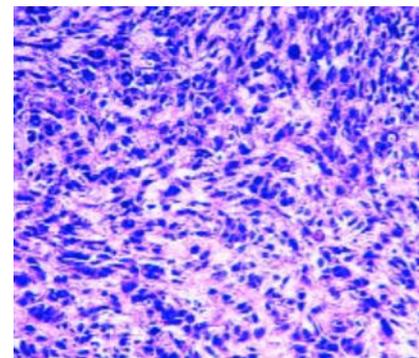
---

### *c. L'ostéosarcome fibroblastique*

L'OS fibroblastique représente 7 à 25 % des OS conventionnels. Les cellules qui le composent sont majoritairement des fibroblastes (**Figure 20**). Les foyers fibroblastiques possèdent une histologie proche du fibrosarcome. Les cellules sont fusiformes, le degré d'atypie est variable mais souvent sévère. Les mitoses sont nombreuses et les formes structurellement anormales sont courantes (Fox and Trotta, 2013; Klein and Siegal, 2006). L'OS fibroblastique peut être confondu avec un fibroblastome. L'analyse des données cliniques ainsi que la présence d'ostéoïde typique de l'OS sont nécessaires afin de réaliser un diagnostic correct (Wadhwa, 2014).

**Figure 20 : Histologie d'un ostéosarcome fibroblastique, caractérisé par des cellules fusiformes ressemblant à des fibroblastes atypiques, contenant peu de matrice osseuse (coloration hématoxyline et éosine) (d'après Klein & Siegal, 2006).**

---



### 3. Les autres types d'ostéosarcomes

#### a. Autres OS centraux

Il existe encore d'autres variants d'OS centraux décrits :

- L'OS télangiectatique (4 %), identifiable grâce à la dilatation des vaisseaux sanguins présents au niveau du septum et des bords périphériques de l'os. Ce type d'OS contient de nombreux espaces kystiques remplis de sang qui représentent plus de 75 % de la tumeur. L'OS télangiectatique est plus sensible à la chimiothérapie il peut donc avoir un meilleur pronostic de survie, avec un taux de survie de 60 % à 10 ans (Zhang and Rosenberg, 2017).

- L'OS à petites cellules (1 à 2 %) est une variante microscopique de l'OS conventionnel de haut grade caractérisé par une prolifération monotone de petites cellules malignes produisant une matrice osseuse. Les caractéristiques cliniques sont identiques à l'OS conventionnel. Au microscope, les cellules tumorales sont rondes à ovales avec une chromatine fine à grossière. Nous observons toujours une production d'ostéoïdes en forme de dentelle (Misaghi et al., 2018; Zhang and Rosenberg, 2017).

- L'OS de bas grade est une variante très rare (1 à 2 %) dont l'architecture de la matrice osseuse est microtubulaire dans un stroma fibreux. Bien que les patients soient généralement traités uniquement par chirurgie et que leur pronostic soit globalement bon, un certain nombre de patients développent un OS secondaire de haut grade au sein de la tumeur d'origine (Clayer, 2015; Klein and Siegal, 2006).

#### b. Les OS de surface

Les OS de surface regroupent quant à eux l'OS périostéal, parostéal et de haut grade (Klein and Siegal, 2006).

- L'OS parostéal représente environ 75 % des OS de surface (Dönmez et al., 2008) et 4-6 % de la totalité des OS (Misaghi et al., 2018). Ces tumeurs sont généralement de faible grade avec un taux de survie de 90 % à 5 ans.

- L'OS périostéal ne représente que 2-3 %. C'est une tumeur de grade intermédiaire, contenant une matrice cartilagineuse avec des zones de calcification.

- L'OS de surface de haut grade représente moins de 1 % de l'ensemble des OS. Il se manifeste sous la forme d'une tumeur de surface avec un haut degré de malignité : croissance rapide,

invasion possible des tissus mous environnants. C'est une tumeur qui présente le même potentiel malin que l'OS conventionnel.

### III. Diagnostic et évolution des ostéosarcomes

#### 1. Diagnostic

L'OS se traduit par l'apparition d'une masse au niveau de l'os ou d'une articulation dont elle peut perturber le mouvement. Il n'y a aucun autre signe clinique associé à cette tumeur, ce qui entraîne la mise en place d'un diagnostic tardif. Une partie des OS est diagnostiquée suite à une fracture. Le premier examen réalisé pour le diagnostic de l'OS est une radiographie (**Figure 21**). L'examen se poursuit également par l'imagerie par IRM.

En radiographie, on observe une destruction de l'os au niveau de la masse tumorale, les tissus mous adjacents présentent un envahissement avec des calcifications irrégulières, puis une rupture corticale peut parfois être observée.



**Figure 21 : Radiographie du genou montrant un ostéosarcome dense du fémur au dessus du genou. Image du Dr. Michael J. Joyce et du Dr Hakan Ilaslan.**  
(<https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/troubles-musculosquelettiques-et-du-tissuconjonctif/tumeurs-des-os-et-des-articulations/tumeurs-osseuses-malignes>)

L'IRM permet, quant à elle, une évaluation beaucoup plus détaillée de l'étendue de la tumeur dans la cavité osseuse et dans les tissus mous, et de son implantation par rapport aux structures environnantes (système nerveux, articulations).

Néanmoins, l'imagerie ne suffit pas pour définir le diagnostic et le pronostic d'un OS. L'examen anatomopathologique est indispensable pour valider le diagnostic et le pronostic. Cet examen, effectué à partir de la biopsie de la tumeur, permet de définir le sous-type et le grade de la tumeur. Ces connaissances permettent ensuite d'adopter la meilleure stratégie thérapeutique.

## **2. Evolution de la pathologie**

L'OS est une tumeur dont l'évolution est rapide. Les traitements actuels permettent d'assurer un taux de survie à 5 ans de 60 à 70 % (Mirabello et al., 2009). Néanmoins, une rechute est observée chez un tiers des patients atteints d'un OS non métastatique (Longhi et al., 2006). Ce phénomène représente un challenge thérapeutique majeur dans le traitement de l'OS.

Le site préférentiel des métastases pour les OS sont les poumons (85 %), puis les os (10 %) (Meazza and Scanagatta, 2016). Au vu du diagnostic souvent tardif de la tumeur, 80 à 90 % des patients présentent des métastases microscopiques, non détectables par les techniques d'imagerie. 15 à 20 % des patients présentent des métastases macroscopiques détectables (Ferguson and Goorin, 2001).

La présence de métastases lors du diagnostic fait chuter le taux de survie à 5 ans à 20 % (Bielack et al., 2002). De plus, une récurrence métastatique est observée dans 50 à 60 % des cas (Briccoli et al., 2005).

## **IV. Modifications pathologiques de la physiologie osseuse dans les ostéosarcomes**

### **1. L'environnement osseux**

Différents types cellulaires sont retrouvés au sein de cet environnement complexe : les précurseurs ostéoclastiques, les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse, les précurseurs ostéoblastiques, et les ostéoblastes responsables de la synthèse osseuse.

#### *a. Remodelage osseux non pathologique*

L'environnement osseux est caractérisé par un cycle de remodelage osseux comprenant deux phases majeures : la résorption de l'os suivie d'une production d'une nouvelle matrice

osseuse. Ce processus physiologique est très actif lors de la croissance des enfants et des adolescents. Ce cycle a lieu en même temps que le premier pic d'incidence de l'OS. Ainsi, les différents facteurs impliqués dans le remodelage osseux prennent une part importante dans le contrôle et la transformation vers un phénotype pathologique (Alfranca et al., 2015).

Le remodelage osseux remplit trois principales fonctions. Il permet à l'organisme de réguler l'équilibre minéral (homéostasie du calcium et du phosphate). Il permet aussi une adaptation constante du squelette à son environnement mécanique, réduisant le risque de fracture. C'est également un mécanisme de réparation des dommages osseux pouvant être parfois créés.

Plusieurs facteurs locaux contrôlent le remodelage osseux. Ils sont essentiellement produits par les ostéoblastes et les cellules du microenvironnement osseux. Ces facteurs occupent un rôle d'intermédiaires sous l'action de certaines hormones systémiques (Katsimbri, 2017).

Les principaux facteurs impliqués dans le remodelage osseux sont :

- **Le système RANK-L/OPG**

Le système RANK-L/OPG (« Receptor Activator of NF Kappa B-Ligand/Ostéoprotégérine ») est un médiateur de la communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes.

RANK-L est une cytokine « TNF-related » transmembranaire avec un court domaine N-Terminal intracytoplasmique et une longue portion extra-cytoplasmique C-terminale. Le domaine extra-cytoplasmique de RANKL reconnaît des cellules progénitrices hématopoïétiques engagées dans la différenciation ostéoclastique. RANKL active donc son récepteur RANK exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique et stimule la différenciation des progéniteurs des ostéoclastes. Il maintient le niveau d'activité de ces derniers et prolonge leur durée de vie en inhibant l'apoptose (Boyce and Xing, 2008; Chen et al., 2018b).

L'ostéoprotégérine est une glycoprotéine produite en particulier par les ostéoblastes et aussi par d'autres cellules de la moelle osseuse. Elle agit comme un récepteur piège de RANKL, inhibant son action. Il y a donc présence d'un ratio optimal entre le niveau d'expression de RANKL et d'OPG au sein des ostéoblastes, qui permet de contrôler la résorption osseuse (Boyce and Xing, 2008).

- **Le Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )**

Les TGF- $\beta$ s sont les facteurs de croissance les plus abondants au sein de la matrice osseuse. Les TGF- $\beta$ s appartiennent à une superfamille dans laquelle on trouve les BMPs (« Bone Morphogenetic factor ») impliquées dans la formation du cartilage et de l'os. Les TGF- $\beta$ s sont présents sous forme latente dans la matrice osseuse, et les ostéoclastes peuvent libérer et activer le TGF- $\beta$  de la matrice osseuse. Le TGF- $\beta$  libéré peut à ensuite stimuler la formation d'ostéoblastes (Zuo et al., 2012).

- **Les insulin-like Growth Factor (IGF)**

Les IGFs sont abondants dans le tissu osseux, ils jouent un rôle important dans sa formation à travers la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. L'IGF-I possède un effet mitogène important sur les chondrocytes et les ostéoblastes. Lors de sa libération durant la résorption osseuse, il stimule la différenciation ostéoblastique afin d'induire la nouvelle formation osseuse (Xian et al., 2012).

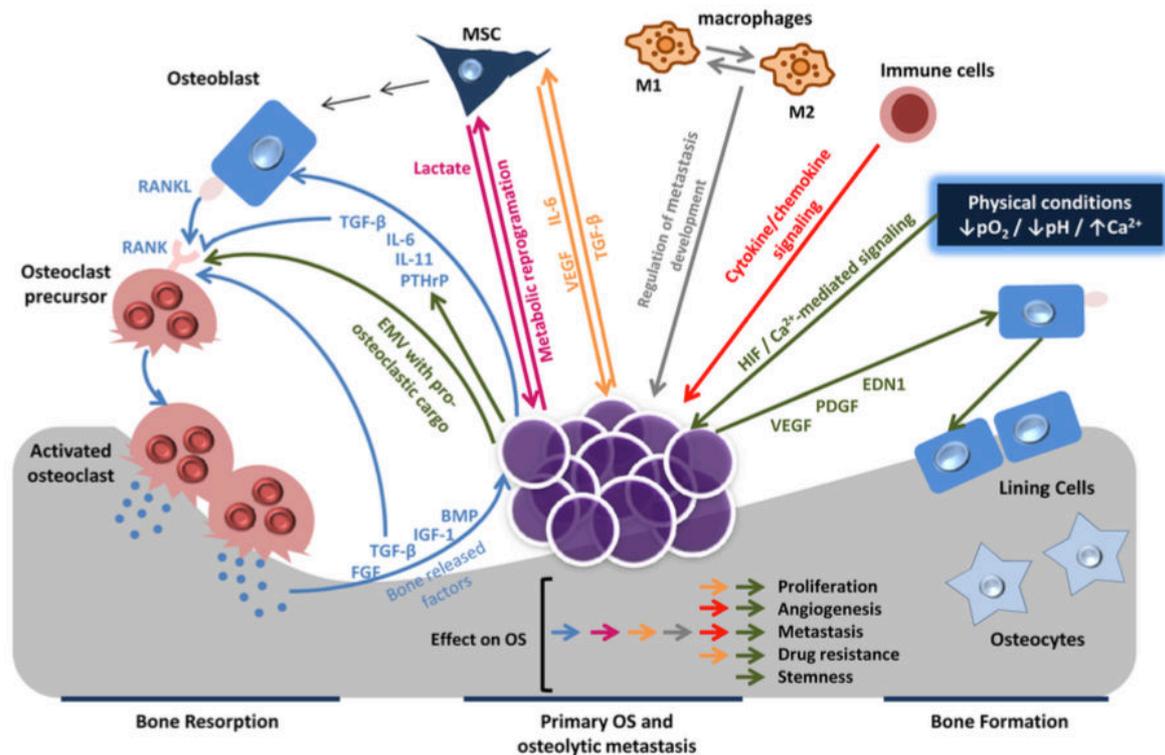
### *b. Remodelage osseux pathologique*

L'environnement osseux est riche en facteurs de croissance qui favorisent la croissance des tumeurs primaires et métastatiques (Theriault and Theriault, 2012). Dans des conditions pathologiques, la communication autocrine et paracrine des cellules de l'environnement osseux ne permet plus de conserver l'homéostasie osseuse (**Figure 22**).

Ces différentes conditions pathologiques stimulent la production par les cellules tumorales de facteurs stimulants les ostéoblastes comme le VEGF et le PDGF, mais augmentent également l'angiogenèse. Par ailleurs, ces différentes caractéristiques favorisent le maintien des cellules à l'état de cellules souches, responsables de l'agressivité tumorale et de la résistance aux traitements (Kingsley et al., 2007).

Les cellules tumorales hautement prolifératives produisent donc une abondante matrice ostéoïde ou de l'os de façon désorganisée. De plus, l'augmentation de l'activité des ostéoclastes est associée à l'agressivité de la tumeur (Avnet et al., 2008). En effet, les ostéoclastes peuvent acquérir un fort potentiel ostéolytique. Cette activité lytique est caractérisée par la production de TGF- $\beta$  ou d'interleukine 11 (IL-11) par les ostéoblastes ainsi que par la libération des facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse comme le TGF- $\beta$ , les BMPs et l'IGF-I. Ce déséquilibre du remodelage osseux crée un environnement enrichi en facteur de croissance et en MMPs favorisant la prolifération et la survie des ostéoblastes qui produisent une matrice

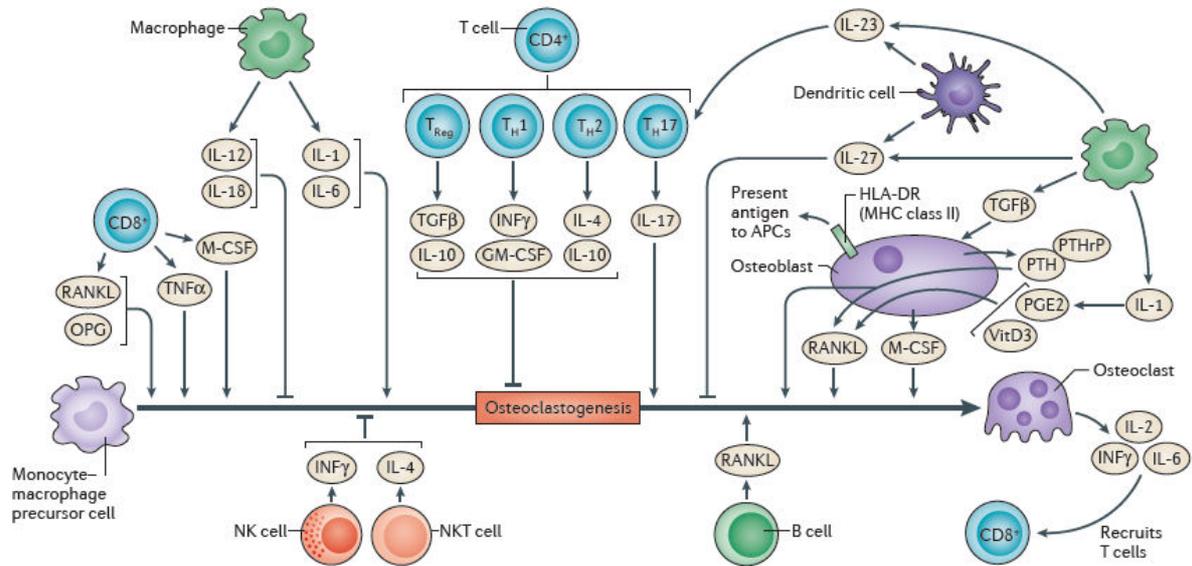
osseuse de façon anarchique. La dérégulation de l'homéostasie osseuse dans les OS auto-entretient le développement de la tumeur et aussi la formation de métastases (Alfranca et al., 2015) (Figure 22).



**Figure 22 : Relation entre les cellules de l'environnement osseux et l'ostéosarcome.** La présence de cellules d'OS métastatiques à potentiel ostéolytique dans le microenvironnement osseux initie un "cercle vicieux" dans lequel les cellules tumorales produisent des facteurs (PTHrP, TGF-β ou IL-11) qui stimulent l'activation des ostéoclastes par le biais d'une interaction entre ostéoblastes et ostéoclastes à médiation RANKL-RANK. Cette activation entraîne une lyse osseuse dérégulée et une libération accrue de facteurs de croissance de la matrice osseuse (BMP, TGF-β, IGFI ou FGF) qui, à son tour, favorise la prolifération des cellules tumorales (flèches bleues). De la même manière, les cellules d'OS primaires pourraient également induire un cycle similaire d'activité ostéoclastique et de lyse osseuse associé à une agressivité tumorale accrue. Les cellules d'OS pourraient également induire la production de molécules pro-tumorigènes (lactate, VEGF et IL-6) à partir de l'environnement osseux des cellules souches mésenchymateuses (flèches magenta et orange). En outre, les macrophages immunostimulants (M1) et immunosuppresseurs (M2) associés aux tumeurs et d'autres cellules immunitaires jouent un rôle dans la progression de l'OS par le biais d'une signalisation à médiation cytokine et chimiokine (flèches grises et rouges). Les conditions physiques du microenvironnement de la tumeur jouent également un rôle important dans le développement de l'OS (flèches vertes). Ainsi, l'hypoxie (par la signalisation médiée par HIF1) et le pH acide favorisent l'angiogenèse et le comportement métastatique et stimulent les cellules d'OS à produire des facteurs de stimulation des ostéoblastes (VEGF, PDGF et EDN1) et peuvent également coopérer avec la signalisation du TGF-β pour potentialiser le "cercle vicieux" des tumeurs osseuses. Enfin, la signalisation extracellulaire à médiation calcique contribue également au "cercle vicieux" par l'induction de la production de PTHrP. Le bilan des différentes interactions sur le développement de l'OS est indiqué selon le code couleur indiqué ci-dessus (d'après Alfranca et al., 2015).

## 2. Le système immunitaire

La présence du système immunitaire dans l'environnement impacte également la progression tumorale. Les cellules osseuses et les cellules du système immunitaire communiquent entre elles et cela de manière très importante. En effet, les voies de signalisation comme RANKL, les cytokines IL-1, IL-6, ou le TGF- $\beta$  peuvent également être modulées par les cellules du système immunitaire et participent donc à l'homéostasie osseuse (Kansara et al., 2014) (**Figure 23**).



**Figure 23 : Relation entre les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules immunitaires (d'après Kansara et al., 2014).**

De plus, l'OS est une tumeur en contact étroit avec les cellules immunitaires, les macrophages en particulier. Chez l'Homme, les macrophages associés à la tumeur (TAM) sont une population de cellules immunitaires dont le rôle dans la progression tumorale est largement reconnu dans de nombreux types de cancers. La principale composante de la réponse inflammatoire dans les OS est associée aux TAM ainsi qu'aux lymphocytes T (Inagaki et al., 2016). Il a été montré que les TAM permettent d'éliminer les cellules T infiltrant les tumeurs d'OS et favorisent donc l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire (Han et al., 2016). Cependant, le lien entre les TAM et le potentiel métastatique est encore controversé pour l'OS selon la proportion de TAM polarisés M1 (à activité anti-tumorale) ou M2 (associés à la progression tumorale) (Buddingh et al., 2011; Dumars et al., 2016; Gomez-Brouchet et al., 2017).

Par ailleurs, lors du processus de tumorigenèse, les cellules tumorales échappent à la surveillance du système immunitaire par différents mécanismes que l'on appelle l'immuno-édition (Schreiber et al., 2011). Plusieurs mécanismes sont responsables de l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire :

- **Perte de l'immunogénicité des OS**

La diminution de l'immunogénicité peut être due à une mauvaise ou une absence de présentation des antigènes tumoraux aux cellules effectrices. Dans l'OS, une surexpression de la protéine MICA (« class I MHC chain-related molecule A ») est observée dans le sérum des patients. Cette molécule interfère avec les récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité présent sur les cellules effectrices, bloquant ainsi leur cytotoxicité contre les cellules cancéreuses (Lu et al., 2008).

- **Environnement immunosuppresseur des OS**

Les cellules tumorales créent un environnement anti-inflammatoire et pro-tumoral grâce à la synthèse de facteurs immunosuppresseurs. La présence de lymphocytes T régulateurs dans la tumeur favorise cet environnement pro-tumoral. Dans l'OS, leur présence est associée à un pronostic plus défavorable pour les patients ainsi qu'une moins bonne réponse face à la chimiothérapie (Fritzsching et al., 2015).

- **Blocage de la surveillance immunitaire par les OS**

Dans un environnement physiologique sain, des points de contrôle permettent d'inhiber la réponse immunitaire, c'est ce que l'on appelle la tolérance du soi. Cela permet de limiter une réponse immunitaire aberrante sur les cellules non tumorales. Les cellules tumorales détournent ces points de contrôles pour échapper à cette surveillance immunitaire, diminuant ainsi l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Pardoll, 2012).

Pour l'OS, il a été démontré que la détection de la protéine de mort programmée PD-1 (« Programmed death-ligand 1 »), qui est une protéine permettant d'exercer un rétrocontrôle sur l'activation de cellules T dans le sang, est corrélée avec le grade de la tumeur (Zheng et al., 2015). Une autre étude a mis en évidence que le taux de TIM-3 (« T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-3 »), inhibiteur des lymphocytes Th1, est plus important dans le tissu tumoral et que son taux est corrélé avec le grade de la tumeur (Ge et al., 2017).

### 3. L'angiogenèse

L'angiogenèse occupe une place importante dans la croissance tumorale et dans la dissémination métastatique de l'OS. Au-delà d'une certaine taille, un état hypoxique se crée au centre de la tumeur, à l'origine parfois d'une nécrose. La tumeur met alors en place des mécanismes pro-angiogéniques.

Lors de l'angiogenèse non pathologique, de néo-vaisseaux se forment à partir de vaisseaux préexistants sous la stimulation du facteur de croissance VEGF.

Au sein de l'OS, la structure des néo-vaisseaux tumoraux est différente. Cette structure doit s'adapter à une croissance tumorale rapide. Cette croissance rapide entraîne la mise en place d'un réseau vasculaire anarchique (Jain and Munn, 2000). L'induction des facteurs pro-angiogéniques est sous le contrôle des HIFs, mécanisme décrit dans les chapitres précédents.

La fixation du VEGF sur son récepteur induit également la production des MMP-2 et MMP-9. La synthèse de ces MMPs est responsable de la dégradation de la matrice environnante (Cho et al., 2007). Cette dégradation de la matrice osseuse favorise le processus métastatique, notamment en facilitant la TEM décrite précédemment (Radisky et al., 2005).

## V. Altérations génétiques et moléculaires dans les ostéosarcomes

### 1. Prédispositions moléculaires de l'ostéosarcome

Comme beaucoup de cancers, l'OS présente de nombreuses altérations moléculaires. La liste présentée ci-dessous est non exhaustive. Les mutations génétiques mises en évidence peuvent varier entre les différents OS. En revanche, d'autres mutations sont communes à ce type de tumeur (**Tableau III**). Elles favorisent et prédisposent le développement de la tumeur (Franceschini et al., 2020).

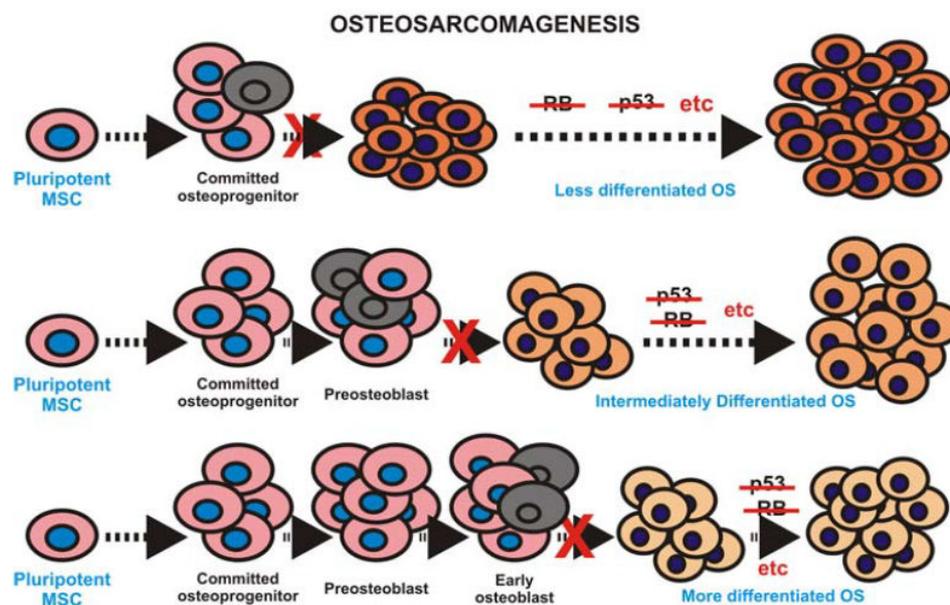
Gene	Type of alteration	Somatic/germline	Function	Frequency in sporadic OS (%)
TP53	Translocation; deletion; mutation	Germline (Li-Fraumeni syndrome) and somatic	Genome stability; cell cycle control	47-90
RB1	Mutation; deletion	Germline (retinoblastoma) and somatic	Genome stability; cell cycle control	29-47
MYC	Amplification	Somatic	Cell proliferation	39
CCNE1	Amplification	Somatic	Cell cycle control	33
DLG2	Deletion	Somatic	Cell signalling	29-52
COP3	Amplification	Somatic	Signal transduction	20-39
AURKB	Amplification	Somatic	Cell cycle	13
PTEN	Mutation; deletion; copy number alteration	Somatic	Cell cycle control	12-50
CDKN2A	Deletion	Somatic	Cell cycle control	15
ATRX	Mutation; deletion	Germline (ATR-X syndrome) and somatic	Genome stability; chromatin remodelling; ALT	10-29
CDKN2A	Mutation; deletion	Somatic	Cell cycle control	10
CDK4	Amplification	Somatic	Regulates RB activity	9-11
MDM2	Amplification	Somatic	Regulates P53 activity	5-12
IGF1R	Mutation; amplification	Somatic	Bone growth and development	5
AKT	Amplification	Somatic	Cell proliferation; apoptosis	5
RECQL4	Mutation	Germline (Rothmund-Thomson syndrome)	DNA repair; genome stability	0
WRN	Mutation	Germline (Werner syndrome)	DNA repair; genome stability	0
BLM	Mutation	Germline (Bloom syndrome)	DNA repair; genome stability	0

**Tableau III : Aperçu des altérations récurrentes observées dans les ostéosarcomes conventionnels (d'après Franceschini et al., 2020).**

La protéine p53 est un facteur de transcription intervenant dans de nombreux processus cellulaires comme l'apoptose ou le cycle cellulaire. Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur. Le syndrome de Li Fraumeni est caractérisé par une mutation germinale non fonctionnelle de *TP53*. Du fait de la perte de fonction de p53, les patients atteints par ce syndrome ont une plus forte prédisposition à développer des OS. Ce syndrome de Li Fraumeni reste rare, mais la perte de fonction de p53 est retrouvée dans 40 à 60 % des OS (Isakoff et al., 2015). Les mutations de *TP53* sont observées dans 20 % des OS seulement, alors que les altérations structurelles (translocations dans le premier intron principalement) sont plus fréquentes (47 à 90 %) (Chauveinc et al., 2001).

La protéine Rb est impliquée dans la progression du cycle cellulaire. Dans l'OS, une perte d'hétérozygotie de Rb est observée (60 % des cas). Cela entraîne la suppression d'un point de contrôle du cycle cellulaire favorisant une prolifération accrue des cellules tumorales (Chauveinc et al., 2001). Des mutations somatiques du gène *RBI* sont identifiées dans 29 à 47 % des OS. C'est le deuxième gène le plus altéré dans les OS (Chauveinc et al., 2001).

Il est bien établi que des personnes avec des mutations germinales de *TP53* et *RBI* ont une susceptibilité accrue de développer des cancers, notamment des sarcomes. L'importance de *TP53* et *RBI* dans la genèse des OS est illustrée dans la **Figure 24**.



**Figure 24 : Développement de l'ostéosarcome.** La perturbation de la différenciation ostéogénique peut conduire au développement de l'OS. Les défauts causés par des altérations géniques (par exemple, activation d'oncogènes ou inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et Rb) et épigénétiques peuvent se produire à différents stades de la différenciation ostéogénique. Il est concevable que des défauts aux premiers stades puissent conduire au développement d'un OS plus agressif et indifférencié, ou *vice versa*. Les cellules de couleur gris foncé sont celles qui ont subi une transformation maligne (d'après Tang et al., 2008).

## 2. Principales voies de signalisation altérées dans l'ostéosarcome

### ▪ La famille Bcl-2

Dans l'OS, des analyses immunohistochimiques ont mis en évidence qu'une surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL est associée à un mauvais pronostic (Wang et al., 2010; Wu et al., 2012). Ces membres de la famille Bcl-2 sont donc des cibles potentiellement intéressantes pour le traitement de l'OS.

#### ▪ Cycle cellulaire et Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est impliquée dans le développement embryonnaire et la mise en place de la polarité dorso-ventrale du tube neural (Lie et al., 2005). Chez l'adulte, cette voie qui contrôle la prolifération cellulaire se retrouve impliquée dans le processus de carcinogénèse. Un ligand de la famille Wnt se lie au récepteur transmembranaire Frizzled de la cellule permettant la transduction du signal qui aboutit à l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Cette dernière s'accumule alors dans le cytoplasme. Elle est ensuite transloquée dans le noyau où elle interagit avec des facteurs de transcription comme TCF (« T-Cell factor »), qui active la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme *c-myc* ou *CCND1* (gène de la Cycline D1). En absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine est dégradée par le protéasome et n'agit plus comme un co-facteur transcriptionnel (Logan and Nusse, 2004). La prolifération et la migration cellulaire sont donc inhibées.

Environ 75 % des OS présentent une mutation de Wnt, qui se traduit par une stimulation de la prolifération cellulaire. De plus, des analyses immunohistochimiques ont permis de mettre en évidence que l'augmentation de l'expression LRP5 (« Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5 ») était corrélée avec un mauvais pronostic pour les patients, avec un risque métastatique accru (Hoang, 2012).

#### ▪ IGF-I et IGF-IR

L'IGF-I joue un rôle dans l'homéostasie du tissu osseux. Cette protéine est impliquée dans la différenciation ostéogénique des précurseurs des ostéoblastes (Guo et al., 2017). Dans un contexte physiologique non pathologique, l'interaction de l'IGF-I avec son récepteur IGF-IR permet l'autophosphorylation du récepteur et l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation comme les voies PI3K/Akt/mTOR et MAPKinases.

De nombreuses mutations dans la voie de signalisation de l'IGF-I sont présentes dans l'OS (Behjati et al., 2017). Une surexpression du récepteur de l'IGF-I induit une suractivation de la prolifération des cellules en présence de l'IGF-I (Li et al., 2019b). Une surexpression de l'IGF-I est aussi retrouvée dans les OS. Ces surexpressions sont associées à l'agressivité de la tumeur.

#### ▪ TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance présent dans le tissu osseux. En condition physiologique, les TGF- $\beta$ s se fixent à leur récepteur et déclenchent une signalisation qui aboutit

à la phosphorylation de Smads spécifiques du ligand (-1,-2,-3 ou -5) par le récepteur I activé (T $\beta$ RI), puis la liaison du Smad phosphorylé à Smad-4 pour former un hétérodimère. Le complexe migre ensuite dans le noyau où il active la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Heldin and Moustakas, 2016). Le TGF- $\beta$  stimule également la migration et la prolifération des CSMs lors de la différenciation ostéoblastique (Juárez and Guise, 2011).

Dans l'OS, l'implication de cette voie a été mise en évidence dans le processus de tumorigenèse dans différents modèles cellulaires (Lamora et al., 2016). Le miR-29 entraîne un blocage de la prolifération cellulaire en inhibant l'expression du TGF- $\beta$  entraînant une augmentation de l'expression de la protéine PUMA dans la lignée d'OS MG-63 (Wang et al., 2016a).

#### ▪ YAP et TAZ

YAP (« Hippo/Yes-Associated Protein ») et TAZ (« Transcriptional co-activator with PDZ binding motif ») sont des facteurs de transcription régulés par la voie de signalisation Hippo. Lorsque la voie Hippo est activée, une signalisation en cascade induit la phosphorylation de YAP et TAZ, qui restent dans le cytoplasme où ils sont dégradés. Lorsque la voie Hippo est inactivée, YAP et TAZ sont déphosphorylés et transloquent dans le noyau où ils induisent la transcription de gènes cibles notamment impliqués dans la survie, la prolifération ainsi que l'auto-renouvellement des cellules (Wang et al., 2016b; Yu et al., 2015a).

Sur le plan immunohistochimique, une expression élevée de YAP a été observée dans 60 à 85 % des OS (Bouvier et al., 2016; Zhang et al., 2013a; Zucchini et al., 2019). Cependant, seule l'immunoréactivité nucléaire a été corrélée à une issue défavorable dans 30 à 46 % des cas pour certaines études (Bouvier et al., 2016; Zucchini et al., 2019), mais pas dans toutes les études, ce qui est peut-être dû à la petite taille des cohortes de patients (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2013a) comme le suggère Kovar et ses collaborateurs (Kovar et al., 2020). Toutefois, l'inhibition de YAP dans les lignées cellulaires d'OS a permis de supprimer la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale *in vitro* ainsi que la formation de tumeur chez les souris (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2013a).

L'inhibition de YAP a réduit de manière significative le potentiel tumorigène des cellules d'OS dans un modèle murin avec une activation de la voie Hedgehog (Chan et al., 2014). Il est à noter que plusieurs composants de la signalisation Hedgehog, y compris les protéines à doigts de zinc 1 et 2 de la famille GLI (GLI1 et GLI2) et patch 1 (*PTCH1*), ont été

trouvés surexprimés dans l'OS humain. L'inhibition de GLI2 a permis d'induire les mêmes effets que l'inhibition de YAP en supprimant la prolifération et l'invasion des lignées cellulaires d'OS (Hirotsu et al., 2010; Nagao et al., 2011).

Si plusieurs données s'accordent sur le rôle important de YAP dans l'OS, peu de données sont disponibles sur le potentiel tumorigène de TAZ chez l'OS humain. Une étude a montré que sur une petite série de 16 OS, 13 possédaient une expression plus élevée de TAZ que dans le tissu osseux normal (Shen et al., 2017). Sur les lignées U2OS et HOS avec une capacité migratoire accrue, des augmentations concomitantes de l'expression des ARNm de TAZ et des marqueurs de la TEM (cadhérine-N, vimentine et SNAIL) ont été observées, tandis que la cadhérine-E était progressivement diminuée. Ce phénotype a pu être inversé par l'inhibition de l'expression de TAZ, tandis que l'expression ectopique de TAZ a favorisé la TEM des lignées (Shen et al., 2017).

## VI. Traitements conventionnels des OS

### 1. La chirurgie de l'ostéosarcome

#### a. Résection de la tumeur primaire

Les OS touchant majoritairement une population jeune, la chirurgie se veut d'être au maximum conservatrice. L'objectif est de maintenir la fonction du membre atteint ou de permettre sa reconstruction. La qualité de la résection tumorale est un facteur pronostique important de l'OS. Pour maximiser les chances d'un retrait complet de la tumeur, l'imagerie est utilisée afin de bien visualiser l'extension de la tumeur et permet au chirurgien de planifier au mieux cette intervention. L'inconvénient de l'acte chirurgical est la possibilité d'induire des métastases.

#### b. Résection des métastases

Environ 30 % des patients présentent des métastases lors du diagnostic. La majorité de ces métastases sont pulmonaires. Le traitement est chirurgical (Su et al., 2004). La chirurgie est ensuite complétée par l'utilisation de la chimiothérapie pré- et post-opératoire.

## 2. La chimiothérapie

### a. Les traitements actuels

L'introduction de la chimiothérapie dans les années 70 a permis d'améliorer significativement la survie des patients. Ce type de traitement a fait passer le taux de survie à 5 ans de 10-20 % pour une chirurgie seule, à environ 60 à 70 % en combinant chirurgie et chimiothérapie (Misaghi et al., 2018). La chimiothérapie pré-opératoire va permettre de contrôler l'évolution de la tumeur et permettre un acte chirurgical moins invasif. Elle permet également de traiter les micro-métastases non visibles lors du diagnostic. La chimiothérapie post-opératoire va, quant à elle, prévenir une rechute locale et métastatique de la tumeur.

Il y a 4 agents indiqués pour les OS : MTX, doxorubicine, cisplatine, ifosfamide. Lors de la présence de métastases pulmonaires, les patients peuvent également être traités avec l'étoposide (Misaghi et al., 2018; Whelan and Davis, 2018).

Le MTX est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme clef qui participe à la synthèse de la thymidine, et donc de l'ADN. La doxorubicine et l'étoposide sont des agents intercalants inhibiteur de la topoisomérase II. Le cisplatine et l'ifosfamide sont des agents alkylants induisant des ponts intra et inter-brins dans l'ADN.

### b. Chimiorésistance des ostéosarcomes

#### ▪ Surexpression de MDR-1

Tout comme dans les CS, le gène *MDR-1* codant pour la glycoprotéine P est surexprimé dans les OS. Cette surexpression est due à une amplification et à un gain du nombre de copies du gène *MDR1* (Serra and Hattinger, 2017).

#### ▪ Sous expression de DHFR

Le MTX est administré pour le traitement des OS pédiatriques. Une fois dans la cellule, le MTX interagit avec la DHFR, enzyme qui convertit le dihydrofolate en tétrahydrofolate, essentiel pour la synthèse de la thymidine de l'ADN. Différents variants génétiques du gène de la DHFR sont retrouvés dans l'OS et sont associés à une forte chimiorésistance (Jabeen et al., 2015; Patiño-García et al., 2009).

- **Voie PI3K-Akt-mTOR**

Cette voie de signalisation, comme pour le CS, joue un rôle dans la chimiorésistance des OS (Engelman, 2009), mais également dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose.

### **3. La radiothérapie**

Dans la littérature, une étude rétrospective a été réalisée sur 100 patients d'âge médian de 18 ans, traités par radiothérapie (dose médiane délivrée de 55,8 Gy) et chimiothérapie (Schwarz et al., 2009). La survie globale à 5 ans après radiothérapie était de 36% (55% dans le cas de tumeurs primaires, 15% en cas de récurrence et 0% en cas de métastases). La survie globale des patients est donc faible. L'OS est en fait considéré comme une tumeur radio-résistante. Cependant, la radiothérapie s'avère nécessaire dans certains cas où la tumeur n'est pas opérable ou lorsque la résection de la tumeur est incomplète. L'utilisation de la radiothérapie est donc indiquée à des fins palliatives (Errani et al., 2011; Misaghi et al., 2018).

Les mécanismes de radio-résistance ne sont pas totalement élucidés. Néanmoins, comme chez le CS, l'expression d'HIF augmenterait les capacités de résistance de la tumeur à la radiothérapie (Feng et al., 2016; Meijer et al., 2012). Comme vu précédemment, l'autophagie induite par l'hypoxie serait un mécanisme supplémentaire impliqué dans la résistance à la radiothérapie (Feng et al., 2016). Dans cette étude, le prétraitement en hypoxie augmente la survie cellulaire lors de l'irradiation de cellules d'OS humain MG-63. L'immunohistochimie des coupes de tissu tumoral d'OS révèle une augmentation d'expression de LC3 corrélée avec le niveau d'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$ , sous-entendant un lien de causalité entre l'hypoxie et l'autophagie. De plus, l'étude propose que l'hypoxie peut conférer aux cellules une résistance à l'irradiation grâce à l'autophagie qui accélère la clairance des ROS (Feng et al., 2016).

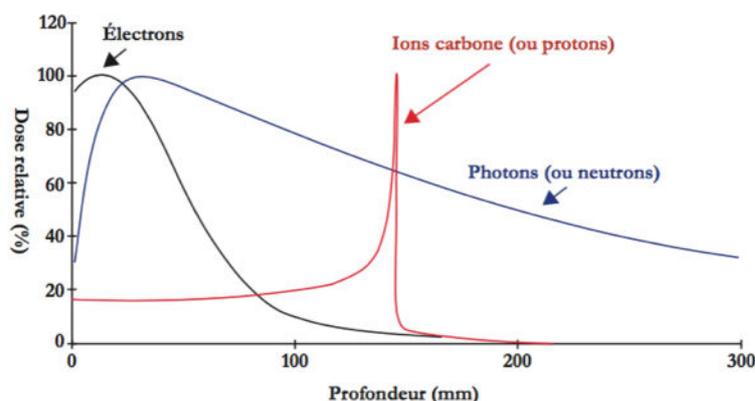
## C. Traitements « non conventionnels » des chondrosarcomes et des ostéosarcomes

Aujourd'hui de nouvelles stratégies émergent pour le traitement des cancers. Le but de ces nouvelles thérapies innovantes est d'améliorer l'efficacité des traitements conventionnels, voire de remplacer ces traitements et ainsi se défaire des nombreux effets secondaires de ces derniers. Dans le cadre des sarcomes osseux nous parlerons de l'hadronthérapie, de la létalité synthétique (inhibiteurs de PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymérase)), de l'immunothérapie, de thérapies ciblées et enfin les miRNAs seront présentés de manière détaillée dans le chapitre suivant.

### 1. L'hadronthérapie

#### a. *Principe*

La zone de radiation par la radiothérapie conventionnelle par photon est médiocre, conduisant à un risque de toxicité pour les organes avoisinants la tumeur. L'hadronthérapie utilise un faisceau, notamment des protons (protonthérapie) ou des ions carbonés (carbonothérapie) pour irradier les tumeurs. L'intérêt de ce type de radiothérapie par rapport à la radiothérapie conventionnelle réside dans ses propriétés balistiques et biologiques (**Figure 25**) (Pommier et al., 2010). Les protons utilisés sont accélérés, donnant lieu à des ionisations et excitations du milieu traversé très proches les unes des autres avec une trajectoire beaucoup plus rectiligne que les photons utilisés en radiothérapie (Thariat et al., 2018).

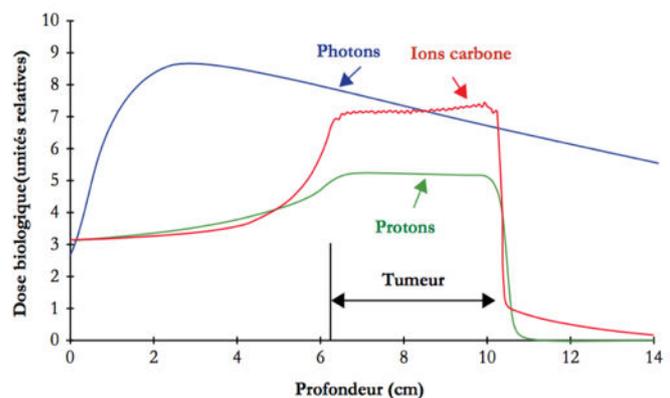


**Figure 25 : Courbe de rendement en profondeur : photons, électrons protons et ions carbonés (d'après Pommier et al., 2010).**

A cause de leur balistique médiocre, les photons conduisent à une irradiation d'un plus grand volume de tissus sains et la majorité de l'énergie délivrée s'effectue au point d'entrée du

tissu irradié. Les protons ont une courbe de rendement de l'énergie délivrée que l'on appelle le « pic de Bragg » (**Figure 25**) extrêmement focalisée et que l'on peut délivrer de manière très précise, en fonction de la particule utilisée, de son énergie et du milieu traversé. De ce fait, l'incidence du rayonnement sur les tissus en amont ou en aval est très réduite. Cependant, comme la quasi-totalité du rayonnement est délivré de façon très précise et localisée, pour irradier l'ensemble du volume de la tumeur, il faut additionner les pics de Bragg de différentes énergies aboutissant « au pic de Bragg étalé » (**Figure 26**). Au vu de la capacité des protons et ions carbone à limiter le volume d'irradiation des tissus sains, cela permettrait théoriquement de réduire les risques de cancer radio-induit. Les risques de cancer radio-induit peuvent apparaître plusieurs années après le traitement, donc l'utilisation de cette thérapie pourrait être particulièrement intéressante chez l'enfant affecté par un OS pédiatrique (Miralbell et al., 2002).

**Figure 26 : Effet biologique relatif (pic de Bragg étalé) (d'après Pommier et al., 2010).**



D'un point de vue biologique, les interactions des rayonnements avec la matière sont également différentes et vont entraîner pour une même dose physique des effets biologiques spécifiques. Une forte ionisation induit beaucoup plus de cassures double brins irréparables dans l'ADN. Les ions carbone, ainsi que les neutrons sont des particules possédant un haut transfert d'énergie linéique (TEL). Cela signifie qu'ils induisent une densité d'ionisation très importante à la cellule. De plus, les particules de haut TEL sont beaucoup moins impactées par les phénomènes d'hypoxie, qui est une des principales causes de la radiorésistance. Les protons quant à eux, sont considérés comme des rayonnements de faible TEL. Pour les neutrons, l'efficacité biologique relative est élevée sur l'ensemble de leur parcours dans la matière, leur précision balistique est donc considérée comme médiocre. Pour les ions carbone, l'effet biologique relatif ne se manifeste qu'au niveau du pic de Bragg et non dans le faisceau d'entrée (**Figures 25 et 26**) (Pommier et al., 2010).

La protonthérapie est indiquée pour des sarcomes requérant des doses élevées (>70 Gy pour les CS) avec des tumeurs proches d'organes en série (moelle épinière, tronc cérébral, nerfs optiques). Cela concerne les sarcomes de la base du crâne et du rachis (Fung et al., 2018; Weber et al., 2016). Les CS et les chordomes, considérés comme radio-résistants, sont les principales tumeurs traitées par protonthérapie. Néanmoins, l'efficacité de traitements combinés associant protonthérapie et chimiothérapie ou thérapie ciblée doit encore être évaluée.

*b. Données précliniques et cliniques pour les OS et les CS*

Le nombre de centres exerçant l'hadronthérapie dans le monde reste faible (83 centres pour les protons et 13 pour les ions carbone en septembre 2019) (Jefferson et al., 2019). Trois centres de protonthérapie sont opérationnels en France (à Orsay, à Nice, et le centre Cyclad à Caen depuis juillet 2018). Parmi les centres dédiés à la carbonothérapie, la majorité se trouve en Asie (6 au Japon et 3 en Chine), puis en Europe (2 en Allemagne, 1 en Italie, 1 en Autriche). En France, le centre Cyclad devrait être opérationnel en 2024 pour traiter les patients par protons et aussi par ions carbone (programme Archade). L'accès à ce type de soin pour les patients reste donc limité. Fin 2016, 21580 patients ont été traités par ions carbone, la majorité à HIMAC au Japon (10692 patients) (Jefferson et al., 2019).

Ainsi, les études comparatives sur l'efficacité de l'hadronthérapie par rapport aux traitements conventionnels pour le traitement du CS ou de l'OS sont peu nombreuses ou sont en cours. D'après les données de l'étude rétrospective de Catanzano et al. entre 2004 et 2015 aux Etats-Unis, le taux de survie global à 5 ans (indépendamment de la dose administrée) de 294 patients atteints d'un CS traités par radiothérapie conventionnelle était de 48 %, contre 82% pour les 69 patients traités par protonthérapie (Catanzano et al., 2019). L'étude rétrospective de Weber et al. a évalué les taux de survie de patients atteints d'un chordome (151 patients) ou d'un CS (71 patients) de la base du crâne traités par protonthérapie (doses moyennes délivrées de  $75,2 \pm 2,2$ , Gy) (Weber et al., 2016). Les auteurs ont calculé des taux de survie à 7 ans de 91,6% pour le chordome et de 81,7% pour le CS. Entre 1998 et 2005, 54 patients avec un CS de bas grade à intermédiaire à la base du crâne ont été traités par carbonothérapie à Darmstadt (Allemagne) après une chirurgie (Schulz-Ertner et al., 2007). La survie globale à 5 ans a été calculée à 98,2%. D'après ces études, les traitements par ions carbone et par protonthérapie sont donc efficaces pour le CS et offrent de fort taux de contrôle des tumeurs avec peu de toxicité.

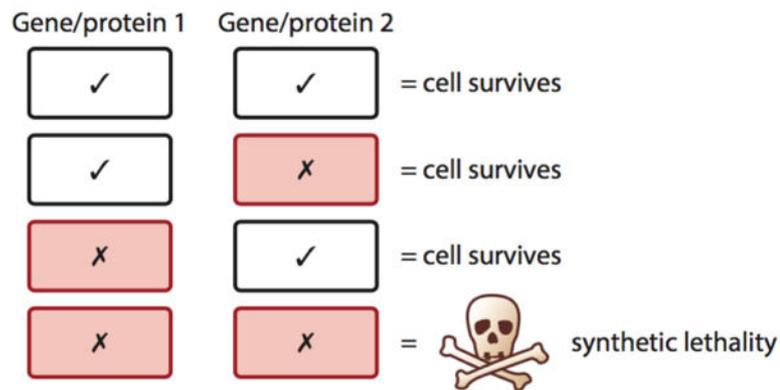
Une étude *in vitro* récente confirme ces données cliniques pour le CS. Elle compare l'efficacité de la radiothérapie par rayons X à celle par ions carbone sur cinq lignées de CS : CH2879, SW1353, JJ012, FS090, 105KC (Girard et al., 2020). Les auteurs montrent que les lignées ont des sensibilités différentes aux 2 types de radiation et que les ions carbone sont plus efficaces que les rayons X. En effet, la dose requise, calculée par comptage cellulaire, pour réduire la survie de 10% (D10) est comprise entre 3,4 et 8 Gy pour les rayons X selon les lignées. Elle est comprise entre 1,3 et 3 Gy pour les ions carbone (Girard et al., 2020).

Entre 1983 et 2009, le Massachusetts General Hospital (Boston, USA) a traité 55 patients atteints d'OS non résécables ou incomplètement réséqués par protonthérapie associée ou non à une radiothérapie par photons (Ciernik et al., 2011). La dose moyenne délivrée était de  $68,4 \pm 5,5$  Gy dont 58,2% délivrée par des photons. À cinq ans, le taux de survie global était de 67%, dont 65% sans récurrence. Cette étude démontre donc le potentiel curatif de ce type de traitement. Une autre étude rétrospective a été réalisée sur une cohorte de 78 patients atteints d'OS inopérables du tronc traités par thérapie par ions carbone à Chiba, au Japon entre 1996 et 2009. La dose médiane délivrée était de 70,4 Gy en 16 fractions sur 4 semaines. Le contrôle local était de 88 % à 5 ans pour des tumeurs inférieures à 500 cm<sup>3</sup>, tandis que ce résultat chute à 31 % pour les patients présentant une taille de tumeur supérieure à 500 cm<sup>3</sup>. Le taux de survie global à 5 ans était de 33%, et était aussi meilleur (46%) si la tumeur était inférieure à 500 cm<sup>3</sup> (Matsunobu et al., 2012).

## 2. Létalité synthétique

La létalité synthétique est la mort cellulaire due à la déficience simultanée de 2 gènes ou plusieurs gènes (**Figure 27**). Le fonctionnement d'un seul des deux gènes permet de maintenir la viabilité cellulaire, mais pas dans le cas du dysfonctionnement des 2 gènes (Lord et al., 2015; O'Neil et al., 2017).

Parmi les gènes ciblés, les inhibiteurs de la PARP ont montré leur efficacité dans le traitement de certaines tumeurs par létalité synthétique et sont utilisés dans de nombreux essais cliniques (Lord et al., 2015; Murata et al., 2016). L'utilisation de l'olaparib (AZD2281) est par exemple approuvée par la FDA (« Food and Drugs Administration » ou agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) et la commission européenne dans le traitement de cancers ovariens avec une mutation de BRCA (« Breast Cancer »). La **figure 27** illustre le concept de létalité synthétique entre les gènes *BRCA* et *PARP*.



**Figure 27 : Concept de létalité synthétique.** La létalité synthétique se produit lorsqu'une combinaison de défauts de gènes/protéines entraîne la mort cellulaire (d'après Lord et al., 2015).

Dans le CS, une équipe s'est intéressée à la mortalité synthétique en étudiant deux gènes : *PARP* et *IDH1/2* (Venneker et al., 2019). Ce dernier gène est muté dans 59 % des CS environ et la mutation produit un oncométabolite : le 2-HG comme vu précédemment. De nombreuses études se sont intéressées à la létalité synthétique des cancers comportant une mutation *IDH*. La plupart des études ont été réalisées sur la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et le gliome. Plusieurs composés induisent des létalités synthétiques avec les mutations *IDH*, tels les agents qui induisent des dommages à l'ADN ou ciblent les membres de la famille Bcl-2, la « nicotinamide phosphoribosyltransférase 1 » (NAMPT), la glutaminase, la PARP et la « DNA (cytosine-5)-Méthytransférase 1 » (DNMT1). Dans leur étude, Venneker et al. (2019) ont utilisé le talazoparib, un inhibiteur de PARP, avec des lignées cellulaires de CS possédant ou non des mutations *IDH*. Les résultats ont montré que la sensibilité au talazoparib était variable et indépendante du statut muté ou non d'*IDH*. Le talazoparib sensibilise les lignées de CS au témozolomide (agent chimiothérapeutique) et aux radiations- $\gamma$ , ceci indépendamment du statut de mutation *IDH*. Ils n'ont donc pas démontré de létalité synthétique entre les mutations *IDH* et un inhibiteur de PARP chez le CS, comme cela a été décrit dans la LMA et le gliome. Ils ont tout de même démontré le potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de PARP dans les traitements des CS.

### 3. L'immunothérapie

Le système immunitaire ralentit la progression de la tumeur, mais facilite aussi la croissance tumorale *via* l'émergence de sous-populations cancéreuses capables d'échapper au système immunitaire, ou avec des capacités immunosuppressives et migratoires. Le défi de

l'immunothérapie cancéreuse est donc de rééduquer ou de réactiver le système immunitaire pour cibler les cellules cancéreuses qui échappent à son contrôle.

L'utilisation de l'immunothérapie a été délaissée pendant de nombreuses années. Cette approche a été éclipsée par les résultats qu'apportait la chimiothérapie, en particulier pour les OS. Les avancées et découvertes dans le domaine de l'immunothérapie ainsi que l'existence de sarcomes osseux ne répondant pas aux traitements conventionnels a permis d'explorer de nouveau cette approche thérapeutique. La compréhension des mécanismes moléculaires de l'immunité innée et acquise a permis de développer diverses immunothérapies anticancéreuses, telles que des vaccins, des anticorps, des adjuvants et des thérapies cellulaires.

a. *Ciblage des macrophages associés aux tumeurs*

Comme déjà décrit (paragraphe B-IV-2), les macrophages et les lymphocytes T sont les deux principales populations cellulaires dans le paysage immunitaire des OS (Inagaki et al., 2016). Les TAM sont des effecteurs immunitaires très hétérogènes, capables de moduler étroitement la réponse immunitaire locale et par conséquent la mort/survie des cellules tumorales. Ils ont un impact sur la progression de la tumeur et le processus métastatique en agissant sur l'angiogenèse.

Le **mifurtamide** (L-MTP-PE ou muramyl tripeptide phosphatidyl éthanolamine encapsulé dans un liposome) est un analogue synthétique de la paroi bactérienne. Il est capable d'activer les macrophages entre autres. Le mifamurtide se lie aux récepteurs TLR4 exprimés sur la membrane cellulaire des phagocytes mononucléaires. La transduction de signaux intracellulaires entraîne une réaction inflammatoire (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires), le recrutement de cellules dendritiques, la polarisation du lymphocyte T auxiliaire et des effets toxiques sur les cellules tumorales (Heymann et al., 2020). Le mifamurtide a été évalué en monothérapie et en combinaison avec la chimiothérapie (Meyers et al., 2008). Les résultats de l'essai de phase III Intergroupe-INT0133 pour l'OS non métastatique ont montré une amélioration de la survie globale de 70% à 78%, lorsque le mifamurtide était combiné à la chimiothérapie. Cependant, ces effets prometteurs en terme de survie n'ont pas été confirmés un an plus tard (Chou et al., 2009). Un essai clinique de phase II randomisé (Sarcome-13/OS2016, NCT03643133) a donc été récemment mis en place (phase de recrutement). Il prévoit de comparer l'efficacité du mifamurtide associé à la chimiothérapie post-opératoire, par rapport à la chimiothérapie post-opératoire utilisée seule, dans le traitement de première ligne d'OS initialement diagnostiqués à haut risque.

La **trabectédine** est un agent antitumoral d'origine marine. C'est un intercalant de l'ADN qui bloque le cycle cellulaire et interfère avec la transcription de façon sélective. A une concentration non cytotoxique, il inhibe la différenciation des monocytes en macrophages *in vitro* (Allavena et al., 2005). Il a des effets cytotoxiques à des concentrations pharmacologiques sur les monocytes et les TAM isolés de patients avec des tumeurs ovariennes, alors que les lymphocytes sont 5 fois moins sensibles. Il diminue aussi la production de médiateurs de l'inflammation par les monocytes, les macrophages, les TAM et les cellules tumorales ovariennes *in vitro*. Dans l'étude "TOMAS" (NCT02398058), un essai clinique de phase Ib, la combinaison de l'olaparib, un inhibiteur de la PARP, et de la trabectédine a été évaluée chez des patients atteints de sarcomes osseux et des tissus mous. Malgré une activité antitumorale encourageante avec une toxicité gérable chez certains sous-types de sarcomes des tissus mous, aucune réponse objective ou clinique n'a été observée chez les 11 patients avec des sarcomes osseux (Grignani et al., 2018). La plupart des études précliniques (modèles de xénogreffe d'OS provenant de patients) décrivent le bénéfice thérapeutique de la trabectédine (Higuchi et al., 2019; Igarashi et al., 2017), mais les essais cliniques n'ont confirmé aucune de ces observations en terme de survie globale (Heymann et al., 2020). La grande hétérogénéité des cellules de sarcomes osseux et le statut immunitaire des tumeurs accentuent la complexité du ciblage spécifique des populations de cellules immunitaires pour chaque patient. Il pourrait être nécessaire par exemple de caractériser les proportions de TAM-M1 et -M2 pour chaque patient traité par le mifurtamide.

Concernant le CS, un essai clinique de phase II est prévu pour explorer l'effet de la trabectédine dans une population de patients de plus de 16 ans atteints de CS mésoenchymateux à un stade avancé (NCT04305548). A notre connaissance, il n'existe aucun essai clinique avec le mifurtamide.

### *b. Les cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques sont dédiées à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T naïfs afin de stimuler leur différenciation en lymphocytes tueurs. Ils peuvent aussi activer des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ayant des fonctions anti-tumorales marquées (Heymann et al., 2020). Des vaccins à base de cellules dendritiques ont été proposées pour contourner le processus tumoral d'échappement à la surveillance du système immunitaire et stimuler la réponse antitumorale impliquant les cellules dendritiques. Les résultats précliniques ont montré des résultats

prometteurs (Fang et al., 2015; Li et al., 2019c), mais les investigations cliniques n'ont pas confirmé ces résultats (Heymann et al., 2020).

A titre d'exemple, une étude a publié les résultats d'un essai clinique de phase I/II (NCT non communiquée, essai réalisé entre 2008 et 2014) analysant le bénéfice thérapeutique de la vaccination avec des cellules dendritiques autologues sur 37 patients atteints de sarcomes avancés des tissus mous et osseux (14 OS et 3 CS) (Miwa et al., 2017). Les cellules dendritiques ont été pulsées avec les lysats tumoraux autologues. La réponse évaluée 8 semaines après la première injection sur 35 patients a mis en évidence 1 patient avec une réponse partielle, 6 patients avec une maladie stable et 28 patients (80%) avec une progression tumorale qui a nécessité des traitements additionnels (chimiothérapie, chirurgie ou radiothérapie). Le taux de survie global à 3 ans était de 42,3% pour l'ensemble de la cohorte après la mise en place des différentes thérapies.

### *c. Infiltration lymphocytaire*

L'infiltration lymphocytaire est modérée dans les sarcomes osseux (moins de 10% des cellules). Dans les CS, les lymphocytes infiltrés sont détectables et corrént avec l'expression de PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1) qui est fortement exprimé dans les CS dédifférenciés (Heymann et al., 2020; Kostine et al., 2016). Dans les OS, la diminution du ratio lymphocytes T-CD8+ par rapport aux lymphocytes T régulateurs est associée à une diminution de la survie. Les essais cliniques finalisés (NCT00923351, NCT00001566) ou actifs (NCT01803152) incluent à la fois plusieurs types de sarcomes osseux, des sarcomes des tissus mous et d'autres types de tumeurs. Il est donc difficile d'en extraire les données spécifiques aux OS et CS.

Une étude clinique de phase II non-randomisé (NCT03449108) aux USA recrute actuellement des patients atteints de sarcomes osseux, entre autres, pour évaluer l'efficacité et l'innocuité des lymphocytes autologues LN-145/LN-145-S1 (nomenclature selon le procédé de sélection) infiltrants les tumeurs.

Les lymphocytes « Natural Killer » (NK) appartiennent au système immunitaire inné. Ils jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire contre les cellules tumorales et les cellules infectées par un virus, indépendamment de toute sensibilisation antigénique préalable. Les essais cliniques d'immunothérapie basée sur les cellules NK sont nombreux (>95), mais peu concernent les sarcomes osseux (<5). D'après notre analyse, uniquement 2 essais actifs (NCT02100891 et NCT01807468) incluent les OS et aucun essai n'inclue le CS.

#### *d. Les lymphocytes génétiquement modifiés*

D'autres stratégies comme l'utilisation des **CAR-T** (« Chimeric Antigen Receptor T Cell ») fait l'objet de recherches et pourraient être utilisées dans le futur pour le traitement des sarcomes osseux (Folkert et al., 2019). Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T du patient génétiquement modifiés pour reconnaître des antigènes associés à la tumeur. La thérapie cellulaire CAR-T est associée à plusieurs effets indésirables, notamment le syndrome de libération de cytokines, qui est causé par des réponses intensives à l'élimination des cellules tumorales par l'intermédiaire de lymphocyte T activés (Magee and Snook, 2014). Les lymphocytes peuvent également attaquer par la suite les tissus non tumoraux.

Plus de 200 essais cliniques sont référencés avec les CAR-T en cancérologie, dont une cinquantaine pour les tumeurs solides. Au moins 9 incluent ou prévoient d'inclure des OS, mais pas des CS. Quatre essais (essai NCT02107963 finalisé, essai 03635632 en recrutement, essais NCT04539366 et NCT01953900 prévisionnels) ciblent GD2, un disialoganglioside fortement exprimé dans de nombreuses tumeurs dont l'expression est limitée dans les tissus normaux. Le premier essai de phase I anti-GD2 finalisé a évalué des doses croissantes de CAR-T-GD2 après lymphodéplétion à base de cyclophosphamide chez des patients (1 à 35 ans) atteints de tumeurs solides GD2+ (OS, neuroblastome et mélanome en particulier). Les résultats ne semblent pas publiés.

Un essai clinique de phase I/II non-randomisé (NCT00902044 à Houston, USA) a été mené sur 19 patients avec des tumeurs exprimant HER2 (« Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 »). Seize patients étaient atteints d'OS récidivants ou réfractaires et un patient atteint d'un sarcome d'Ewing. Les patients ont reçu une ou plusieurs doses de cellules CAR-T ciblant HER2 (Ahmed et al., 2015). Aucun signe de toxicité évidente n'a été signalé. La maladie a été stable pendant 12 à 14 mois pour 4 patients sur 17 patients évaluables. Trois des patients ont eu une régression tumorale, dont une avec plus de 90% de nécrose démontrant une activité anti-tumorale des CAR-T. Cependant, la survie globale des 19 patients n'a été que de 10,3 mois.

Dans une étude non randomisée de phase I (NCT03618381, en phase de recrutement, Seattle aux États-Unis), 36 patients jeunes avec des tumeurs solides réfractaires ou récidivantes seront recrutés pour évaluer l'effet de CAR-T ciblant l'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor ») associés ou non à des CAR-T ciblant le CD19 (marqueur de surface des lymphocytes T).

Enfin, la sécurité et l'efficacité de la quatrième génération de CAR-T (4SCAR-Ig T-cells) ciblant des antigènes de surface des cellules de sarcomes a été initiée en 2017 dans un essai de phase I/II (NCT03356782) à Shenzhen en Chine. Il est prévu d'y inclure 20 participants avec des sarcomes (OS et sarcomes d'Ewing) en rechute ou en phase tardive.

*e. La thérapie à base de cytokines*

La thérapie à base de cytokines a été utilisée dans l'immunothérapie des sarcomes. Parmi les cytokines utilisées, l'IL-2 et les interférons (IFN), ont montré des résultats cliniques (Lee and Margolin, 2011). Toutefois, le challenge à relever est d'obtenir à la fois une réponse immunitaire soutenue et de limiter la toxicité des cytokines. Les essais cliniques répertoriés ne ciblent pas les CS mais plutôt les OS.

Une équipe a rapporté des résultats cliniques positifs en utilisant un traitement à haute dose d'IL-2 chez 10 enfants avec des tumeurs solides en progression ou métastatiques (Schwinger et al., 2005). Parmi les 4 enfants avec des OS (protocole COSS 96), 2 ont présenté une rémission complète. La maladie a évolué pour les 2 autres avec un patient qui n'a pas du tout répondu à la thérapie. Des effets indésirables étaient présents chez l'ensemble des patients (fièvre, douleurs osseuses et musculaires, maux de tête, toxicité gastro-intestinale et cardiaque). D'après notre recherche, les essais cliniques à base de cytokines qui incluent des OS associent plutôt les traitements par l'IL-2 avec d'autres thérapies. L'IL-2 est utilisée dans plusieurs essais cliniques avec des vaccinations. L'essai NCT02173093 (en recrutement) associe des anticorps anti-GD2, l'IL-2 et le GM-CSF (« Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor ») par exemple.

Dans l'essai clinique NCT00134030, randomisé de phase III, l'efficacité de la chimiothérapie combinatoire (méthotrexate, doxorubicine et cisplatine) associée ou non avec un traitement par IFN- $\alpha$ -2b a été analysée pour le traitement des OS (Bielack et al., 2015). Le taux de survie global à 3 ans des 716 patients était de 76% et n'était statistiquement pas différent dans le groupe chimiothérapie seule et dans le groupe chimiothérapie plus IFN. A noter que 2/3 des patients du groupe IFN n'ont jamais commencé la thérapie avec l'IFN ou l'ont stoppé prématurément du fait d'effets toxiques indésirables.

## *f.                    Blocage des points de contrôle immunitaire*

De multiples molécules co-inhibitrices contrôlent les communications entre les cellules cancéreuses et les acteurs du système immunitaire. Ces protagonistes, appelés "points de contrôle immunitaire", comprennent des molécules stimulantes (CD27, CD28, etc.) et inhibitrices (B7-H3, CTLA-4 (« Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 »)) (Heymann et al., 2020). De tels points de contrôle sont présents dans les sarcomes osseux afin d'échapper à la surveillance immunitaire. L'OS et le CS expriment ainsi PD-L1/PD-L2 (Yang et al., 2018; Zheng et al., 2018) et B7-H3 (CD-276) (Yin et al., 2015) entre autres. Malgré des travaux précliniques prometteurs, les études cliniques sur les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires dans les CS restent éparses. Les essais cliniques sont plus nombreux pour les OS et sont en progression. Les effets secondaires graves des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires signalés comprennent la colite (11 %), l'arthralgie (7 %) et les éruptions cutanées (25 %) (Larkin et al., 2015).

Nous nous focaliserons sur le blocage du point de contrôle PD-1/PD-L1 qui semble le plus référencé dans les sarcomes osseux. PD-1 est un récepteur de surface exprimé sur les lymphocytes CD8+ activés, les lymphocytes B et NK (Monga et al., 2020). La liaison à son ligand (PD-L1 ou PD-L2) inhibe l'activation, la sécrétion de cytokines et l'activité lytique des cellules immunitaires. Le blocage de la voie PD-1 a eu des effets favorables dans des cancers comme les mélanomes, des cancers du poumon non à petites cellules et des cancers génito-urinaires (Monga et al., 2020). Environ 41 % des CS dédifférenciés expriment le ligand PDL-1 (Kostine et al., 2016).

Dans l'essai clinique de phase II SARC028 non randomisé (NCT02301039), des chercheurs ont évalué l'effet d'un anticorps bloquant anti-PD1 (**pembrolizumab**) chez des patients souffrant de sarcomes des tissus mous ou des os. Seuls 5% des patients ont eu une réponse objective (1 sur 22 OS, 1 sur 5 CS, et aucun sarcome d'Ewing sur 13) (Tawbi et al., 2017). Dans l'étude PEMBROSARC (essai NCT02406781 de phase II non randomisé, de 2015 à 2017), le pembrolizumab en combinaison avec le cyclophosphamide à dose métronomique a été administré chez des patients atteints d'OS avancés. Sur 15 patients évaluables, 4 patients ont présenté une réduction de la taille de la tumeur, entraînant une réponse partielle chez un patient (6,7%). Le taux de non-progression à 6 mois était de 13,3% (Le Cesne et al., 2019). Les auteurs concluent à une activité limitée de l'inhibition de PD-1 dans l'OS.

Une étude rétrospective a été réalisée sur 28 patients (24 sarcomes des tissus mous et 4 sarcomes osseux) traités avec un anticorps bloquant anti-PD1, le **nivolumab** (Paoluzzi et al., 2016). Huit patients ont été traités en parallèle avec du pazopanib, un inhibiteur de récepteur tyrosine kinase. Un bénéfice clinique en termes de réponse et de stabilité a été observé chez la moitié des patients évaluable. Le seul patient traité pour un CS dédifférencié a présenté une réponse partielle. Sur les 3 patients atteints d'un OS, 1 a montré une progression de la tumeur, 1 a eu une réponse partielle (traité aussi avec du pazopanib), et 1 était stabilisé.

Le **toripalimab**, un anticorps humanisé recombinant anti-PD-1, qui a reçu une autorisation conditionnelle pour le traitement du mélanome métastatique non résectable en Chine, est actuellement évalué dans un essai de phase I non-randomisé sur plusieurs types de tumeurs, dont le CS (NCT03474640).

#### 4. Les thérapies ciblées

##### a. Les inhibiteurs des IDH

Comme décrit précédemment (chapitre A-III-2), des mutations hétérozygotes des gènes IDH1 et IDH2 sont fréquemment rencontrées dans les CS centraux, dédifférenciés, périostaux et intra-crâniens (Amary et al., 2011). Ces mutations conduisent à une accumulation de l'oncométabolite 2-HG entraînant des hyperméthylations des histones et de l'ADN (Dang et al., 2009). L'absence de mutation IDH apporterait un bénéfice en termes de survie globale pour les CS (93% à 5 ans sans mutation, contre 64% avec mutation) (Monga et al., 2020). L'inhibition des IDH pourrait donc apporter un bénéfice thérapeutique pour les CS à mutation IDH. Pour les OS, nous n'avons référencé qu'un seul essai clinique (NCT04195555, en recrutement) incluant l'utilisation d'un inhibiteur d'IDH1 (ivosidénib) pour le traitement des OS pédiatriques récurrents ou réfractaires à mutation IDH1.

Concernant les données précliniques sur le CS, l'inhibiteur d'IDH1 **AGI-5981** a été utilisé pour traiter deux lignées mutées pour IDH, JJ012 (CS) et HT1080 (fibrosarcome), et une lignée de chondrocytes C28 sauvage pour IDH (Li et al., 2015b). AGI-5198 a diminué les niveaux de 2-HG et a inhibé la formation et la migration des colonies tumorales, induisant l'apoptose dans les cellules de CS et de fibrosarcome mutées. Une autre étude (Suijker et al., 2015) utilisant les lignées de CS mutées IDH JJ012, L835, SW1353 et L2975, traitées avec AGI-5981, a entraîné une diminution des niveaux de 2-HG, mais les propriétés tumorigènes n'ont pas été affectées, contrairement aux travaux précliniques précédents.

Concernant les études cliniques, **AG-120 ou ivosidénib** est un inhibiteur oral de l'IDH1 mutée, approuvé par la FDA pour le traitement de leucémies myéloïdes aiguës spécifiques. C'est le premier de sa catégorie à avoir été utilisé pour les CS. Une étude multicentrique ouverte de phase I d'escalade et d'expansion de doses d'ivosidénib en monothérapie a recruté des patients atteints de tumeurs solides avancées mutantes IDH1, y compris le gliome et le CS (NCT02073994, Etats-Unis). Concernant les 21 patients atteints de CS, l'ivosidénib a été bien toléré (Tap et al., 2020). Le taux de survie à six mois était de 39,5 % et la durée médiane de survie sans progression était de 5,6 mois. Les taux plasmatiques de 2-HG ont diminué considérablement chez tous les patients, pour atteindre des niveaux observés chez des individus en bonne santé. Un autre essai clinique de phase II, spécifique aux CS à mutation IDH1, traités par l'ivosidénib est en phase de recrutement (NCT04278781, Etats-Unis). D'autres inhibiteurs d'IDH1 sont en cours d'évaluation. L'essai clinique de phase I/II non randomisé NCT03684811 évalue actuellement la sécurité et l'efficacité d'un autre inhibiteur oral d'IDH1, le FT-2102. Il est testé d'abord en monothérapie puis associé avec d'autres agents anti-cancéreux dans 4 cohortes de patients avec des tumeurs solides avancées à mutations IDH1 (gliomes, CS, tumeurs hépatobiliaires, cholangiocarcinomes intrahépatiques). L'essai de phase I NCT04521686 (en recrutement) évaluera la tolérabilité et l'efficacité du LY3410738, un inhibiteur puissant, sélectif et covalent d'IDH1-R132, dans les mêmes types de tumeurs.

La sécurité, la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et l'activité clinique de l'**AG-221 ou énasidénib**, un inhibiteur spécifique d'IDH2-R140, ont été évaluées dans l'essai clinique multicentrique de phase I/II NCT02273739 incluant des CS. Bien que cet essai soit achevé depuis plus de 3 ans, les résultats ne sont pas encore accessibles.

### *b. Les inhibiteurs de l'angiogenèse*

La néovascularisation pathologique est présente dans les CS et les OS. Elle est associée à des manifestations cliniques agressives avec une incidence plus élevée de métastases. Plusieurs médicaments anti-angiogéniques sous forme d'inhibiteurs de tyrosine kinases et d'anticorps monoclonaux humanisés, ciblant la liaison au VEGF ou les récepteurs du VEGF, ont été approuvés pour une utilisation clinique anticancéreuse (Monga et al., 2020). Ils pourraient aussi avoir un potentiel intéressant pour le traitement des OS et des CS.

Le **pazopanib** est un inhibiteur de tyrosine kinase administré par voie orale inhibant la voie du VEGF. Le pazopanib en monothérapie a été évalué dans un essai multicentrique de phase II (NCT01330966, entre 2011 et 2015) chez 47 patients atteints de CS conventionnels

non résecables et métastatiques. Pour les 42 patients évaluables, la survie globale médiane était de 17,6 mois et la survie sans progression de 7,9 mois (Chow et al., 2020). Ces résultats sont significatifs selon les auteurs et prouvent l'efficacité du pazapanib dans le traitement des CS. De l'hypertension (26%) et de la toxicité hépatique (9%) ont toutefois été relevés.

**Le régorafénib** est un autre inhibiteur de tyrosine kinases ciblant l'angiogenèse tumorale. Il a démontré une activité chez les patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales prétraitées et de carcinomes colorectaux et hépatocellulaires (Duffaud et al., 2019). Un essai clinique de phase II randomisé, en double aveugle et contrôlé par placebo (NCT02389244, REGOBONE, entre 2014 et 2017 en France) a inclus quatre cohortes indépendantes parallèles (OS, sarcome d'Ewing, CS et chordome) pour étudier l'efficacité du régorafénib en monothérapie. Les résultats de la cohorte d'OS ont montré que 65% des patients traités par le régorafénib présentaient une maladie stable à huit semaines, contre 0% dans le groupe placebo (Duffaud et al., 2019). 24% des patients ont présenté des effets indésirables liés au traitement mais pas de décès. Les résultats de la cohorte des CS ne sont pas encore disponibles à notre connaissance.

De nombreuses études cliniques ont testé ou testent des stratégies anti-angiogéniques sur les tumeurs solides réfractaires dont l'OS, avec d'autres inhibiteurs kinasiques plus ou moins sélectifs, tels le **cédiranib** (inhibiteur de récepteurs à tyrosine kinase), le **géfitinib** (inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase de l'EGFR) et le **sorafénib** (inhibiteur multikinases). Des stratégies avec des anticorps monoclonaux anti-VEGF (**bévacizumab** par exemple), ou anti-récepteur à l'EGF (**ramucirumab**) sont aussi évalués en association avec la chimiothérapie. A titre d'exemple, des chercheurs ont mené un essai de phase II non randomisé pour évaluer la faisabilité d'associer le **bévacizumab** à une chimiothérapie combinatoire (méthotrexate, doxorubicine et cisplatine) chez les patients atteints d'OS localisés (NCT00667342). Le taux de survie sans événement et le taux de survie globale à 4 ans étaient de  $57,5\% \pm 10,0\%$  et de  $83,4\% \pm 7,8\%$ , respectivement. Huit des 29 patients évaluables (soit 28%), ont eu une bonne réponse histologique (<5% de tumeur viable). Des complications de plaies fréquentes ont été rencontrées (Navid et al., 2017). Les auteurs concluent que l'ajout de bévacizumab à la chimiothérapie combinatoire pour l'OS localisé est possible, mais que la réponse histologique et le taux de survie sans événement observé ne justifient pas une évaluation plus approfondie du bévacizumab dans l'OS.

c. Les inhibiteurs des Kinases Dépendantes des Cyclines  
(CDK)

Les CDK appartiennent à une famille de sérine/thréonine kinases qui jouent un rôle crucial dans la prolifération et la croissance des cellules tumorales en contrôlant le cycle cellulaire, la transcription et l'épissage des ARN. Leur implication dans la tumorigenèse des OS et des CS a largement été démontrée (Liao et al., 2016). De plus, le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de CDK (dinaciclib et palbociclib par exemple), semble prometteur pour les OS et les CS *in vitro* (Fu et al., 2011; Ouyang et al., 2019; Zhou et al., 2018).

De nombreux inhibiteurs de CDK ont été évalués dans les sarcomes (Liao et al., 2016). Ils ciblent plus ou moins spécifiquement CDK1 (pirarubicine, SCH727965 ou dinaciclib, et AZ703), CDK2 (séliciclib, flavopiridol, MLN4924, dinaciclib, BMS-387032, et AZ703), CDK4/CDK6 (LEE011 ou ribociclib, palbociclib, LY2835219 ou pabémaciclib), CDK5 (roscovitine et dinaciclib), CDK7 (BMS-387032) et CDK9 (AZ703, flavopiridol, séliciclib, dinaciclib et BMS-387032). Ils ont été ou sont actuellement testés en études précliniques ou en essais cliniques. Il est à noter que la plupart de ces inhibiteurs de CDK ont été initialement utilisés comme agents uniques, mais la tendance a évolué vers leur utilisation en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques.

L'inhibiteur sélectif de CDK4/6 **palbociclib** est utilisé pour le traitement de cancers du sein métastatiques en France, mais il est non remboursé au vu de son intérêt clinique jugé insuffisant par la Haute Autorité de Santé. Au moins 3 essais cliniques en phase de recrutement testent son efficacité, lorsqu'il est associé ou non à une autre chimiothérapie, dans les tumeurs solides Rb+ incluant des OS (NCT03526250), dans le sarcome d'Ewing (NCT04129151) et dans des tumeurs solides réfractaires (NCT0709680).

**L'abémaciclib (LY2835219)**, un autre inhibiteur sélectif de CDK4/6, utilisé en monothérapie qui est évalué actuellement dans le cadre d'un essai clinique de phase II (NCT04040205, randomisation non précisée, en phase de recrutement) pour les sarcomes avancés des tissus mous et des os (OS et CS). Un autre essai clinique répertorié concerne son utilisation en monothérapie dans des tumeurs solides réfractaires (incluant l'OS) chez l'enfant (NCT02644460, phase I, non randomisé, en recrutement). Il est aussi testé en chimiothérapie combinatoire pour les tumeurs solides réfractaires ou en rechute (NCT04238819, phase I, non randomisé, en recrutement).

*d. Les Inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase*

Parmi les inhibiteurs des tyrosines kinases utilisés dans des essais cliniques, **l'imatinib** est un inhibiteur de BCR-ABL (« Breakpoint Cluster Region/Abelson »), ainsi que de plusieurs récepteurs tyrosine kinases : c-KIT (récepteur du « Stem Cell Factor »), CSF-1R (récepteur du « Colony Stimulating Factor ») et les récepteurs PDGFR- $\alpha/\beta$ . Le **dasatinib** quant à lui inhibe entre autres l'activité de BCR-ABL, des kinases de la famille SRC, de c-KIT, et du PDGFR- $\beta$ .

Des essais cliniques de phase II avec ces deux inhibiteurs n'ont pas réussi à démontrer d'efficacité clinique significative, même si les études précliniques semblaient prometteuses (Monga et al., 2020). Dans l'analyse faite par Grignani et al. sur 26 patients avec des CS positifs au PDGFR traités avec l'imatinib, il n'y a pas eu de réponse objective, avec une survie médiane globale de seulement 11 mois (Grignani et al., 2011) (référence européenne de l'essai : 2006-006446-33). Dans l'essai NCT00464620), 109 patients avec des sarcomes ou des tumeurs fibreuses solitaires ont été traités avec le dasatinib. Le taux de survie à 2 ans et à 5 ans était de 44% et 13% respectivement pour l'ensemble des patients (Schuetze et al., 2017). Le dasatinib n'a pas modifié la croissance tumorale à 6 mois pour plus de 50% des patients. Une réponse objective a été mise en évidence chez seulement 18% des patients avec des CS ou des chordomes.

La voie de signalisation de l'IGF a un rôle important dans le développement des tumeurs osseuses, en particulier l'OS et le sarcome d'Ewing. La liaison de l'IGF à son récepteur IGF-IR (tyrosine kinase) active des voies de survie comme PI3K/Akt/mTOR. Les données précliniques utilisant des inhibiteurs de l'IGF-R1 dans des modèles de xénogreffes de sarcomes pédiatriques, associées à des réponses chez des adultes atteints de sarcome d'Ewing, ont suscité un grand enthousiasme quant au potentiel clinique de cette classe de médicaments (Heymann and Rédini, 2013). Cela a donc conduit au développement rapide de nombreux essais cliniques.

Dans l'essai multicentrique NCT00617890, **l'anticorps monoclonal anti-IGF-IR, Robatumumab** (SCH717454), a été testé chez 3 groupes de patients jeunes : le groupe 1 présentait des métastases d'OS réséquées après la première dose de robatumumab, le groupe 2 présentait des métastases d'OS non résécables, et le groupe 3 incluait des patients avec un sarcome d'Ewing réfractaire ou en récurrence. Seulement 3 des 31 patients du groupe 1 ont présenté une réponse face au traitement, contre 0 des 29 patients du groupe 2. Six réponses partielles, 23 réponses stables et 55 tumeurs en progression sur 84 patients évaluable ont été

observées dans le groupe 3 (Anderson et al., 2016). La survie médiane globale du groupe 1 après intervention chirurgicale était de 18 à 22 mois selon la dose de robatumumab, de 8 mois pour le groupe 2 et de 7 mois pour le groupe 3. La stabilisation de la maladie a été observée uniquement pour le sarcome d'Ewing (6 patients avec des rémissions durables supérieures à 4 ans), comme cela a pu être observé avec différents anticorps anti-IGF-RI (Heymann and Rédini, 2013). Anderson et al. suggèrent la présence de cellules souches cancéreuses dans la population d'OS métastasés qui permettrait d'échapper rapidement à l'inhibition de l'IGF-RI et qui nécessiterait d'autres traitements pour obtenir des rémissions.

*e. Les Inhibiteurs de la voie de signalisation mTOR*

La voie de signalisation mTOR joue un rôle important dans la chimiorésistance des OS et des CS. L'inhibition de cette voie a donc beaucoup été étudiée, en particulier avec la **rapamycine ou sirolimus**, l'un des inhibiteurs les plus connus de la sérine/thréonine kinase mTOR. Les effets anticancéreux de la rapamycine ont été démontrés dans des cancers variés (de la tête et du cou, des cancers gastriques, des lymphomes et des neuroblastomes). Les données pré-cliniques confirment aussi son activité sur les CS et les OS, avec une inhibition de la croissance de lignées cellulaires *in vitro* et de la croissance de modèles de xénogreffes *in vivo* (Song et al., 2016; Zhao et al., 2015). Le **BEZ235 ou dactolizib**, un double inhibiteur de la PI3K et de mTOR, a inhibé la croissance de 5 lignées de CS *in vitro* (sans induire d'apoptose) et avec un effet accru par rapport à la rapamycine (Zhang et al., 2013b). Il a également inhibé la croissance tumorale de xénogreffes de cellules de la lignée de CS JJ012. La doxorubicine n'a pas eu d'effet sur la croissance tumorale d'allogreffes orthotopiques chez le rat (modèle « Schwarm rat chondrosarcoma »), alors que l'**évérolimus**, un inhibiteur sélectif de mTOR, a inhibé la progression tumorale (Perez et al., 2012). Dans cette étude, il n'y a pas eu d'effet synergique entre la doxorubicine et l'évérolimus.

De nombreux inhibiteurs sélectifs de mTOR font l'objet d'essais cliniques : **sirolimus, temsirolimus, évérolimus, ridaforolimus...** (Heymann and Rédini, 2013). Dans la phase I de leur étude clinique, Fouladi et al. n'ont rapporté aucune réponse objective chez 18 patients pédiatriques avec des tumeurs solides réfractaires traités par l'**évérolimus** (Fouladi et al., 2007). Une maladie stabilisée a été observée chez un patient avec un OS. Une étude de phase II non randomisée (NCT01216826) sur l'évérolimus chez les enfants et les adolescents atteints d'un OS réfractaire ou récidivant est en cours au Brésil.

La tendance est d'associer les inhibiteurs de mTOR avec d'autres thérapies (chimiothérapie, anticorps anti-IGF-IR). Les essais cliniques suggèrent que les inhibiteurs de mTOR, en combinaison avec la chimiothérapie, peuvent stabiliser la maladie, mais il convient d'examiner attentivement les effets secondaires. Ainsi, dans une étude rétrospective, le **sirolimus** en association avec le cyclophosphamide, a été administré à 10 patients atteints de CS non résécables ou métastatiques entre 2007 et 2012 (Bernstein-Molho et al., 2012). Une réponse objective a été observée chez 1 patient et une stabilisation de la maladie pendant au moins 6 mois a été observée chez 6 patients. La survie médiane sans progression était de 13,4 mois. Des effets indésirables ont été observés et traités de façon symptomatique : lymphopénie (4 patients), asthénie (7 patients), anémie (6 patients), nausées (6 patients), stomatite (5 patients) et éruptions cutanées (5 patients).

Le **temsirolimus** en association avec la doxorubicine liposomale a été administré chez des patients atteints de sarcomes récidivants (dont 2 CS et 1 OS) (NCT00949325). La réponse de 15 patients a été évaluée dans la phase II de l'étude (Trucco et al., 2018). La survie médiane sans progression était de 315 jours (10,3 mois) et le taux de réponse pour une maladie stable à 60 jours ou plus était de 53%. Les auteurs indiquent que les durées de survie sans progression sont plus longues qu'avec des monothérapies à base de doxorubicine liposomale ou d'autres chimiothérapies, et que ces durées sont équivalentes à celles d'autres thérapies combinatoires avec des inhibiteurs de mTOR. La thérapie était par ailleurs bien tolérée.

#### *f. Les inhibiteurs de la voie de signalisation Hedgehog*

Comme nous l'avons vu précédemment, la voie de signalisation PTHrP/IHH joue un rôle crucial dans la différenciation des chondrocytes et des données suggèrent que la signalisation constitutive d'IHH joue un rôle clé dans la pathogenèse des CS. La voie Hedgehog est également activée dans les OS (Heymann and Rédini, 2013). Cette voie peut être activée par exemple par des mutations portant sur la protéine G transmembranaire SMO (« Smoothened »).

Une étude a évalué dans des xénogreffes primaires de CS l'activité antitumorale d'**IPI-926** ou **saridégib**, un puissant inhibiteur sélectif oral de Smo (Campbell et al., 2014). Les résultats ont démontré que cet inhibiteur diminuait la croissance tumorale et que cela s'accompagnait d'une dérégulation de la voie Hedgehog. Dans une autre étude, le traitement des cellules de la lignée de CS SW1353 avec l'inhibiteur de la voie Hedgehog **HPI-4** ou ciliobrevin A, a réduit de manière significative la prolifération, l'invasion et la capacité

migratoire des cellules (Xiang et al., 2014). Le facteur de transcription GLI1 « Glioma-associated oncogene 1 » est un effecteur essentiel de la voie Hedgehog. Une étude a démontré que l'inhibition de l'expression de GLI1 par siNRA réduisait la croissance et la survie des cellules de CS, *via* l'induction de l'apoptose et de l'autophagie (Sun et al., 2014b). L'inhibition de la voie Hedgehog semble produire les mêmes effets pour l'OS. Ainsi, l'inhibition de SMO par la **cyclopamine** a également inhibé la prolifération et induit la mort cellulaire de 3 lignées d'OS (Warzecha et al., 2007). Les résultats de ces études plaident en faveur de l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Hedgehog comme option thérapeutique dans le traitement de CS et d'OS présentant une activation aberrante de la voie Hedgehog.

Les données précliniques du **saridégib** démontrent une activité anti-tumorale dans un large éventail de tumeurs malignes. Pourtant, les données cliniques ne semblent pas concluantes. Dans un essai randomisé de phase II avec placebo chez des patients atteints d'un CS avancé, 12 des 14 patients n'ont pas présenté de meilleurs résultats que les patients sous placebo (NCT01609179). Le **GDC-0449 ou vismodégib**, un autre inhibiteur de la voie hedgehog, a été utilisé dans un essai clinique de phase II (NCT01267955) chez 45 patients avec des CS de grade I ou II en progression. Il n'a atteint qu'un taux de bénéfice clinique à 6 mois de 25,6% (pour les 39 patients évaluable), alors que l'objectif fixé pour démontrer une efficacité clinique était de 40% (Italiano et al., 2013). Les durées de survie médiane sans progression et de survie globale étaient de 3,5 et 12,4 mois respectivement.

Pour l'OS, les études cliniques sont plus rares. Une étude de phase I sur le **LDE225 ou Sonidégib** (inhibiteur sélectif de SMO) a été réalisée chez des patients pédiatriques présentant un médulloblastome récurrent ou réfractaire ou d'autres tumeurs potentiellement dépendantes de la voie de signalisation Hedgehog (NCT01125800). Sur les 60 patients pédiatriques, 39 étaient porteurs d'un médulloblastome et 5 d'un OS (Kieran et al., 2017). Tous ces patients avaient subi une chimiothérapie au préalable, 98,3% une chirurgie et 81,7% une radiothérapie. Les seuls patients qui ont répondu favorablement au traitement étaient ceux porteurs d'un médulloblastome. L'étude de phase II qui a suivi s'est donc concentrée sur les patients adultes et pédiatriques atteints d'un médulloblastome.

#### *g. Les inhibiteurs épigénétiques*

Divers agents hypométhylants et des inhibiteurs des histones déacétylases sont explorés dans la thérapie des OS et des CS. Concernant les agents hypométhylants, nous nous focaliserons sur 2 inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN utilisés pour la prise en charge

de leucémies aiguës ou de syndromes myélodysplasiques : **l'azacitidine ou 5-azacitidine** et la **décitabine ou 5-azadéoxycytidine**.

Les données précliniques sur le CS avec la **décitabine** montrent des résultats contradictoires avec soit une réduction de la prolifération, de l'invasion, et de l'adhésion, ou au contraire une augmentation de la croissance tumorale *in vivo* (modèle « Schwarm rat chondrosarcoma ») (Monga et al., 2020). L'essai NCT02959164 évalue la combinaison de la décitabine avec la gemcitabine (antimétabolique de la phase S du cycle cellulaire) dans le traitement des tissus mous avancés et des sarcomes osseux. Les résultats partiels (phase Ib) montrent une réponse partielle pour un patient porteur d'un CS à mutation IDH1 alors qu'un autre patient porteur d'un CS sans mutation IDH n'a pas répondu au traitement. Toutefois, la thérapie a été stoppée après 7 mois chez le patient répondant à cause de la toxicité du traitement. Dans l'essai NCT01241162, le traitement par la décitabine a été suivi par une vaccination de cellules dendritiques autologues chez 15 enfants avec des neuroblastomes et des sarcomes récidivants. Malheureusement, les données concernant les 2 OS ne sont pas disponibles car ces patients n'ont pas reçu de traitement en raison d'une progression supplémentaire du cancer entre le moment de l'inscription et le début du traitement (Krishnadas et al., 2015). L'essai clinique NCT03628209 (en phase de recrutement) évaluera la sécurité et l'efficacité du nivolumab seul, ou du nivolumab en association avec l'**azacitidine** chez les participants atteints d'OS récidivants et résécables. Dans la cohorte de patients avec des CS avancés de l'essai clinique de phase I/II non randomisé, l'azacitidine est testée en association avec le FT-2102 (inhibiteur d'IDH1).

La modification des histones par acétylation/déacétylation est un mécanisme clé de la régulation de l'expression des gènes et elle joue un rôle central dans la détermination de l'état de différenciation. Divers types de cancers présentent couramment une dérégulation de la modification des histones. Des études précliniques ont montré les effets antitumoraux des **inhibiteurs d'histone désacétylases (HDAC)** sur les CS et les OS (Bernhart et al., 2017; McGuire et al., 2020; Mu et al., 2015; Sheikh et al., 2017). Quatre inhibiteurs de HDAC sont approuvés par la FDA pour le traitement de lymphomes ou de myélomes : le **vorinostat ou SAHA**, la **romidepsine ou depsipeptide**, le **bélinostat ou PDXD101** et le **panobistat ou LBH-589**.

Un essai clinique de phase II (NCT00112463, randomisation non précisée) sur la **romidepsine** pour des patients avec des sarcomes métastatiques ou non résécables, dont des CS et OS a été réalisé, mais les résultats n'ont pas été communiqués. Un essai de phase I (NCT04308330, randomisation non précisée) avec le **vorinostat** en combinaison avec la

chimiothérapie sur des tumeurs solides réfractaires ou récidivantes et du système nerveux central est en phase de recrutement. Deux essais cliniques de phase I terminés, ont déterminé la tolérance, la sécurité, la pharmacocinétique et l'activité du **bélinostat** en monothérapie (NCT00413075) ou en association avec l'antimétabolite 5-fluorouracile (NCT00413322). Les effets indésirables les plus fréquents du bélinostat utilisé en monothérapie étaient la fatigue, l'anorexie, les nausées, la constipation et la perte de poids (Olmos et al., 2007). La plupart des patients a été traitée pour des cancers colorectaux (15/60), de la prostate (10/60), de la vessie (6/60) et du poumon (5/60). Toutefois, sur les 60 patients, 7 ont une maladie stabilisée pendant plus de 4 mois, dont 1 CS. A notre connaissance, aucun effet clinique avec le **panobinostat** n'est répertorié pour le CS ou l'OS.

## D. miRNA et cancers

### I. Généralités

#### 1. Découverte du mécanisme d'interférence par l'ARN

La découverte de l'interférence par l'ARN s'est faite par hasard en 1990 chez le pétunia par l'équipe de Richard Jorgensen. Lors de l'introduction de copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase (CHS), responsable de la pigmentation violette des pétunias, ce chercheur pensait renforcer la coloration de la plante. Cependant, les fleurs obtenues étaient partiellement blanches ou totalement blanches, avec un niveau d'ARNm de la CHS beaucoup plus élevé que les fleurs sauvages. Ce mécanisme, incompris, fut appelé « co-suppression » car les deux copies du gène endogène et exogène semblent interagir en se « co-supprimant » (Napoli et al., 1990).

C'est en 1998 qu'une équipe parvient à expliquer ce phénomène. Andrew Fire et Craig Mello décrivent pour la première fois le mécanisme d'interférence à l'ARN chez le nématode *C. elegans*. Ils montrent que l'expression des gènes endogènes peut être inhibée de manière spécifique et très efficace par injection d'ARN double brin (ARNdb) homologue au gène cible. Par ailleurs, ils montrent que des ARN sens ou anti-sens seuls sont relativement inefficaces (Fire et al., 1998). Une autre équipe montre peu de temps après que ce mécanisme d'ARN interférent (RNAi) est également fonctionnel chez la drosophile (Kennerdell and Carthew, 1998). Cette découverte majeure, par l'équipe d'Andrew Fire et Craig Mello, fut récompensée en 2006 par le prix Nobel de physiologie et de médecine.

La découverte des ARNs interférents a permis de mettre à jour le rôle essentiel des ARNs comme des régulateurs spécifiques de l'expression des gènes. Cette découverte ouvre également de nouvelles perspectives pour la recherche fondamentale et appliquée. Par ailleurs, ce mécanisme est très conservé au cours de l'évolution, témoignant de son importance pour la survie de l'organisme.

#### 2. Découverte des miRNAs

Parallèlement à la découverte du mécanisme de l'interférence par l'ARN, des recherches menées sur *C. elegans* ont permis de mettre en évidence l'existence de petits ARNs interférents endogènes, transcrits à partir du génome cellulaire : les microARNs (miRNAs ou miRs). Le

premier miRNA découvert était *lin-4*. Ce miRNA fût décrit en même temps par l'équipe de Victor Ambros et Gary Ruvkun en 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). *Lin-4* joue un rôle essentiel sur le gène *lin-14* lors du développement post-embryonnaire de *C.elegans*. La première étude a émis l'hypothèse que *lin-4* était responsable de l'inhibition de *lin-14* (Ambros, 1989). Plus tard, une équipe parvient à montrer que le gène *lin-4* ne code pas pour une protéine mais pour deux transcrits de petite taille (61 et 22 nt), dont une partie de la séquence est partiellement complémentaire de séquences contenues dans la région 3'UTR (« Untranslated region ») de l'ARNm de la protéine *lin-14* (Lee et al., 1993). Au même moment, Wightman et al. montrent que la région 3'UTR de *lin-14* suffit pour sa régulation par *lin-4* au niveau post-transcriptionnel (Wightman et al., 1993). Par la suite, il a été observé que cette interaction était directe *via* un appariement partiel antisens du petit ARN *lin-4* avec les séquences 3'UTR de l'ARNm de *lin-14*. Cet appariement entraîne une inhibition de la traduction de l'ARNm, initiant le passage des stades larvaires L1 à L2 (Ha et al., 1996; Olsen and Ambros, 1999). De plus, il a été montré que *lin-4* inhibe également, et de la même manière, la traduction de la protéine *lin-28*, impliquée dans le passage des stades larvaires L2 à L3 (Moss et al., 1997).

En 2000, un nouveau miRNA est découvert chez *C.elegans*. Il s'agit de *let-7*, impliqué dans l'inhibition de la traduction de la protéine *lin-41*. Cette protéine joue un rôle dans la transition du stade larvaire L4 à l'âge adulte (Reinhart et al., 2000). A la différence du miRNA *lin-4*, des homologues de *let-7* sont retrouvés dans d'autres organismes : plantes, champignons, Mammifères, y compris l'Homme. C'est une structure conservée de type tige-boucle (Pasquinelli et al., 2000). En 2001, 3 études révèlent simultanément l'existence de nombreux autres gènes, conservés du ver à l'humain, codant pour des petits ARNs qui sont appelés miRNAs (Lagos-Quintana, 2001; Lau, 2001; Lee and Ambros, 2001). Il est intéressant de noter que ces miRNAs conservent également une spécificité d'interaction avec la plupart des ARNm (Friedman et al., 2009).

Aujourd'hui, en 2020, la base de données miRBase, qui permet de regrouper les miRNAs connus chez toutes les espèces étudiées (<http://www.mirbase.org>, V22.1, Octobre 2018) recensait 1973 miRNAs précurseurs et 2675 miRNAs matures chez l'homme. A l'heure actuelle, environ 50 % des gènes codant des protéines pourraient être ciblés par des miRNAs. De plus, environ 50 % des miRNAs identifiés chez *C. elegans* sont conservés chez l'Homme. Ces données montrent l'importance de cette classe de petits ARNs au cours de l'évolution (Grimson et al., 2008).

### 3. Nomenclature des miRNAs

La découverte de nouveaux miRNAs s'est vite accélérée, une nomenclature a donc été mise en place (**Figure 28**). Tout d'abord les miRNAs sont notés « miR ». Lorsque l'on parle du gène à l'origine du miRNA ou de son précurseur, il est noté « mir ».

Ensuite, l'organisme d'où provient le miRNA est également indiqué en préfixe par 3 lettres : hsa-miR- pour *homo sapiens* ou rno-miR- pour *rattus norvegicus* et mmu-miR- pour *mus musculus*.

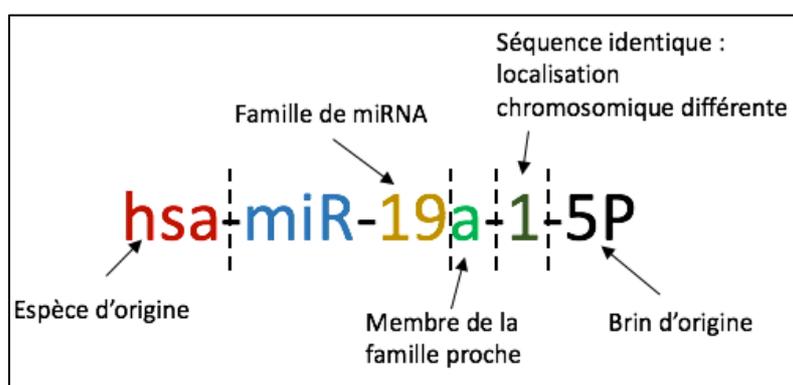
Le suffixe désigne ensuite le numéro du miRNA qui lui est attribué en fonction de l'ordre de découverte.

Par ailleurs le miRNA immature est double brin. Il possède un brin 3' et un brin 5'. Pour identifier le miRNA mature, les termes 3p pour le brin situé en position 3' et 5p pour le brin situé en position 5' sont utilisés (hsa-miR-100-3p ou hsa-miR-100-5p).

Parfois, certains miRNAs possèdent une lettre accompagnant leur numérotation (exemple : miR-15a). Cela signifie que plusieurs miRNAs possèdent une homologie de séquences et ils diffèrent de 1 à 3 nucléotides. Cette lettre permet de les identifier.

Plus rarement, des *loci* différents permettent la synthèse du même miRNA mature. Pour les différencier, un chiffre est ajouté en suffixe (exemple : miR-100-1 et miR-100-2).

De manière générale, la nomenclature la plus commune indique l'espèce d'origine en préfixe, le numéro du miR en suffixe suivi par le brin d'origine (exemple ; hsa-miR-100-3p). Cependant, si le brin d'origine n'est pas précisé, c'est qu'il s'agit du brin 5' car le brin 3p peut être remplacé par une étoile (exemple miR-100 = miR-100-5p et miR-100\*=miR-100-3p).



**Figure 28 : Nomenclature des miRNAs.**

## II. Biogenèse et mécanismes d'action

La synthèse d'un miRNA nécessite différentes étapes de maturation. Sa transcription débute dans le noyau. Il en résulte un ARN précurseur en tige boucle nommé miRNA primaire (pri-miRNA). Ensuite, ce pri-miRNA évolue en pré-miRNA. Ce pré-miRNA est alors exporté dans le cytoplasme où il subira différentes étapes de maturation *via* l'action d'enzymes afin d'aboutir à la production d'un miRNA simple brin mature fonctionnel d'une taille de 20-22 nucléotides et fonctionnel.

### 1. Organisation génomique des gènes codants les miRNAs

Au sein du génome, les séquences des gènes codants les miRNAs sont organisées de deux façons. Les gènes peuvent être isolés dans une région du génome ou regroupés dans des régions codant plusieurs miRNAs, que nous appelons « cluster ».

En général, dans ces clusters, la transcription des différents miRNAs est issue d'un seul pri-miRNA. Donc cela signifie que la transcription du pri-miRNA contenant plusieurs miRNAs différents est sous le contrôle d'un seul promoteur commun. Il semblerait que plus de la moitié des miRNAs de notre génome serait transcrite ainsi (Lagos-Quintana, 2001; Lee et al., 2002).

Ensuite, les miRs sont divisés en 2 catégories en fonction de la localisation de leurs séquences codantes. Certains miRNAs appelés miRNAs « intergéniques » proviennent de régions non codantes du génome. Ils possèdent leur propre promoteur et sont transcrits par l'ARN polymérase II (Corcoran et al., 2009; Lagos-Quintana, 2001). Ils suivent ensuite la voie de maturation canonique. Une seconde catégorie de miRNAs existe, les miRNAs « introniques ». Ces derniers sont localisés au sein de gènes qui codent des ARNm (Kim et al., 2009b). Ils dépendent généralement de leur gène hôte pour leur transcription (Morlando et al., 2008; Olena and Patton, 2010).

De manière plus précise, chez l'Homme, il a été mis en évidence que 88 % des gènes codant les miRNAs se situent dans les introns contre environ 10 % dans les exons (Kim et al., 2009b). Pour les gènes des miRNAs situés dans les introns, la transcription de l'ARNm associé aux gènes des miRNAs ne serait pas influencée par la transcription du miRNA. En revanche, les miRNAs provenant d'exons pourraient venir perturber la maturation de l'ARNm de la même zone du gène hôte et provoquerait sa dégradation.

D'autres études ont montré que 30 % des miRNAs « introniques » pouvaient être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte (Corcoran et al., 2009; Monteys et

al., 2010). Cela a pu être mis en évidence à l'aide de différentes analyses comme des immunoprécipitations de chromatine associées à l'ARN polymérase II.

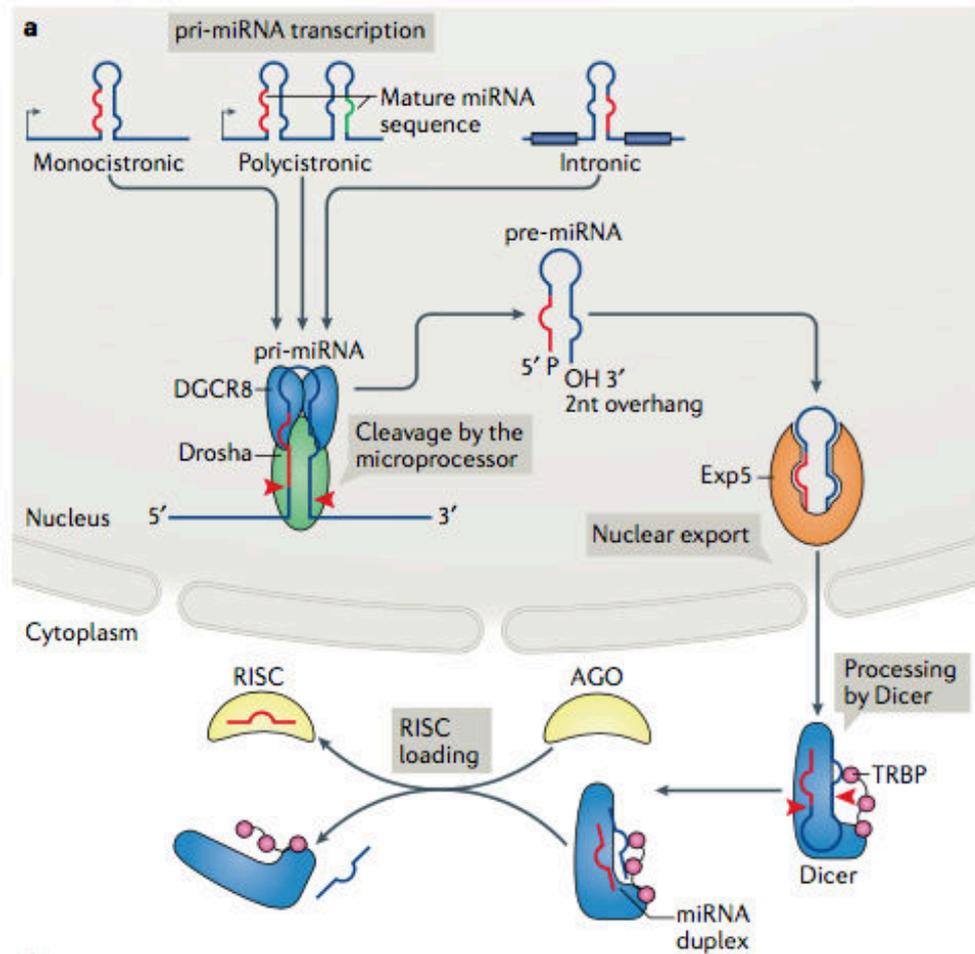
Pour finir, certains miRNAs sont codés dans de courts introns. Si l'intron est assez court, le miRNA peut être généré directement lors de l'épissage de l'ARNm. En effet, lors de l'épissage, le miRNA exclu va former directement la structure tige boucle appelée pré-miRNA (miRNA précurseur), sans passer par l'étape de maturation du pri-miRNA (Ruby et al., 2007). Ce groupe de miRNAs est appelé mirtron. Les mirtrons sont très minoritaires chez les Mammifères (Berezikov et al., 2007)

## 2. Régulation de la maturation des miRNAs

Comme nous venons de le voir, il existe plusieurs types d'organisation pour les gènes des miRNAs au sein de notre génome. Chaque localisation et organisation génomique des miRNAs peut entraîner une voie de maturation alternative, comme avec les mirtrons. Cependant, les miRNAs les plus représentés chez l'Homme sont les miRNAs transcrits par l'ARN polymérase II dont la transcription donne un pri-miRNA. Cette voie de maturation est appelée la voie canonique. Nous détaillerons donc uniquement la voie canonique qui est la plus importante chez l'Homme (Mandilaras et al., 2017; Treiber et al., 2019).

### *a. Transcription*

Les miRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de miRNA primaires (pri-miRNA) dans le noyau. Les pri-miRNAs peuvent être d'une grande taille (>1000 nucléotides) et coder plusieurs miRNAs (Fang and Bartel, 2015). Tout comme les ARNm, les pri-miRNAs présentent une coiffe 7-méthyl-guanosine (m7G) en position 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Lee et al., 2004) (**Figure 29**).



**Figure 29 : Vue d'ensemble de la voie canonique de la biogenèse des miRNAs.** Les miRNAs sont codés à partir de gènes individuels (monocistroniques), de groupes de gènes (polycistroniques) ou d'introns de gènes hôtes (introniques). L'ARN polymérase II (non illustrée) gouverne la transcription de pri-miRNAs. Le complexe microprocesseur constitué de Drosha et DGCR8 coupe le pri-miRNA au niveau de la tige de l'épingle à cheveux et libère le pré-miRNA possédant un groupement 3'OH caractéristique avec 2 nucléotides et un groupement 5'P. L'exportine 5 (EXP5) se lie au pré-miRNA et facilite l'exportation dans le cytoplasme, où l'enzyme Dicer les clive et génère un duplex intermédiaire de miRNA. Dicer, TRBP (« Trans-activation-responsive RNA-Binding Protein ») et Ago s'assemblent pour former le complexe RLC (« RISC Loading Complex »). Un brin du miRNA est transféré à la protéine Ago, ce qui entraîne la formation du complexe RISC (miRISC) (d'après Treiber et al., 2019).

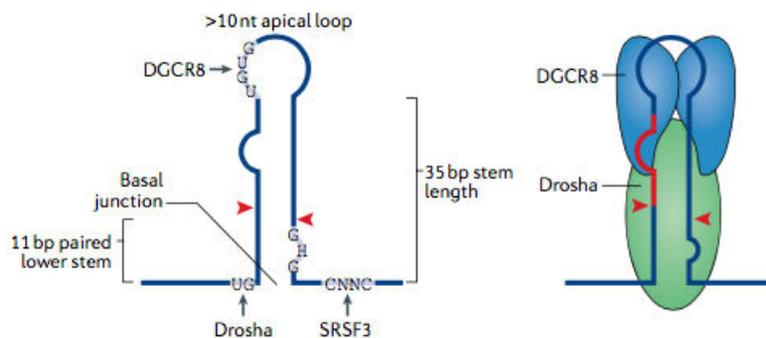
### *b. Clivage des pri-miRNAs par le microprocesseur*

Les pri-miRNAs sont transformés en épingles à cheveux uniques appelées miRNA précurseurs (pré-miRNA). Ils font environ 60-80 nucléotides. Ce clivage est réalisé par un complexe de protéines nucléaires appelé le microprocesseur (Lee et al., 2003). Le microprocesseur est composé de l'enzyme RNase de type III Drosha, de la protéine de liaison double brin (dsRNA) DGCR8 (« Digeorge Syndrome Critical Region gene 8 »), et de plusieurs facteurs auxiliaires dont le rôle n'est pas encore bien compris comme les hélicases d'ARN de la boîte MORT p68 (connu également sous le nom de DDX5) (Denli et al., 2004; Gregory et

al., 2004; Han, 2004). C'est l'action de Drosha et DGCR8 qui permet le clivage du pri-miRNA en pré-miRNA.

Il n'existe pas de séquences conservées communes aux pri-miRNAs. Ce sont des éléments structuraux qui permettent leur reconnaissance par le microprocesseur. Le pri-miRNA est caractérisé par une tige d'ARN db d'environ 30 nt présentant des mésappariements (boucles) et des fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige-boucle. D'un côté, la protéine Drosha reconnaît préférentiellement la jonction ARN double brin et interagit avec le motif UG situé à la base de la structure. Le dimère DGCR8 joue un rôle de liaison et de stabilisation de Drosha. Il se fixe à la boucle située au niveau apical de la tige, à l'aide d'un domaine de liaison à l'ARN db, mais également sur le motif UGU, grâce au « Heme Binding Domain » (HBD). Lorsque les protéines sont fixées, le microprocesseur est formé (Auyeung et al., 2013; Nguyen et al., 2015). Une fois le complexe en place, Drosha va pouvoir ainsi « mesurer » où placer les sites de clivages sur la séquence du pri-miRNA. Ils seront placés à une distance de 11 pb du site de jonction ARN simple brin/double brin situé au niveau basal et à une distance de 22 et 24 pb de la boucle située au niveau apical (**Figure 30**) (Fang and Bartel, 2015; Ma et al., 2013).

**Figure 30 : Caractéristiques et reconnaissance du pri-miRNA.** Des éléments de séquences sur les pri-miRNAs sont nécessaires pour un clivage efficace. La protéine DGCR8 se lie comme un dimère à la boucle apicale, tandis que Drosha interagit avec la tige basale. Les nucléotides H représentent A, C ou U ; les nucléotides N représentent tous les nucléotides. SRSF3 : facteur d'épissage riche en sérine/arginine 3 (d'après Treiber et al., 2019).



La protéine Drosha possède deux domaines avec une activité RNase de type III (RIIIDA et RIIIDb), responsable du clivage d'un des deux brins de la structure en tige-boucle du pri-miRNA (3' pour RIIIDA et 5' pour RIIIDb) (Han, 2004). Le clivage du pri-miRNA par le microprocesseur permet la libération d'un ARN structuré en tige-boucle dont l'extrémité 3' est caractérisée par deux nucléotides appelés « 3' overhang » (Lee et al., 2003).

### c. Export des pré-miRNAs du noyau vers le cytoplasme

Les pré-miRNAs générés dans le noyau sont exportés activement dans le cytoplasme par l'exportine-5 (EXP5). EXP5 est une protéine de la famille des karyophérines  $\beta$ ,

responsables du transport de protéines du noyau vers le cytoplasme à travers les pores de l'enveloppe nucléaire (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004). La protéine EXP5 produite dans le cytoplasme est importée dans le noyau. La fixation d'EXP5 au pre-miRNA est dépendante d'un cofacteur, la GTPase Ran sous sa forme GTP. L'interaction entre les protéines Ran-GTP et EXP5 permet de structurer la protéine d'export en forme de « U » et de créer une cavité d'accueil pour le pré-miRNA (Ha and Kim, 2014). L'EXP5 est spécifique des ARNs double brin ayant une taille supérieure à 14 pb. Elle possède une extrémité 3' composé de 2 nucléotides facilitant l'export des pré-miRNAs (Gwizdek et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004). L'incorporation du pré-miRNA au sein d'EXP5 le protège également de la dégradation par les nucléases. Après la liaison avec le co-facteur RAN-GTP dans le noyau, EXP5 se fixe aux nucléoporines pour permettre le passage du pré-miRNA du noyau vers le cytoplasme (Brownawell and Macara, 2002). La molécule GTP est ensuite hydrolysée par une enzyme RAN-GAP (« RAN-GTPase Activating Protein ») pour former le GDP. L'hydrolyse entraîne la libération de la structure de l'EXP5 et largue le pré-miRNA dans le cytoplasme. La protéine EXP5 est réimportée dans le noyau.

#### *d.            Maturation par le complexe Dicer*

Aussitôt exporté dans le cytoplasme, le pré-miRNA est pris en charge par un complexe multi-protéique appelé « RISC Loading Complex » (RLC) (Diederichs and Haber, 2007). Ce complexe permet de poursuivre la maturation du miRNA grâce à l'enzyme de type RNase III Dicer (Hutvagner et al., 2001) pour ensuite l'incorporer au sein du « RNA Induced Silencing Complex » (RISC) (Figure 31).

Chez l'Homme, Dicer fonctionne avec TRBP (« Trans-activation Response (TAR) RNA Binding Protein ») également connu sous le nom de TARBP2. Plus précisément, Dicer contient un domaine central PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille) dont le rôle est de reconnaître de manière spécifique des ARN doubles brins dont l'extrémité 3' présente 2 nucléotides protubérants, qui est une des caractéristiques du pré-miRNA. Dicer contient également plusieurs domaines supplémentaires qui régulent le clivage et permettent de fixer d'autres partenaires protéiques comme la TRBP, mais aussi les protéines Argonaute (Ago) (Ha and Kim, 2014).

Lors de l'incorporation du pré-miRNA au sein du RLC, Dicer va interagir avec les pre-miRNAs en reconnaissant les nucléotides en 3' non appariés et l'extrémité 5' phosphate grâce à son domaine PAZ. Le RLC va également fixer la tige du pré-miRNA *via* son domaine de

liaison à l'ARN double-brin. La protéine TRBP stabilise ensuite cette interaction. C'est la distance entre le domaine de fixation de PAZ et les domaines RNase III qui détermine la position du clivage de Dicer (Svobodova et al., 2016). Le repliement de Dicer va permettre de positionner correctement les deux domaines possédants les activités RNases (RNases IIIa et RNase IIIb), générant les sites de coupures. La boucle du pré-miRNA est donc clivée, libérant un duplex d'ARN double-brin. Ce duplex est d'environ 22 nucléotides, que l'on appelle miR/miR\* ou miR-5'/miR-3'. Les brins 5' et 3' de la tige du pré-miRNA sont clivés respectivement par les domaines RNase IIIa et RNase IIIb (Zhang et al., 2004).

*e. Prise en charge par le complexe RISC*

Dicer libère donc un duplex miR-5p/miR-3p ou miR/miR\* mature possédant une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3'OH avec 2 nucléotides non appariés (Elbashir et al., 2001). Ce duplex est ensuite transféré à la protéine Ago au sein du complexe RISC (**Figure 31**).

Le complexe RISC est composé de plusieurs protéines dont les protéines effectrices Argonautes (Okamura et al., 2004). L'Homme possède 4 protéines Ago (Ago1-4). Toutes prennent en charge les miRNAs. Cependant, Ago2 est la plus exprimée et la seule à posséder une activité endonucléolytique. C'est d'ailleurs cette activité catalytique qui est essentielle pour la mise sous silence de l'ARNm cible (Meister et al., 2004).

Les protéines Ago possèdent trois domaines :

- Le domaine PAZ « Piwi-Argonaute-Zwille », qui est aussi présent chez Dicer. Il reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' sortante du duplex miRNA (Lingel and Izaurralde, 2004; Song et al., 2004).

- Le domaine MID, qui constitue une poche de fixation du phosphate en 5' du duplex (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005).

- Enfin, le domaine PIWI, qui ressemble à une RNase H (enzyme clivant l'ARN dans les hétéroduplex ARN/ADN). Il constitue le domaine catalytique d'Ago2 qui vient cliver le brin passager du duplex (Ma et al., 2005; Song et al., 2004).

L'incorporation du miRNA mature dans le complexe RISC est identique pour les 4 protéines Ago humaines. Cela commence par la prise en charge du duplex d'ARN, transporté par Dicer, par la protéine Argonaute. Or, Ago n'est capable de fixer qu'un seul brin ARN. Lors

de la prise en charge, il y a donc une ouverture du duplex d'ARN et c'est lors de cette étape qu'il y a sélection du futur miRNA mature.

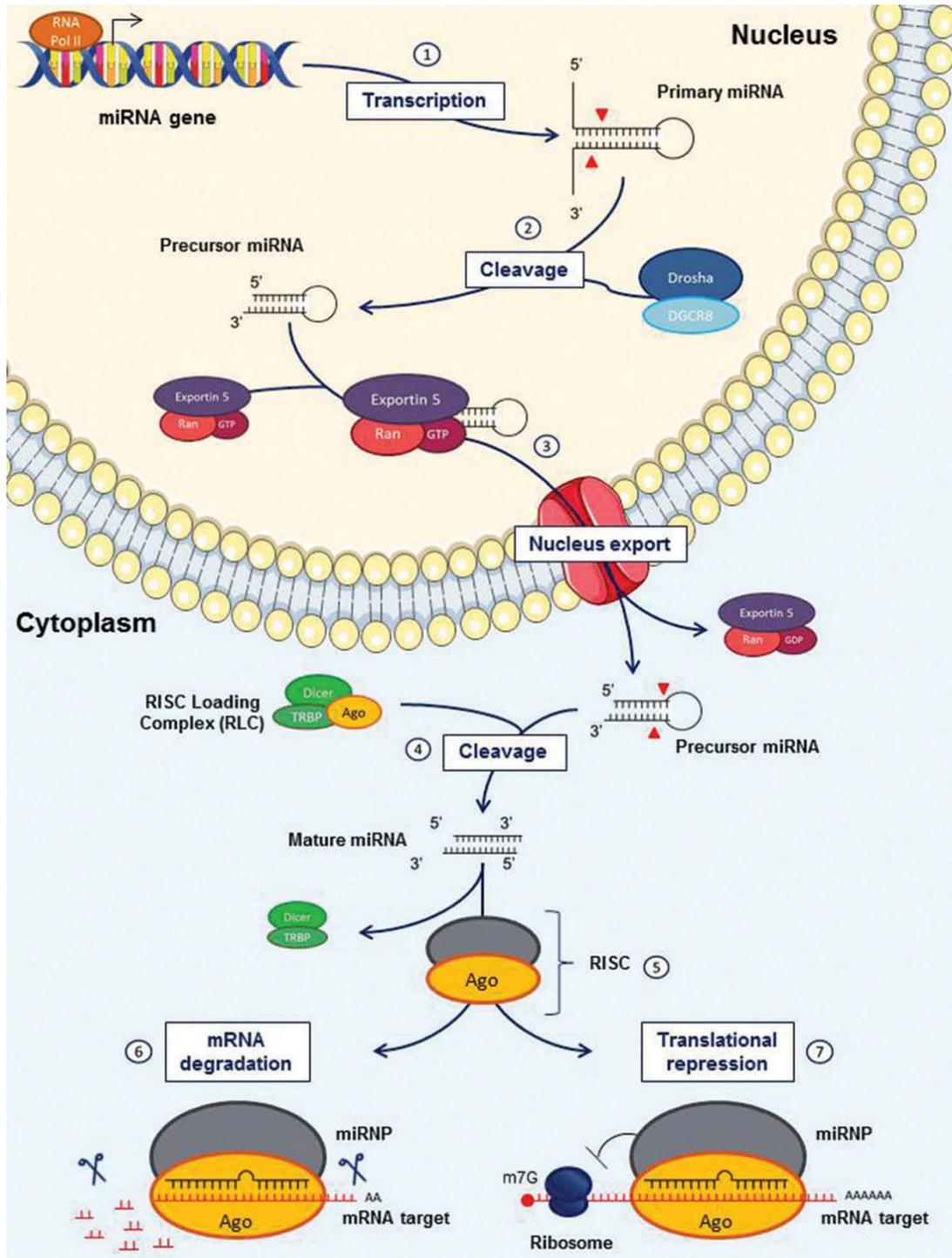
C'est la stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des duplex de miRNA qui semble déterminer la sélection de l'un des deux brins. C'est le brin le plus faiblement apparié, donc le moins stable, à son extrémité 5' qui est majoritairement incorporé au sein du RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Le brin incorporé dans le complexe RISC s'appellera le brin guide (Bartel, 2004). Le brin exclu s'appellera le brin passager et sera éliminé. Le brin non pris en charge, ou brin passager, est dégradé par Ago *via* le domaine PIWI. Ce chargement au sein de RISC est possible grâce au débobinage qui permet la dissociation du miR-5p du miR-3p (Czech and Hannon, 2011).

Néanmoins, certains pré-miRNAs donnent des miRNA matures provenant des deux brins à une fréquence comparable, ou parfois plus importante pour le brin 3' (Kuchenbauer et al., 2011; Okamura et al., 2008; Ro et al., 2007). Ce ratio varie fortement en fonction du pré-miRNA mais également en fonction du tissu considéré pour certains pré-miRNAs (Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011; Ro et al., 2007).

Le brin du miRNA sélectionné reste séquestré dans la poche PAZ/MID d'Ago et cette association miRNA mature-Ago est généralement appelé miRISC. Ce complexe va permettre la fixation du miRNA sur ses cibles et induire le phénomène d'interférence par l'ARN.

### 3. Appariement

Le rôle des miRNAs est de guider le complexe mi-RISC jusqu'à l'ARNm cible. L'association du miRNA avec son ARNm cible s'effectue le plus souvent avec la région 3'UTR de l'ARNm (Bartel, 2009). Cette association se fait par complémentarité des bases. Ensuite, la spécificité de cette complémentarité va définir le mode de répression sur la cible : soit une répression des gènes par une inhibition post-transcriptionnelle et/ou une dégradation de l'ARNm (Filipowicz et al., 2008) (**Figure 31**).



**Figure 31 : Aperçu de la biogenèse des miARN et de leurs modes d'action.** Les microARN primaires (pri-miARN) sont transcrits par l'ARN polymérase II (1). Ensuite, Drossha et le DGCR8 clivent le pri-miARN en miARN précurseur (2) (pré-miARN) qui est ensuite exporté hors du noyau par l'exportine 5 (3). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est traité dans un duplex d'ARN double brin (miARN mature) par Dicer (4). Ensuite, le miARN mature simple brin est incorporé dans le complexe RISC (5) pour réguler les cibles de l'ARNm par dégradation (6) ou répression traductionnelle (7) (Mandilaras et al., 2017).

a. Les interactions des miRNAs et leur cible 3'UTR

Les premiers indices de la reconnaissance des cibles des miRNAs sont venus de l'observation avec *lin-4* qui possède une certaine complémentarité de séquence avec les multiples sites conservés dans la région 3'UTR de l'ARNm de *lin-14* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Plusieurs modes d'appariements sont possibles.

La reconnaissance des cibles se fait principalement par un appariement Watson-Crick entre la « seed region » du miRNA (elle se situe en position 5' du miRNA et comprend les nucléotides 2 à 8) et les sites de la séquence 3'UTR de l'ARNm ciblé (Bartel, 2009; Grimson et al., 2007). Ces sites de 7-8 nucléotides constituent l'essentiel de la répression pour chaque miRNA, et sont les sites identifiés par les outils de prédiction de cibles. C'est la séquence la plus efficace pour exercer une répression de la traduction.

Un appariement à la région 3' du miRNA, en particulier l'appariement impliquant les nucléotides 13-16 du miRNA, peut compléter l'appariement à la région seed (Bartel, 2009). Cet appariement supplémentaire peut renforcer la spécificité. En revanche, l'appariement en 3' du miRNA sans l'appariement de la « seed region » ne permet pas d'induire une répression fonctionnelle de la traduction (Bartel, 2009; Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007).

Différentes interactions sont donc possibles entre le miRNA et la séquence 3'UTR de son ARNm cible afin de conduire à l'action de répression du miRISC.

▪ **Les sites canoniques (Figure 32).**

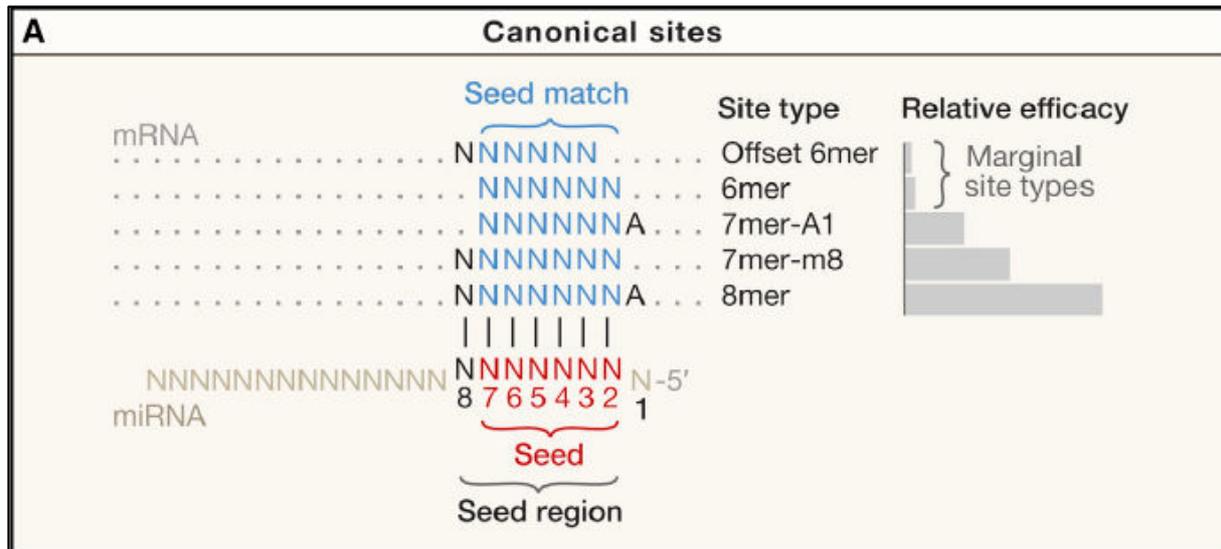
Les sites canoniques sont les interactions présentant un appariement fort avec la « seed region ». Des interactions les moins efficaces aux plus efficaces nous avons (Bartel, 2009, 2018) :

- La configuration *7mer-A1* correspond à un appariement parfait de la position 1 à 7 de la « seed region » avec la présence de l'Adénine en position 1.
- La configuration *7mer-m8* correspond à un appariement parfait de la « seed region » de la position 1 à 8.
- La configuration *8mer* correspond à un appariement parfait de la position 1 à 8 de la « seed region » avec la présence de l'Adénine en position 1.

Des sites plus marginaux sont aussi décrits :

- La configuration *6mer* correspond à un appariement de 6 nucléotides de la « seed region » de la position 2 à 7

- La configuration *offset 6mer* correspond également à un appariement de 6 nucléotides mais de la position 3 à 8.

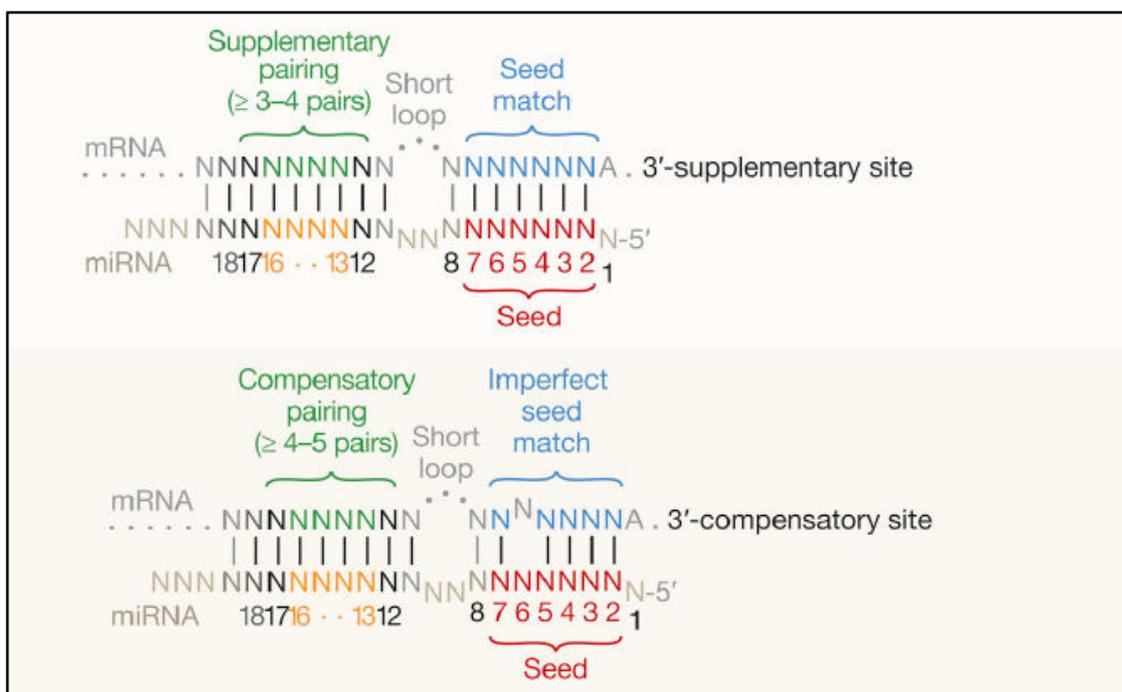


**Figure 32 : Sites cibles canoniques des miRNAs chez les Mammifères.** Ces sites canoniques ont chacun 6 à 7 paires Watson-Crick contiguës (lignes verticales) à la « seed region » du miRNA (positions 2 à 8 du miRNA). Deux de ces sites comprennent également un A en position 1. L'efficacité relative des sites dans les cellules de Mammifères est représentée graphiquement à droite (échelle logarithmique). Les sites canoniques les plus efficaces sont les sites 7-8 nt qui comprennent une correspondance parfaite avec la « seed region » du miRNA (positions 2-7, en rouge), alors que les sites 6 nt sont les moins efficaces (d'après Bartel, 2018).

▪ **Les sites atypiques (Figure 33)**

- « 3' supplementary site » : il y a un appariement de 3 à 4 nucléotides en position 13-16 permettant de renforcer l'appariement en « seed region ».
- « 3' compensatory site » : il y a des mésappariements dans la « seed region » mais cela est compensé par l'appariement en région 3'UTR de 9 nucléotides.

L'appariement du miRNA avec son ARNm conditionne donc l'efficacité de répression. Pourtant, d'autres facteurs vont aussi avoir un rôle dans cette efficacité. Par exemple, la structure de l'ARNm va conditionner l'accessibilité du miRNA aux sites de fixation. Ainsi, une des régions riches en AU à proximité des sites d'interactions des miRNAs augmenterait l'efficacité de répression (Grimson et al., 2007).



**Figure 33 : Les sites cibles atypiques des miRNAs chez les Mammifères :** « 3'-supplementary » est un type de site canonique atypique. Une petite fraction des sites canoniques (<5%) bénéficie de l'appariement avec la région 3' du miRNA. L'appariement est généralement centré sur les nucléotides 13-16. « 3'-compensatory site » est un type fonctionnel de site non canonique. Le site non canonique n'a pas six paires Watson-Crick contiguës (lignes verticales) à la « seed region ». On constate un décalage à la position 6 dans cet exemple, mais l'imperfection peut se produire sur une autre position de la « seed region » (d'après Bartel, 2018).

### *b. Prédiction des cibles et bioinformatique*

De nombreux algorithmes ont été développés pour prédire les cibles potentielles des miRNAs. Pour prédire de manière fiable les cibles d'un miRNA, la première étape consiste à rechercher 7-8 nucléotides des sites canoniques dans la séquence 3'UTR.

Chaque logiciel de prédictions utilise des paramètres différents (Witkos et al., 2011). Les algorithmes de prédictions de TargetScan, PicTar, EMBL et EIMMo exigent tous un appariement rigoureux des « seed region ». D'après Bartel, les algorithmes exigeants avec les appariements sur la « seed region » sont plus efficaces que ceux qui ne le sont pas (Bartel, 2018). Toutefois, ces outils ne sont pas tous identiques. Des artefacts d'alignement sont possibles et peuvent être attribués à l'utilisation de bases de données UTR différentes ou à l'utilisation de séquences de miRNAs légèrement différentes. D'autres raisons sont intrinsèques aux logiciels de prédictions eux-mêmes (Ritchie et al., 2009). Par exemple, TargetScan privilégie les alignements présentant l'Adénine en position 1, alors que les autres algorithmes privilégient simplement une forte affinité de la « seed region » (Brennecke et al., 2005; Lewis

et al., 2005). TargetScan va classer selon la conservation du site, le numéro du site, le type de site (avec  $8mer > 7mer-m8 > 7mer-A1$ ) (Baek et al., 2008; Friedman et al., 2009; Grimson et al., 2007; Selbach et al., 2008).

Malheureusement, ces logiciels de prédictions comportent des limites. Les miRNAs ainsi que les ARNm peuvent adopter des structures particulières pouvant gêner leur interaction. Des effets de compétitions peuvent également exister entre les sites de liaison (Alexiou et al., 2009; Ritchie et al., 2009). Des faux positifs ou faux négatifs sont donc possibles avec ces outils de prédictions. Il est donc nécessaire de compléter cette analyse par des expériences de validation fonctionnelle individuelle. En général, cela est effectué *via* l'utilisation de gènes rapporteurs permettant de conclure sur un effet direct ou indirect du miRNA sur la cible prédite.

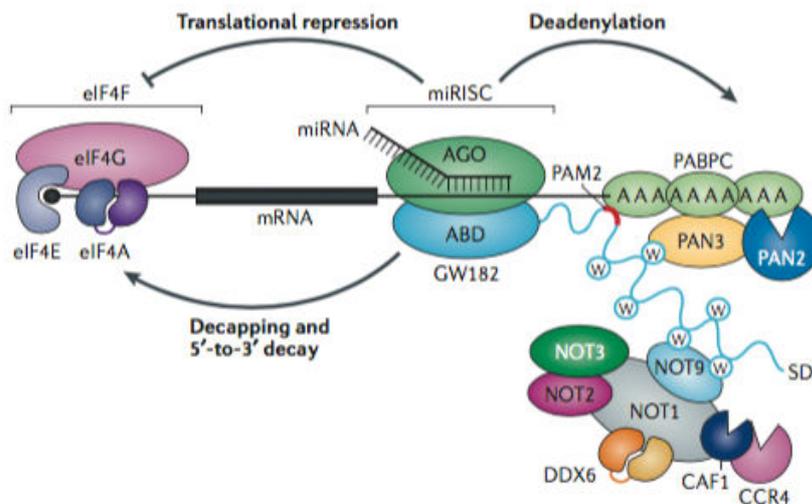
#### 4. Mécanismes moléculaires d'interférence par les miRNAs

##### a. *Principe*

Les miRNAs vont réduire au silence l'expression des gènes en réprimant la transcription et en accélération la dégradation des ARNm cibles (Fabian and Sonenberg, 2012; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Ipsaro and Joshua-Tor, 2015). Les cibles parfaitement complémentaires sont clivées par les protéines Ago catalytiquement actives (Ipsaro and Joshua-Tor, 2015). Néanmoins, chez les animaux, les cibles des ARNm contiennent le plus souvent des séquences partiellement complémentaires aux miRNAs ce qui empêche le clivage direct par Ago. De plus, chez l'Homme, seule Ago2 possède une activité catalytique.

Dans le cas où le clivage n'est pas possible, les protéines Ago doivent recruter des partenaires protéiques supplémentaires (Fabian and Sonenberg, 2012; Huntzinger and Izaurralde, 2011). L'inhibition post-transcriptionnelle passe par une combinaison de répression traductionnelle, de désadénylation et de retrait de la coiffe en 5' de l'ARNm (« cap », guanine méthylée). Le mécanisme par lequel les miRNAs répriment la traduction en l'absence de dégradation de l'ARNm n'est pas totalement élucidé. Le consensus émergent est que les miRNAs inhibent l'initiation de la traduction en interférant avec l'activité et/ou l'assemblage du complexe du facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF4F (« 4E-T, Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter »). Les protagonistes du GW182 jouent un rôle central dans ce processus et comptent parmi les partenaires d'Ago les plus étudiés (Fabian and Sonenberg, 2012; Lingel and Izaurralde, 2004). Ils fonctionnent comme des échafaudages

flexibles pour établir un pont entre les protéines Ago et les complexes effecteurs en aval, tels que les complexes de désadénylation cytoplasmique PAN2-PAN3 (Poly(A)-Nuclease2-Poly(A)-Nuclease3) et CCR4-NOT (« Carbon Catabolite Repression-Negative On TATA-less ») (Fabian and Sonenberg, 2012; Lingel and Izaurralde, 2004) (**Figure 34**).



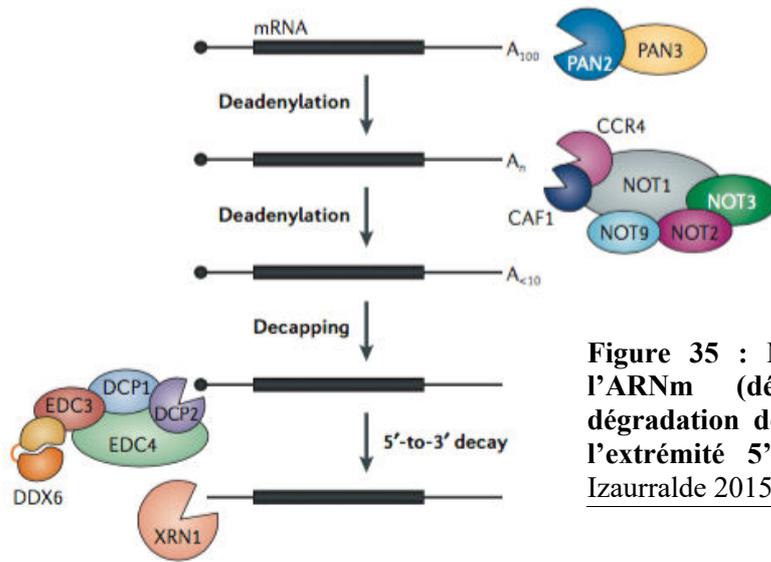
**Figure 34** : Aperçu de l'inhibition de l'expression des ARNm ciblés par les miRNAs (d'après Jonas & Izaurralde 2015).

*b. Dégradation des ARNm consécutive à la déstabilisation de l'ARNm*

La dégradation des ARNm cibles représente 66 à 90 % de la répression induite par les miRNAs dans les cellules de Mammifères en culture (Selbach et al., 2008; Subtelny et al., 2014).

La première étape de la déstabilisation de l'ARNm cible comprend la fixation de la protéine GW182 avec la protéine Ago. GW182 interagit tout d'abord avec le complexe PABPC (« Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic »), associé à la queue poly(A) de l'ARNm. PABPC et GW182 interagissent également avec un complexe de désadénylation PAN2-PAN3. La sous-unité PAN2 possède l'activité de désadénylation. Elle est recrutée par des interactions médiées par la protéine adaptatrice PAN3. La sous-unité PAN3 interagit directement avec la protéine PABPC (Wahle and Winkler, 2013) (**Figure 35**).

Un autre complexe CCR4-NOT est recruté. Il joue un rôle central dans la désadénylation (Wahle and Winkler, 2013). Il catalyse le raccourcissement des queues poly(A) de l'ARNm et par conséquent entraîne une déstabilisation de l'ARNm et l'expose aux exoribonucléases.



**Figure 35 : Mécanisme de déstabilisation de l'ARNm (désadénylation), suivi par la dégradation de l'ARNm après le décoiffage de l'extrémité 5' de l'ARNm (d'après Jonas & Izaurralde 2015).**

Le complexe DCP2 (« Decapping Enzyme ») et ses différents partenaires sont aussi recrutés. Ce complexe provoque le décoiffage de l'extrémité 5' de l'ARNm et l'expose aux exoribonucléases comme XRN1 (Exoribonuclease 1) (Bartel, 2018; Gebert and MacRae, 2019a; Jonas and Izaurralde, 2015) (**Figure 35**).

### *c. Inhibition de la traduction*

Il est également possible que le complexe miRISC n'entraîne pas la dégradation de l'ARNm. C'est l'interaction de la protéine GW182 avec CCR4-NOT qui régule cette activité. La sous-unité NOT1 va se lier avec la protéine DDX6 (« DEAD Box Helicase 6 »). Cette hélicase interagit avec les facteurs de décoiffage, mais elle fonctionne également comme un répresseur de la traduction. DDX6 va alors interagir avec eIF4E, empêchant la fixation d'eIF4G qui ne peut donc pas exercer son activité d'initiation de la traduction. Ainsi, NOT1 coordonne les activités du complexe CCR4-NOT en fournissant des sites de liaison pour les facteurs qui catalysent la désadénylation, le décoiffage et la répression traductionnelle (**Figure 34**) (Bartel, 2018; Gebert and MacRae, 2019a; Jonas and Izaurralde, 2015).

D'autres mécanismes d'inhibition sont possibles mais ils ne sont pas les mécanismes dominants chez les Mammifères (Gebert and MacRae, 2019a).

*d. Cas particulier : activation de la transcription ou de la traduction par les miRNAs*

Outre la réduction au silence des gènes par les miRNAs, de nombreuses études démontrent également l'implication de miRNAs dans l'activation de la transcription ou de la traduction (Pasquinelli, 2012; Pu et al., 2019). Ce mode de régulation a été mis en évidence pour la première fois en 2008. Il a été montré que le miR-373 pouvait augmenter la transcription de la cadhérine-E et du CSDC2 (« Cold Shock Domain-Containing protein C2 ») par la présence de sites cibles dans les promoteurs de ces deux gènes (Place et al., 2008). Ces dernières années, plusieurs hypothèses ont été avancées afin de mieux comprendre ce mécanisme d'activation de la transcription. Des sites cibles des miRNAs ont été retrouvés dans la région promotrice de gènes, où ils activent la transcription génique par le remodelage de la chromatine. Une autre hypothèse avance que le miRNA (par exemple, miR-373) se lie à l'ADN ayant une séquence complémentaire au sein des promoteurs de gènes pour déclencher l'expression génique. A cet égard, le miRNA fonctionne comme un facteur de transcription ciblant des motifs complémentaires dans les promoteurs de gènes (Place et al., 2008). Cependant, il n'y a pas assez d'observations de ce phénomène pour valider cette hypothèse. De plus, les miRNAs pourraient induire la transcription en recrutant un complexe protéique incluant des facteurs activateurs de la transcription du gène. Enfin, ces miRNAs nucléaires pourraient également former une boucle de rétrocontrôle positive sur la transcription du gène cible. Par exemple, le miR-483-5p, qui est associé au gène de l'IGF2 (« Insulin-like growth factor 2 »), pourrait réguler l'expression de l'IGF2 de manière positive, entraînant une augmentation de la tumorigenèse (Liu et al., 2013).

Il y a peu d'observations sur l'implication des miRNAs activant la traduction des ARNm à ce jour. Une étude a démontré que la fixation du miR-10a sur la séquence 5'UTR améliore la synthèse des protéines ribosomales ainsi que leur biogenèse (Ørom et al., 2008). De même, le miR-122, un miR spécifique du foie, stimule la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C. Ce miRNA se fixe à des sites présents dans le 5'UTR (Chang et al., 2008a; Jopling, 2005). Cette activation de la traduction se fait au stade de l'initiation, en simulant l'association de la petite sous-unité ribosomique avec l'ARN du virus de l'hépatite C (Henke et al., 2008).

Une autre étude montre que les complexes contenant Ago2 sont impliqués dans l'activation de la traduction lors de la privation en sérum, et que certains miRNAs peuvent induire la traduction des ARNm cibles pendant l'arrêt du cycle cellulaire (Vasudevan et al., 2007).

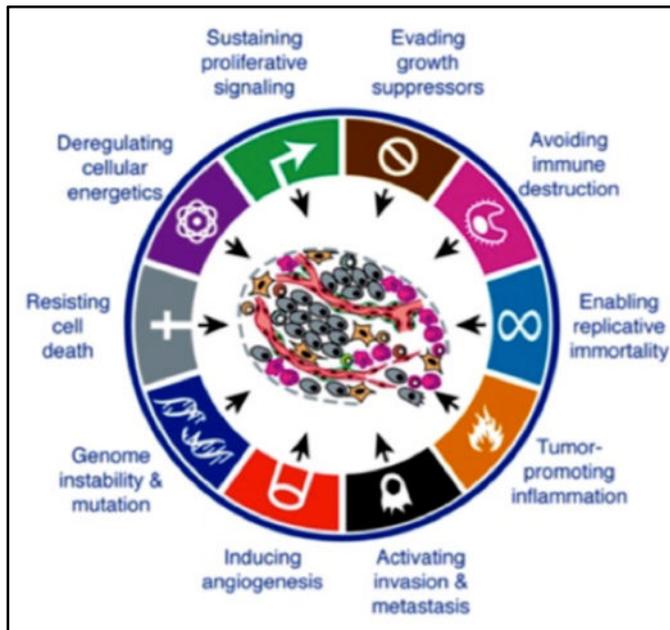
### III. miRNAs et cancer

#### 1. Dérégulation de l'expression des miRNAs dans les cancers

L'hypothèse de l'implication des miRNAs dans le développement tumoral a rapidement été avancée. C'est en 2002 que la première association entre la dérégulation de l'expression de miRNAs et l'émergence du processus de tumorigenèse a été décrite pour la première fois chez l'Homme (Calin et al., 2002). Cette équipe a observé chez environ 70 % des patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), un défaut d'expression des miR-15a et miR-16-1. Ces miRs sont situés dans un même cluster localisé dans la région chromosomique 13q14.3. Cette région chromosomique est perdue de manière hétérozygote ou homozygote dans la majorité des cas de LLC. Le rôle de ces deux miRNAs a donc été étudié et il a été démontré que ces deux miRNAs ciblaient directement le membre anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules leucémiques. Plus tard, Calin et son équipe ont réalisé une étude plus globale par CGH (« Comparative Genomic Hybridization ») qui a permis de mettre en évidence qu'environ la moitié des gènes codant les miRNAs sont localisés préférentiellement dans des régions du génome fortement remaniées dans les cancers (Calin et al., 2004). Le rôle des miRNAs dans la cancérogenèse semble donc crucial.

Aujourd'hui, l'implication des miRNAs dans le développement des cancers est clairement établie. D'après la revue « Hallmarks of Cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011), il existe 10 étapes biologiques acquises au cours du développement tumoral (**Figure 36**).

Ces étapes comprennent le maintien d'une signalisation proliférative, l'évitement des inhibiteurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répllicative, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion avec production de métastases, l'instabilité génétique, l'inflammation, la dérégulation des métabolismes énergétiques de la cellule et l'échappement au système immunitaire. Pour chaque processus, il existe au moins une étude démontrant l'implication de miRNAs (Van Roosbroeck and Calin, 2017). Nous illustrerons donc dans un autre paragraphe le rôle primordial des miRNAs dans le développement et la progression tumorale en se concentrant sur les tumeurs osseuses (CS et OS).



**Figure 36 : Les 10 processus biologiques acquis au cours du développement tumoral (d'après Hanahan & Weinberg 2011).**

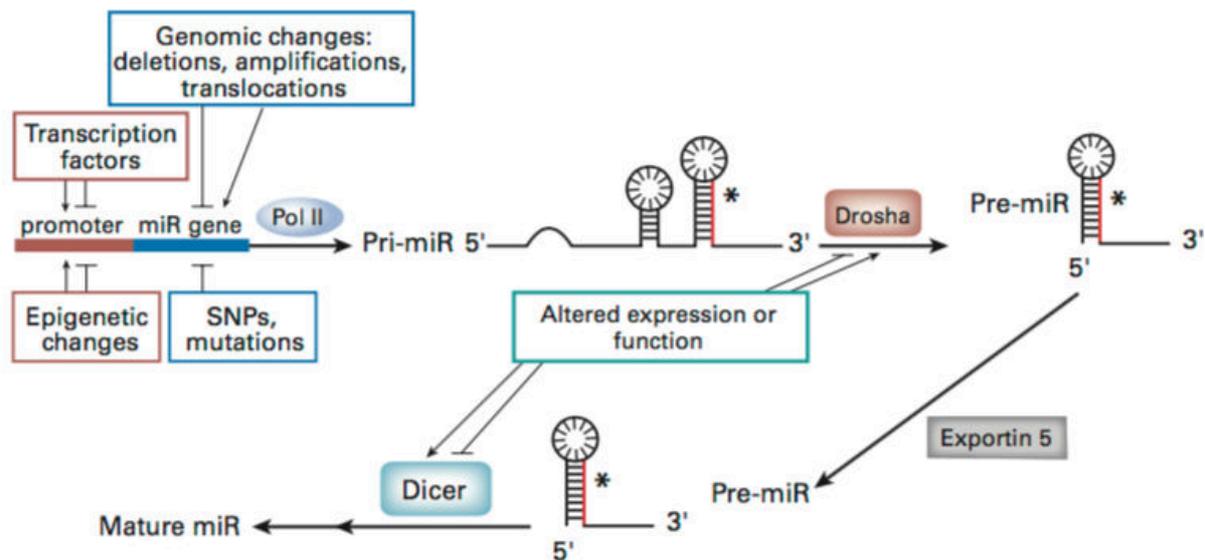
## 2. Mécanismes de dérégulation des miRNAs

De nombreuses études montrent une altération du niveau d'expression de la majorité des miRNAs matures dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux (Garzon et al., 2009; Iorio and Croce, 2012).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer leur dérégulations (Iorio and Croce, 2009) (**Figure 37**) :

Premièrement, cela peut s'expliquer par la localisation des gènes codant les miRNAs dans des régions instables du génome. C'est le cas pour les miR-15a et miR-16 qui étaient les premiers miRNAs retrouvés impliqués dans un cancer. Ils se trouvaient dans une région du génome mutée (Calin et al., 2004).

L'expression des miRNAs peut également être modulée en raison d'un défaut dans le mécanisme de biogenèse du miRNA. Les changements des niveaux d'expression des miRNAs peuvent ainsi résulter d'une activité de Drosha ou de Dicer modifiée dans différents types de tumeurs (Thomson, 2006).



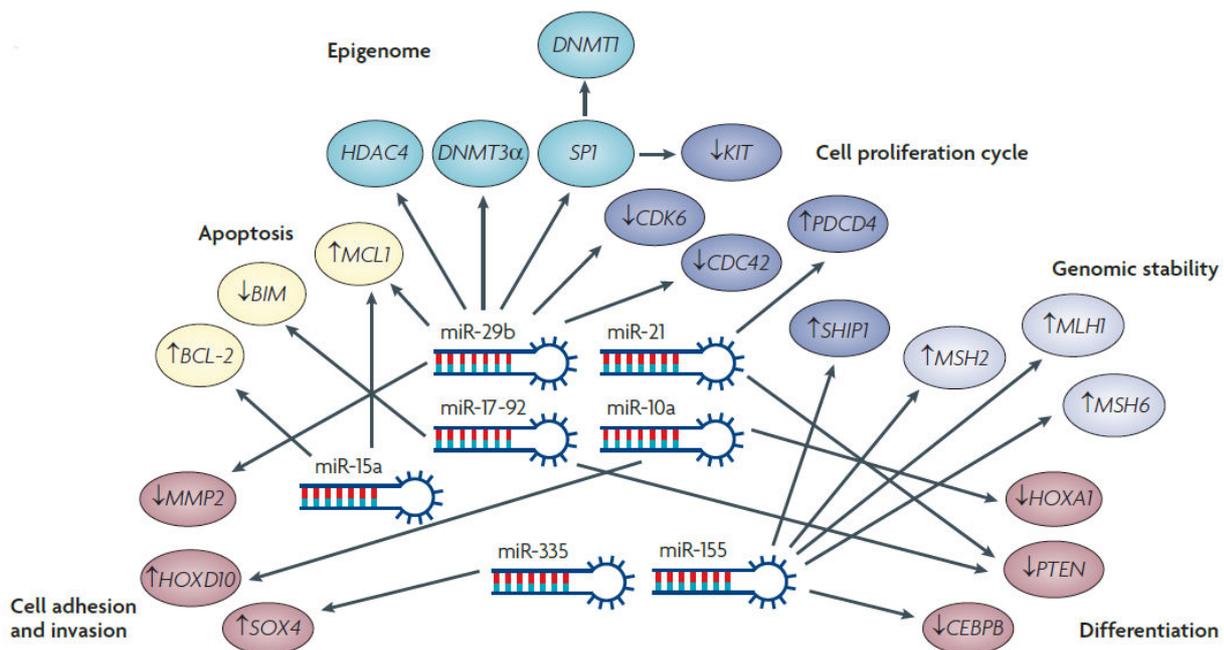
**Figure 37 : Mécanismes de dérégulation des miRNAs.** La dérégulation de l'expression du miRNA observée dans le cancer peut être causée par des anomalies chromosomiques, des mutations, des polymorphismes (SNP), une dérégulation transcriptionnelle, des défauts dans le mécanisme de biogenèse du miRNA et des changements épigénétiques (d'après Ioro & Croce, 2009).

L'expression dérégulée des miRNAs dans les cancers peut aussi être due à des changements épigénétiques. Par exemple, une altération de la méthylation de l'ADN. En effet, une analyse des séquences génomiques des gènes codant les ARNs a montré qu'environ 50 % d'entre eux sont associés à des îlots CpG (Weber et al., 2007). Plusieurs études ont rapporté qu'une méthylation aberrante peut entraîner une expression anormale des miRNAs dans le cancer. Ainsi, Saito et son équipe ont montré que le miR-127 est inhibé par la méthylation de son promoteur dans les cancers de la vessie. Ce miRNA cible un oncogène BCL6 (« B-cell lymphoma 6 ») (Saito et al., 2006). Inversement, une hypo-méthylation de certaines régions du génome peut favoriser l'expression de miRNAs oncogènes, comme le montre une étude sur l'adénocarcinome du poumon avec let-7a-3 (Brueckner et al., 2007).

Enfin, la dérégulation des miRNAs peut résulter d'une augmentation ou d'une diminution de l'activité d'un facteur de transcription au niveau de leur promoteur. Les miR-16, miR-143 et miR-145, par exemple, sont transcrits sous l'influence de la protéine suppresseur de tumeur p53 (Suzuki et al., 2009). Inversement, des protéines oncogènes peuvent aussi initier la transcription des miRNAs. C'est le cas de la protéine c-myc qui initie la transcription des gènes d'un certain nombre de miRNAs comme le miR-17-92 (Chang et al., 2008b) ou inhibe la transcription du miR-29 (Mott et al., 2010). Lorsque ces facteurs de transcription sont dérégulés dans le processus tumoral, ils affectent donc en conséquence l'expression des gènes codant les miRNAs associés à ces facteurs de transcription.

### 3. Les miRNAs, une implication au cœur du réseau d'expression protéique

Comme nous l'avons vu, les miRNAs sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes biologiques. Cette capacité provient également de leur capacité d'action multi-cibles. Un seul miRNA est capable de réguler des centaines de gènes à la fois (Bracken 2016). De plus, un gène peut également être régulé par plusieurs miRNAs (Gebert and MacRae, 2019b; Grimson et al., 2007) (**Figure 38**).



**Figure 38 : Exemple d'implication de différents miRNAs au cœur de différents réseaux et processus biologiques (d'après Garzon et al., 2010).**

En général, l'inhibition d'une cible par un miRNA n'est jamais de 100 % comme cela peut parfois être observé avec des siRNAs très efficaces (Schmiedel et al., 2015). Cependant, les miRNAs vont influencer fortement les voies de signalisation cellulaire et entraîner des réponses biologiques importantes. Cela peut s'expliquer par le fait que le miRNA peut réguler plusieurs cibles au sein d'une même voie de signalisation ou des cibles de deux voies de signalisation distinctes mais qui convergent vers la même réponse biologique (Bracken et al., 2016) (**Figure 39**).



**Figure 39 : Action d'un miRNA sur plusieurs cibles :** Les miRNAs peuvent affecter les processus biologiques par une régulation, à plusieurs niveaux, d'une voie de signalisation. Cette action conduit à un degré de régulation plus élevé que par le ciblage d'un seul gène (d'après Bracken et al., 2016).

Différents miRNAs peuvent aussi avoir une action combinée ou synergique en ciblant des gènes communs ou différents mais faisant partie d'une même voie de signalisation (Bracken et al., 2016).

Par exemple, le miR-21 et le miR-206 coopèrent pour réguler la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK (« Mitogen-activated protein kinase ») (**Figure 40**). Le miR-21 et le miR-206 vont inhiber ensemble les gènes SPRED1 (« Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1 ») et RASA1 (« RAS P21 Protein Activator 1 »). L'inhibition de ces protéines entraîne l'activation de la voie de signalisation oncogénique RAS et favorise la prolifération, la migration et la survie des cellules du cancer du sein triple négatif (Sharma et al., 2014).

Les miRs-193a-3p et -193a-5p sont sous exprimés dans le cancer du poumon non à petites cellules. Le miR-193a-3p régule l'expression d'*ERBB4* et de *SGK2* (« SGK2, Serine/threonine Kinase 2 »). Le miR-193a-5p régule l'expression de *PIK3R1* (« Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1 ») et mTOR. Leur coopération lors de leur ré-expression permet d'inactiver la voie AKT/mTOR et d'inhiber les métastases (Yu et al., 2015b) (**Figure 40**).

Au final, l'action multi-cibles ou la coopération entre différents miRNAs montrent que ceux-ci agissent sur des ensembles de cibles (Ooi et al., 2011). Ils se retrouvent ainsi au cœur de réseaux de signalisations et de communications complexes.

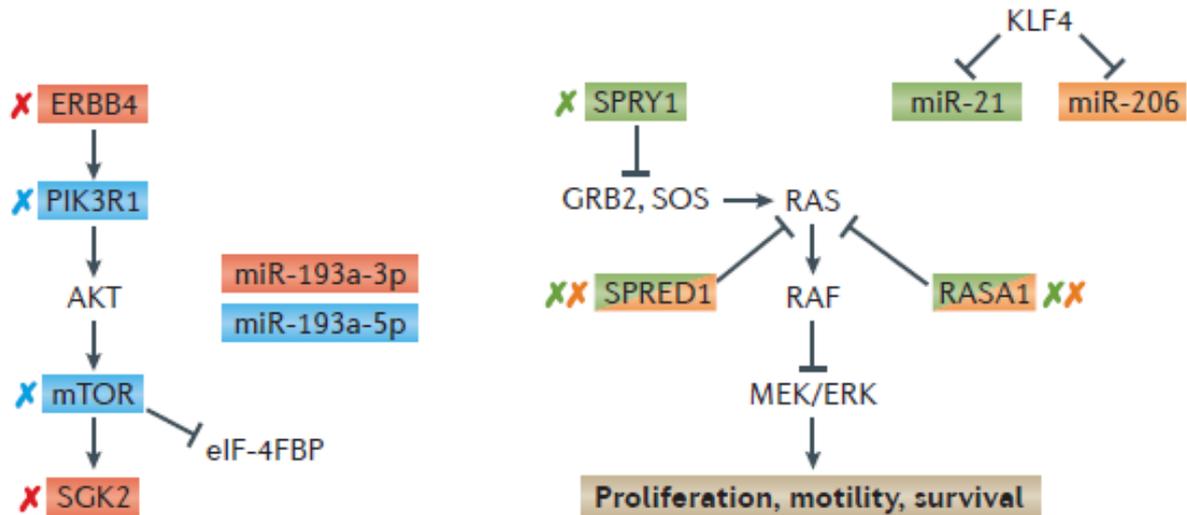


Figure 40 : Coopération de plusieurs miRNAs sur une même voie de signalisation (d'après Braken et al., 2016).

#### 4. Les miRNAs comme biomarqueurs tumoraux

Au niveau du rôle des miRNAs au sein des tumeurs, il a été mis en évidence qu'ils pouvaient se comporter, soit comme des oncogènes (oncomiR), soit comme des suppresseurs de tumeurs. Leur fonction varie en fonction du rôle de l'ARNm ciblé par les miRNAs. Grâce à différentes études de fonction, les scientifiques ont réalisé que ces petites molécules peuvent non seulement être des cibles pour le développement de nouvelles thérapies, mais aussi être des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la pathologie. Un diagnostic correct et rapide est fondamental pour un bon pronostic et une bonne réponse aux traitements anticancéreux (Hayes et al., 2014). A ce jour, le diagnostic d'un cancer repose majoritairement sur l'analyse histopathologique d'un échantillon de tumeur, obtenu par biopsie. Cette méthode est invasive et coûteuse, d'où le besoin d'améliorer les méthodes de diagnostic.

Une des stratégies est d'identifier les molécules qui sont spécifiquement liées aux maladies et pouvant être détectées dans des échantillons de fluides biologiques. Après la découverte des ARNs extracellulaires et circulants en 1948 par Mandel et Metais (Mandel and Metais, 1948), il a été mis en évidence que des acides nucléiques libres circulants (ADN/ARN) étaient présents chez des patients atteints de maladies auto-immunes (Tan et al., 1966). En 1977, Leon et ses collaborateurs (Leon et al., 1977) ont postulé pour la première fois sur le potentiel des ADNc (ADN circulants) comme biomarqueurs. En 2007, la présence de miRNAs dans le sang d'un patient atteint d'un lymphome a été mise en évidence (Lawrie et al., 2008). Une autre étude a permis d'observer une augmentation des taux des miRs-208b et -499 dans le sang de

patients ayant récemment subi un infarctus du myocarde (Corsten et al., 2010). Ils ont émis l'hypothèse que ce phénomène était lié à une libération passive de miRNAs dans les fluides corporels après une lésion des tissus, une apoptose cellulaire ou une nécrose. Par la suite, le champ d'observation des miRNAs circulants dans les fluides biologiques (sang, salive, urine) s'est élargi.

Valadi et ses collaborateurs ont d'abord révélé la présence de petits ARN (ARNm et miRNA) à l'intérieur des exosomes (ou nano-vésicules extracellulaires) utilisés pour la communication paracrine entre les cellules (Valadi et al., 2007). Ensuite, Hunter et son équipe ont mis en évidence la présence de miRNAs dans les exosomes circulants cette fois-ci dans le plasma des patients (Hunter et al., 2008). Les miRNAs circulants sont en fait conditionnés au sein d'exosomes, ce qui les rend très stables (Turchinovich et al., 2011, 2012). Les exosomes sont des petites vésicules membranaires de taille nanométrique (40-100 nm) d'origine endosomale et libérées par les cellules dans l'environnement extracellulaire. Ces nano-vésicules pourraient constituer une méthode de communication entre les cellules. En effet, à l'heure actuelle, les exosomes sont étudiés dans plusieurs processus cellulaires tels que la présentation d'antigènes aux cellules T et les métastases (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008). Pratiquement tous les types cellulaires sont capables de libérer des exosomes, et la composition lipidique et protéique des membranes vésiculaires peut être un indicateur de l'origine et de la fonction de l'exosome. Les miRNAs circulants au sein des exosomes pourraient donc servir de biomarqueurs des cancers (Wittmann and Jäck, 2010). Leur rôle précis devra toutefois être bien établi, ce qui n'est pas le cas à ce jour.

Ces dernières années, de nombreuses études ont été publiées sur la manière de détecter les miRNAs dans les fluides corporels dans le but de standardiser la détection des miRNAs à des fins d'outils de diagnostic clinique (Larrea et al., 2016; de Planell-Saguer and Rodicio, 2013). Le gold-standard est représenté par les méthodes d'amplification (Chen et al., 2005; Schmittgen et al., 2008), suivies par des méthodes basées sur l'hybridation (Hanna et al., 2012; Nelson et al., 2006) et les microarrays (Li and Ruan, 2009). Des méthodes plus récentes sont elles basées sur l'électrophorèse et la spectrométrie de masse (Khan et al., 2016). A cet égard, avant de transposer des technologies avancées comme le profilage sérique des miRNAs en clinique, il convient de normaliser ces techniques : utiliser les mêmes méthodes d'extraction, les mêmes miRNAs cibles et les mêmes fluides corporels.

Un autre aspect important, essentiel dans la détection de miRNAs diagnostiques/pronostiques, est de déterminer quels miRNAs sont spécifiques à chaque type de

cancer et de comprendre leurs rôles au sein de la progression tumorale. Plus précisément, déterminer s'ils ont un rôle oncogène ou suppresseur de tumeur.

Par exemple, le **miR-1** a été décrit comme un facteur important dans le développement des muscles squelettiques et myocardiques, et il agit comme suppresseur de tumeur dans plusieurs cancers (poumon, carcinome hépatocellulaire, colon ...). Le miR-1 est sous-exprimé dans l'ensemble de ces tumeurs malignes. Il a la capacité de cibler plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans le développement et la prolifération du cancer (Novello et al., 2013; Xu et al., 2014)

Au contraire, il existe aussi des miRNAs qui favorisent le développement et la progression tumorale. Le **miR-10b** est surexprimé dans plusieurs cancers. Il agit comme oncogène, en favorisant la migration et l'invasion des cellules (Ma et al., 2007).

## 5. Rôles des miRNAs au cours du développement des tissus osseux et cartilagineux

Comme nous l'avons mentionné, les miRNAs jouent un rôle dans les processus pathologiques, mais également physiologiques comme dans le développement osseux. L'ostéogenèse est un processus complexe caractérisé par une homéostasie entre la dégradation et la synthèse du tissu osseux. Cette homéostasie est régulée par deux types cellulaires majoritaires, les ostéoblastes et ostéoclastes. Cette activité est sous le contrôle d'un réseau de signalisation élaboré. Des études se sont penchées sur le rôle des miRNAs dans le développement osseux. Parmi les miRNAs découverts, 22 ont été identifiés comme inhibiteur de la voie de différenciation des ostéoblastes induite par la BMP-2 (« Bone morphogenetic factor-2 ») (Li et al., 2008). Au contraire, les **miR-378**, **miR-322** et **miR-196a** ont été identifiés comme étant impliqués dans la signalisation de la BMP-2 en favorisant la différenciation ostéogénique induite par la BMP-2. D'autres voies, comme la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, Notch et TNF- $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor ») impliquées dans l'ostéogenèse sont régulées par différents miRNAs favorisant la différenciation ostéogénique des CSMs (Peng et al., 2016). Par exemple, le **miR-346** favorise la différenciation ostéogénique des CSMs en ciblant la « Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  » (GSK-3 $\beta$ ), qui est essentielle dans l'activation de la  $\beta$ -caténine (Logan and Nusse, 2004). D'autres études indiquent que des niveaux élevés de miR-34a inhibent la voie de signalisation Notch, ce qui entraîne l'expression de *RUNX2*, *Ostérix* et *BGLAP* (« Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein »), qui sont indispensables à l'ostéogenèse (Sun et al., 2014a). Le **miR-21** favorise la différenciation ostéogénique des CSMs

tandis que le TNF- $\alpha$  qui inhibe la différenciation ostéogénique, inhibe également l'expression du miR-21 (Yang et al., 2013). D'autres miRNAs vont inhiber l'ostéogenèse des CSMs. Ainsi, l'expression du miR-206 diminue pendant la différenciation des ostéoblastes alors que sa surexpression inhibe la différenciation des ostéoblastes (Inose et al., 2009).

Il existe également des inducteurs et des inhibiteurs de miRNAs qui régulent le processus d'ostéoclastogenèse (Ji et al., 2016). Des études ont montré que les membres de la famille du **miR-29** sont surexprimés au cours de l'ostéoclastogenèse pour former des monocytes de moelle osseuse. Cette surexpression a également entraîné une augmentation des marqueurs des ostéoclastes comme la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP (« Tartrate-Resistant Acid Phosphatase »)) et la cathepsine K (Franceschetti et al., 2013). En revanche, l'inhibition du miR-223 a bloqué l'engagement et la migration des progéniteurs des ostéoclastes (Sugatani and Hruska, 2007).

Enfin, pour la chondrogenèse, des études récentes ont mis en évidence que le **miR-140**, régulé par *SOX9*, cible négativement l'histone désacétylase 4 (HDAC4), particulièrement exprimée dans les chondrocytes hypertrophiques. HDAC4 régule l'hypertrophie des chondrocytes en inhibant l'expression de *RUNX2*. Lorsque le miR-140 se lie à l'ARNm d'HDAC4, l'inhibition de l'expression de *RUNX2* est levée entraînant l'hypertrophie des chondrocytes, processus impliqué dans l'ossification endochondrale (Papaioannou et al., 2015). En revanche, le **miR-145** cible le gène *SOX9* pour inhiber l'expression des gènes spécifiques du cartilage et du miR-140 favorisant ainsi l'expression de *RUNX2* (Martinez-Sanchez et al., 2012).

Même si plusieurs miRNAs impliqués dans le développement physiologique des tissus osseux et cartilagineux ont été mis en évidence, de nombreux autres restent à découvrir. En ce qui concerne leur implication pathologique, il est de plus en plus clair que le schéma d'expression des miRNAs évolue au cours de la progression des tumeurs osseuses primaires comme le CS ou l'OS (Nugent, 2015).

## 6. MiRNAs et tumeurs osseuses primaires

### a. *MiRNAs et chondrosarcome*

Aujourd'hui, des études ont pu mettre en évidence un certain nombre de miRNAs dérégulés dans le CS (Chang et al., 2015; Palmiini et al., 2017; Pu et al., 2016; Yoshitaka et al., 2013) (**Tableau IV**). En revanche, les cibles des miRNAs ne sont pas toujours identifiées,

tandis que d'autres commencent à être bien connues. Pour le **miR-30a**, par exemple, il a été rapporté qu'il pourrait réduire la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales de CS (Lu et al., 2015). Son expression est également inversement corrélée avec le grade de la tumeur. Cela signifie que dans les stades avancés du CS, le niveau de miR-30a est très faible. Les auteurs ont mis en évidence que l'une des cibles du miR-30a était le gène *SOX4*. En résumé, l'étude a mis en évidence que le miR-30a joue un rôle suppresseur de tumeur en régulant l'expression de *SOX4* qui a lui un rôle potentiel d'oncogène dans les cellules de CS (Lu et al., 2015). Par la suite, une autre étude sur le miR-30a dans le CS a mis en évidence une régulation négative de *RUNX2* (Jiang et al., 2016).

*SOX9*, un autre membre de la famille des SOX, est surexprimé et impliqué dans le CS (Kamachi and Kondoh, 2013). Une étude a montré que l'inhibition de son expression augmente l'apoptose (Ikegami et al., 2011). L'un des gènes régulés par le facteur de transcription Sox9 est *ETV5* (« ETS Variant Transcription Factor 5 »), un effecteur de la TEM et une cible métastatique dans le cancer. Par ailleurs, une équipe a étudié la régulation de ces deux gènes et a découvert que le **miR-145**, dont le niveau d'expression est réduit dans le CS, cible et inhibe l'expression de *SOX9*. Cette inhibition de *SOX9* empêche l'expression en aval d'*ETV5*, qui lui-même n'induit plus l'expression de la MMP2 impliquée dans l'invasion tumorale. Par conséquent, le miR-145 inhibe le potentiel métastatique des cellules CS (Mak et al., 2015).

miRNA	Function in Chondrosarcoma	Gene Target
miR-30a	Inhibits cancer cell proliferation and invasion (Ts)	SOX4, RUNX2
miR-145	Inhibits tumour metastasis (Ts)	SOX9
miR-125b	Enhances tumour chemosensitivity (Ts)	ErbB2
miR-181a	Promotes cancer angiogenesis (Og)	VEGF
miR-126	Inhibits of cancer angiogenesis (Ts)	VCAM-1
miR-150	Promotes cancer angiogenesis (Og)	VEGF
miR-26a	Inhibits of cancer angiogenesis (Ts)	PIK3C2alpha/Akt/HIF-alpha pathway
miR-199a	Inhibits of cancer angiogenesis (Ts)	CCL5
miR-519d	Inhibits tumour metastasis (Ts)	MMP2
miR-218	Promotes COS progression (Og)	BM1
miR-185	Inhibits COS proliferation and invasion (Ts)	c-Met, DNMT1

Ts: Tumour suppressor; Og: Oncogene.

**Tableau IV : MiRNAs dérégulés dans le chondrosarcome (d'après Palmini et al., 2017).**

Les MMPs jouent un rôle déterminant dans la dissémination des métastases. Plusieurs études ont rapporté que parmi les MMPs, la MMP-2 serait la plus critique car elle dégrade le collagène de type IV qui compose les lames basales (Stetler-Stevenson, 2001). Tsai et ses collaborateurs ont aussi apporté la preuve que le potentiel migratoire du CS augmentait significativement en cas de surexpression de MMP-2 et que les niveaux concomitants du miR-

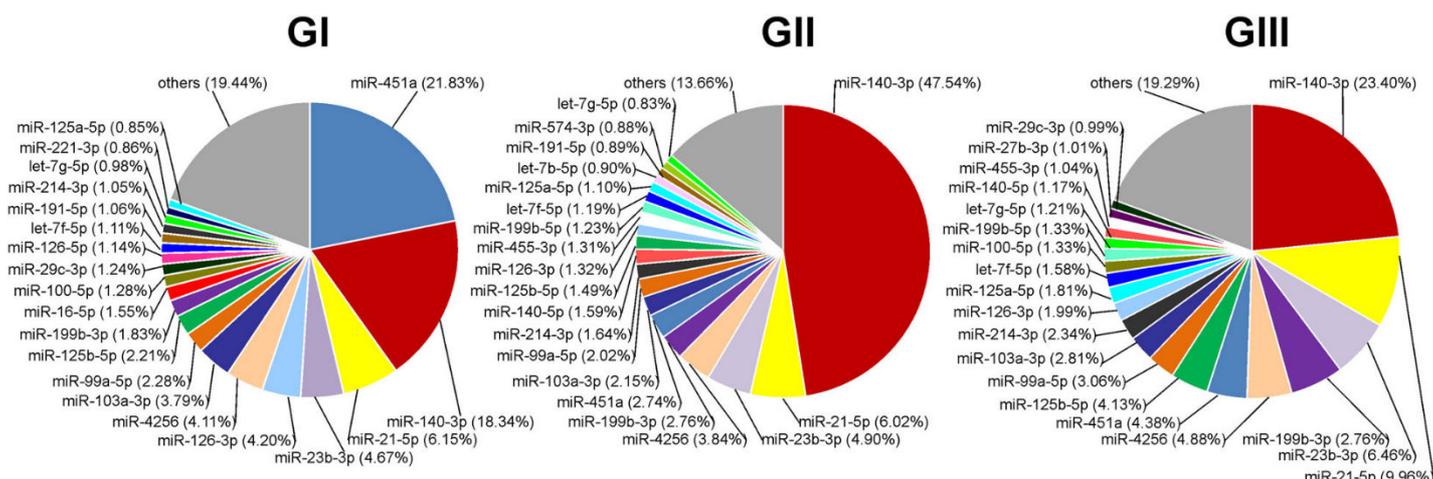
519d étaient très faibles. Lorsque les niveaux d'expression du **miR-519d** sont rétablis, l'expression de MMP-2 et la capacité invasive de la tumeur diminuent (Tsai et al., 2015).

Le **miR-125b** pourrait agir comme suppresseur de tumeur en inhibant le métabolisme glucidique et en ciblant l'oncogène *ErbB2* « Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase » (Guo et al., 2016). Le miR-125b est régulé négativement dans toutes les lignées cellulaires de CS résistantes à la doxorubicine. En revanche, la surexpression du miR-125b permet de restaurer la sensibilité des cellules à cet agent chimiothérapeutique (Guo et al., 2016).

Un autre aspect important de la physiopathologie du CS concerne la réponse des cellules cancéreuses à l'hypoxie. Il a été montré que l'hypoxie et les facteurs HIFs pouvaient influencer l'angiogenèse mais également la synthèse de certains miRNAs (Bandara et al., 2017). Une équipe s'est intéressée au processus d'angiogenèse dans le CS et notamment à la chimiokine CCL5 (« Chemokine (C-C motif) ligand 5 ») qui induit une régulation positive de VEGF. Ce phénomène induit également une régulation négative du **miR-199a** (Liu et al., 2015). En fait, cette équipe a démontré que la transfection du miR-199a dans les cellules de CS supprime complètement l'expression de VEGF modulée par CCL5.

Le rôle oncogène des miRNAs a également été étudié. Par exemple, une étude a mis en évidence une forte augmentation du niveau d'expression du **miR-211** dans des biopsies de CS par rapport aux tissus sains adjacents (Chen et al., 2020). Ce niveau d'expression était corrélé au grade tumoral et à un mauvais pronostic pour le patient. Par ailleurs, les chercheurs ont transfecté le miRNA-211 mimétique ou son inhibiteur dans les cellules de la lignée de CS SW1353. Ils ont mis en évidence que le miR-211 mimétique augmente la prolifération, la migration et l'invasion des cellules SW1353, tandis que l'inhibiteur du miR-211 induit les effets inverses. Ils ont aussi identifié VHL comme une cible directe du miR-211 (Chen et al., 2020).

L'étude de Parafioriti et al. a dressé récemment le profil d'expression des miRNAs dans les CS centraux selon leur grade tumoral (Parafioriti et al., 2020). Ainsi, le séquençage des miRNAs par NGS (« Next-Generation Sequencing ») a été effectué à partir d'une cohorte de 9 patients atteints de CS centraux conventionnels validés histologiquement, comprenant 2 CS de grade I, 3 CS de grade II et 4 CS de grade III (**Figure 41**).



**Figure 41 : Les 20 miRNAs les plus abondants exprimés dans les chondrosarcomes centraux conventionnels de grades I, II et III.** Les secteurs colorés des diagrammes circulaires identifient chaque miRNA dans les échantillons de grade I, grade II, et grade III. Le pourcentage d'expression rapporté pour chaque miRNA est calculé sur le total des miRNAs identifiés dans chaque groupe. D'après Parafioriti *et al.*, 2020.

La figure 41 montre les 20 miRNAs les plus abondamment exprimés pour les CS de grade I, grade II et grade III de la cohorte. Ils représentent environ 80% des miRNAs les plus exprimés dans chaque grade. La plupart de ces 20 miRNAs sont les mêmes pour les 3 grades. Parmi eux, le **miR-140-3p** était le miRNA le plus abondant dans les groupes grade II (47,5%) et grade III (23,4%) et le deuxième plus abondant dans les échantillons de grade I (18,3%). Ce miRNA est régulé positivement par Sox9 durant la différenciation cartilagineuse. Le **miR-451a** était le plus abondant (21,8%) dans les échantillons de grade I. Il a une activité suppresseur de tumeur dans beaucoup de cancers et il diminue la chimiorésistance en ciblant l'ARNm de *MDR1*. Le **miR-21-5p** est un oncomiR sur-exprimé dans les 3 grades de CS (6 à 10%), comme dans de nombreux cancers (Parafioriti *et al.*, 2020). D'après l'étude *in silico*, les auteurs indiquent que les miRNAs sur-exprimés dans les grades II et III par rapport au grade I ciblent la phase d'exécution de l'apoptose, les interactions avec le syndécane, la voie de signalisation de l'IFN, et la régulation de l'expression et de l'activité de RUNX1. Les miRNAs sous-exprimés dans les grades II et III par rapport au grade I ciblent des voies oncogéniques potentielles (signalisations de ERBB2, de l'insuline et de Wnt, et l'activation des MAPK).

### *b. MiRNAs et ostéosarcome*

Le rôle des miRNAs dans les OS a été plus étudié que pour le CS.

Ainsi, un grand nombre de miRNAs agissant comme des **suppresseurs de tumeur** ont été identifiés (**Tableau V**). Parmi ceux-ci, le **miR-26a** est un miRNA impliqué dans

l'ostéogénèse (Li et al., 2013b) et dans la différenciation de plusieurs types cellulaires comme les cellules pancréatiques (Fu et al., 2013) et les cellules du muscle squelettique (Dey et al., 2012). Il a été démontré que le taux d'expression du miR-26a est diminué par les cellules souches cancéreuses dérivées de l'OS. De plus, sa surexpression permet d'inhiber la prolifération et la croissance des cellules tumorales d'OS (Lu et al., 2017).

Le **miR-491-5p** est sous exprimé dans l'OS (Yin et al., 2017). Sa surexpression inhibe la croissance tumorale et induit l'apoptose en ciblant négativement le gène *FOXP4* (« Forkhead Box P4 »). Une autre étude a montré que le miR-491-5p agit aussi négativement sur la prolifération des cellules d'OS en ciblant PKM2 (« Pyruvate Kinase Muscle 2 ») (Chen et al., 2018a).

miRNA	Function in Osteosarcoma	Gene Target
miR-26a	Loss of stem like properties in CSCs (Ts)	Jagged1
miR-491-5p	Inhibit tumour growth and metastasis (Ts)	FOXP4
miR-192	Inhibit tumour progression (Ts)	TCF7
miR-22	Inhibit lipid metabolism, cell proliferation and invasion (Ts)	ACLY
miR-205	Inhibit cell proliferation and metastasis Increase of the apoptotic cell rate (Ts)	RUNX2 TGF $\alpha$
miR-506	Inhibit cell proliferation Enhance apoptosis (Ts)	AEG-1
miR-497	Enhance apoptosis Inhibit cell proliferation and metastasis (Ts)	AMOT
miR-34a	Inhibit tumor progression Inhibit metastasis(Ts)	Survivin
miR-203	Inhibit tumor progression Inhibit metastasis (Ts)	Survivin
miR-193-3p	Inhibit metastasis (Ts)	Rab27B
miR-193-5p	Inhibit metastasis (Ts)	SRR
miR-143	Inhibit tumor growth (Ts)	Bcl-2
miR-182	Enhance apoptosis Inhibit invasion process (Ts)	PDCD4
miR-198	Inhibit cell proliferation and invasion (Ts)	ROCK1
miR-874	Inhibit of tumor growth (Ts)	E2F3
miR-4262	Inhibit tumor invasion (Ts)	OPN
miR-101	Inhibit cell proliferation and invasion (Ts)	c-FOS
miR-409-3p	Inhibit cell invasion and metastasis (Ts)	Rho GTPases
miR-124	Inhibit cell proliferation and invasion (Ts)	SPHK1 B7-H3
miR-133a	Inhibit tumor growth (Ts)	AKT/ERK signaling pathway
miR-223	Inhibit cell invasion (Ts)	Ect2
miR-363	Inhibit cell growth and metastasis (Ts)	MAP2K4

Ts: Tumor suppressor; CSCs: Cancer stem cells.

**Tableau V : MiRNAs suppresseurs de tumeurs dans l'ostéosarcome (d'après Palmini et al., 2017).**

Le **miR-205** est également un miRNA suppresseur de tumeur (Zhang et al., 2016). Sa transfection inhibe la prolifération dans les lignées cellulaires d'OS. Il cible le gène *RUNX2*, gène clef de l'ostéogenèse (Chen et al., 2011c).

Certains miRs sont considérés comme des **oncogènes**. Ainsi, le **miR-19a-3p** est surexprimé dans l'OS. Il cible *PTEN*, un gène suppresseur de tumeur. Son inhibition a permis de rétablir l'expression de *PTEN*, ce qui conduit à une diminution de la prolifération cellulaire, favorise l'apoptose, et augmente la sensibilité des cellules d'OS au cisplatine (Zhang et al., 2018).

Le **miR-21** agit aussi comme un oncogène et est surexprimé dans la lignée d'OS MG63. Il est impliqué dans la régulation de la progression tumorale en ciblant également *PTEN* (Lv et al., 2016). Un autre miRNA, le **miR-130** cible aussi *PTEN*. Sa transfection *in vitro* sur différentes lignées cellulaires d'OS induit une augmentation de la prolifération, de l'invasion et de la migration. De plus, lorsque l'expression de *PTEN* est inhibée dans l'OS, l'expression du miR-130 augmente et inversement. Cette étude montre à la fois le rôle oncogène du miR-130 et son lien avec *PTEN* (Chen et al., 2016).

D'autres miRNAs, au contraire, inhibent la **chimiorésistance et la radiorésistance** des OS (Palmini et al., 2017; Song et al., 2009) (**Tableau VI**).

En ce qui concerne une induction de la radiosensibilité par les miRs, une équipe a découvert que le **miR-328-3p** est sous-exprimé dans l'OS et sa surexpression rétablit la radiosensibilité des cellules. Le miR-328-3p inhibe la prolifération et favorise l'apoptose induite par l'irradiation. L'étude a montré que l'histone H2AX est une cible directe du miR-328-3p (Yang et al., 2017). Le **miR-513a-5p** rétablit aussi la sensibilité des cellules aux rayons ionisants (Dai et al., 2018).

De nombreux patients atteints d'OS présentent aussi une résistance à la chimiothérapie. Des investigations se sont donc intéressées aux mécanismes impliqués dans cette résistance et le rôle des miRNAs dans la résistance. Ainsi, le **miR-92a** ciblant Notch permet également d'augmenter la sensibilité des cellules d'OS au cisplatine (Liu et al., 2018). Un autre miRNA, le **miR-34a** augmente la sensibilité au cisplatine en favorisant l'activation des voies de signalisation c-myc et Bim (Li et al., 2017). La transfection par le **miR-340** permet aussi de réduire la résistance des cellules au cisplatine en ciblant ZEB1 (« Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 ») (Yan et al., 2018). Une autre étude a également montré qu'après le traitement des cellules d'OS par le cisplatine et la doxorubicine, l'expression du **miR-140-5p** augmente.

Ce miRNA cible l'inositol 1,4,5-triphosphate kinase 2 (IP3k2). Il stimule l'autophagie et augmente la mort des cellules (Wei et al., 2016).

miRNA	Function in Osteosarcoma—Response to Therapies	Gene Target
miR-513a-5p	Induce radiosensitivity (Ts)	APE1
miR-21	Increase cell proliferation Promote chemosensitivity to Cis (Og)	Spry1Spry2
miR-224	Inhibit cell proliferation and migration Increase sensitivity to Cis (Ts)	Rac1
miR-138	Inhibits cell proliferation and migration Increases chemosensitivity to Cis (Ts)	EZH2
miR-367	Promotes metastasis and EMT Induce chemoresistance to Adr (Og)	Bax, Cleaved Caspase-3 KLF4
miR-140-5p	Induces cell apoptosis Decreases the chemoresistance (Ts)	IP3k2
miR-184	Inhibits cell apoptosis Promotes chemosensitivity to Dox (Og)	BCL2 L1

Ts: Tumour suppressor; Og: Oncogene; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; Cis: Cisplatin; Adr: Adriamycin; Dox: Doxorubicin.

**Tableau VI : Rôles des miRNAs dans l'ostéosarcome en réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie (d'après Palmi et al., 2017).**

L'ensemble des miRNAs présentés ci-dessus est une liste non exhaustive des miRNAs étudiés dans les sarcomes osseux. Ces études ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour développer de nouveaux médicaments anti-cancéreux. En outre, les miRNAs sont apparus comme des molécules qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques.

## IV. Utilisation de miRNAs thérapeutiques

### 1. Le potentiel thérapeutique des miRNAs et les limites à leur utilisation

Comme nous l'avons vu précédemment, les miRNAs sont exprimés de façon aberrante dans un grand nombre de pathologies, y compris les cancers. Naturellement, ils se sont donc imposés comme des cibles ou des agents thérapeutiques particulièrement intéressants. En effet, un miRNA possède la capacité à inhiber l'expression de nombreux gènes parfois impliqués dans les mêmes processus biologiques. L'inhibition d'un seul de ces gènes ne permet pas toujours d'être suffisant pour inhiber le processus biologique ciblé, alors qu'une inhibition de plusieurs points de la voie de signalisation permettrait une inhibition beaucoup plus effective du processus biologique. L'utilisation de miRNAs semble donc une approche prometteuse face aux cancers, puisque de multiples voies sont impliquées dans la résistance des cellules aux traitements conventionnels. Néanmoins, l'utilisation de miRNAs nécessite une connaissance approfondie de ses cibles pour éviter des effets hors cibles.

L'utilisation *in vivo* de miRNA en clinique est une perspective encore lointaine. De nombreuses barrières doivent être surmontées auparavant. Pour que le miRNA soit efficace d'un point de vue clinique, il est primordial d'augmenter sa stabilité, notamment dans les fluides. En effet, les miRNAs synthétiques, et plus particulièrement les anti-miRs, sont très sensibles aux nucléases présentes dans les fluides biologiques. De plus, les miRNAs sont soumis à la filtration glomérulaire et à l'élimination dans les urines. Ainsi, les miRNAs synthétiques mimétiques administrés chez une souris sont éliminés seulement en 30 minutes après leur injection dans le sang (Trang et al., 2011). Des modifications structurelles ou chimiques s'imposent pour augmenter/ protéger la durée de vie des miRNAs.

Un autre enjeu majeur de l'utilisation des miRNAs synthétiques en clinique est la délivrance efficace de ces outils thérapeutiques et surtout une délivrance spécifique dans les tissus. Chaque miRNA affecte un nombre important de cibles différentes et ils possèdent également des effets tissus spécifiques. Il est donc important de contrôler leur délivrance pour limiter au maximum les effets secondaires possibles : des effets hors cibles. Il est judicieux, dans le cadre des traitements de tumeurs de tester également l'effet de ces miRNAs sur le tissu tumoral mais également sur le tissu sain environnant de la tumeur. Par exemple, pour le CS, cela implique de tester également l'effet des miRNAs sur les chondrocytes non tumoraux.

## 2. Les différentes stratégies d'utilisation des miRNAs *in vivo*

Les miRNAs peuvent avoir un rôle dans la progression tumorale (oncomiRs) ou au contraire inhiber la progression tumorale (miRs dits « suppresseur de tumeurs »). Deux stratégies peuvent donc être employées afin de rétablir les expressions normales de miRNAs. Les miRNAs oncogéniques peuvent être inhibés ou, au contraire, les miRNAs suppresseur de tumeurs peuvent être ré-exprimés dans les cellules cancéreuses (Iorio and Croce, 2012) (Tableau VII).

miRNAs	Diseases	Important mRNA targets	Preclinical models	In vivo delivery systems
<b>miRNAs with tumour suppressive function (miRNA mimics as therapeutics)</b>				
let-7 family	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solid tumours (e.g. breast, colon, ovarian, lung, liver and glioma)</li> <li>• B cell lymphoma</li> </ul>	MYC, BCLXL, pan-RAS, EZH2, HMGA2, FAS, P21, PGRMC1 and DICER1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lung cancer (orthotopic)<sup>107</sup></li> <li>• Kras<sup>G12D</sup> GEM<sup>109</sup></li> </ul>	Neutral lipid emulsions
miR-34a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solid tumours (e.g. lung, liver, colon, brain, prostate, pancreatic, bladder and cervical)</li> <li>• Myeloma</li> <li>• B cell lymphoma</li> </ul>	BCL2, MET, MYC, CDK6, CD44, SRC, E2F1, JAG1, FOXP1, PDGFRA, PDL1 and SIRT1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lung cancer (xenograft and orthotopic)<sup>107</sup></li> <li>• Kras<sup>G12D</sup> GEM<sup>109</sup></li> <li>• Pancreatic cancer (orthotopic)<sup>108</sup></li> <li>• Prostate cancer (orthotopic)<sup>37</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipid nanoparticles</li> <li>• Neutral lipid emulsions</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-143</li> <li>• miR-145</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solid tumours (e.g. bladder, lung, breast, colon, pancreas, cervical, and head and neck)</li> <li>• Lymphoid leukaemia</li> </ul>	KRAS, ERK5, VEGF, NFKB1, MYC, MMPs, PLK1, CDH2 and EGFR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colon cancer (orthotopic)<sup>190</sup></li> <li>• Pancreatic cancer (orthotopic)<sup>191</sup></li> </ul>	Liposomes, PEI
miR-200 family	Solid tumours (e.g. breast, ovarian and lung)	ZEB1, ZEB2, BMI1, SUZ12, JAG1, SOX2, SP1, CDH1 and KRAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lung cancer (orthotopic)<sup>61,111</sup></li> <li>• Ovarian cancer (orthotopic)<sup>61</sup></li> <li>• Breast cancer (orthotopic)<sup>61</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liposomes</li> <li>• DOPC neutral lipid system</li> </ul>
<b>OncomiRs (antimiRs as therapeutic agents)</b>				
miR-10b	Solid tumours (e.g. breast and glioma)	NF1, CDH1, E2F1, PIK3CA, ZEB1 and HOXD10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glioblastoma (orthotopic)<sup>116</sup></li> <li>• Breast cancer (orthotopic)<sup>101</sup></li> </ul>	Locked nucleic acid antimiRs
miR-155	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solid tumours (e.g. liver, lung, kidney, glioma and pancreas)</li> <li>• B cell lymphoma</li> <li>• Lymphoid leukaemia</li> </ul>	SHIP, SPI1, HDAC4, RHOA, SOCS1, BCL2, JMJD1A, SOX6, SMAD2, SMAD5 and TP53INP1	Lymphoma miR-155 overexpressing GEM <sup>185,119</sup>	pHLIP-conjugated antimiR
<ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-221</li> <li>• miR-222</li> </ul>	Solid tumours (e.g. liver, pancreas and lung)	CDKN1B, CDKN1C, BMF, RB1, WEE1, ARAF1, ANXA1 and CTCF	Liver cancer (HCC xenograft) <sup>118</sup>	Cholesterol-conjugated antimiR

**Tableau VII : Sélection de miRNAs impliqués dans les cancers et leurs utilisations thérapeutiques dans des modèles précliniques (d'après Rupaimoole & Slack, 2017).**

### a. Inhibition des miRNAs oncogéniques

Plusieurs miRNAs avec des fonctions oncogéniques ont été mis en évidence comme le miR-155, le miR-221 et le miR-210 (Rupaimoole and Slack, 2017). Par exemple, le **miR-155** agit comme un oncomiR puissant dans les lymphomes et dans plusieurs types de tumeurs solides (Rupaimoole and Slack, 2017). Il régule négativement l'expression de *SHIP1* (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1) qui code un modulateur des réponses immunitaires. Il régule aussi l'expression de la kinase WEE1, qui est un régulateur du cycle cellulaire qui joue un rôle important dans les réponses aux dommages à l'ADN, et de

nombreux autres gènes impliqués dans l'homéostasie cellulaire. En outre, le miR-155 régule négativement l'expression du suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL), une protéine impliquée dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. La diminution d'expression de VHL entraîne une augmentation de l'angiogenèse et facilite la survie des cellules cancéreuses (Kong et al., 2014). Au vu de ses nombreux effets oncogènes, l'inhibition du miR-155 avec l'antimiR-155 (MRG-106, miRagen Therapeutics) a fait partie d'un essai clinique (NCT02580552) en 2016 sur des patients atteints d'un lymphome cutané à cellules T (Reshetnyak et al., 2006). Les résultats définitifs de la phase I sont attendus pour décembre 2020.

Différents outils ont donc été développés pour interférer avec les effets des miRs ou diminuer leur effet, parmi lesquels figurent les masques de miRNAs, les anti-miRNAs, les éponges à miRNAs ou encore de petites molécules inhibitrices.

- **Les masques à miRNAs**

Les masques à miRNAs sont constitués d'oligonucléotides anti-sens (ASO) monocaténaux modifiés masquant les ARNm (Choi et al., 2007). Ils vont se lier spécifiquement et de façon totalement complémentaire à un ARNm cible du miRNA. Ces oligonucléotides simples brins complémentaires de la région 3'UTR des ARNm entrent en compétition avec les miRNAs (Wang, 2011).

Les ASO sont modifiés en remplaçant l'oxygène non portants du groupe des phosphates par du soufre, générant ainsi des nucléotides phosphorothiorés (**Figure 41**). Cette modification augmente la stabilité des ASO à l'intérieur des cellules (en rendant les liaisons inter-nucléotidiques résistantes à la dégradation par les nucléases), tout en conservant une activation suffisante de la RNase H pour le clivage de l'ARNm cible et la fonction de suppression de l'expression du gène cible (Rupaimoole and Slack, 2017). Les modifications supplémentaires des ASO qui ont été testés comprennent l'ajout d'un groupe 2'-O-méthyl aux nucléotides phosphorothiorés. Cette modification améliore la liaison avec l'ARNm cible, une résistance significative aux nucléases et une plus grande stabilité *in vivo* (Geary et al., 2001).

- **Les antimiRs**

Pour parvenir à une perte de fonction des miRNAs, des oligonucléotides anti-miRs chimiquement modifiés ont été développés (Garzon et al., 2010; Weiler et al., 2006). Les antimiRs sont structurellement similaires aux ASO. La propriété mise en avant pour ces oligonucléotides est leur spécificité et leur grande affinité de liaison aux miRNAs cibles qui leur permet d'induire un blocage fonctionnel du miRNA ciblé (Rupaimoole and Slack, 2017).

Des études ont examiné différents types de modifications des antimiRs qui avaient été précédemment développés pour les ASO. Par exemple, une modification 2'-O-méthoxyéthyl de l'anti-miR-122 a permis d'améliorer la modulation de la cible par rapport aux antimiRs non modifiés (Esau et al., 2006). Un antimiR modifié par un « peptide d'insertion à faible pH » (pHLIP ; **Figure 42**) a aussi été utilisé pour inhiber l'oncomiR miR-155 dans les lymphomes (Babar et al., 2012). Ces acides nucléiques conjugués à des peptides pénètrent dans les cellules cancéreuses *in vivo* en profitant du faible pH du microenvironnement de la tumeur. Ce faible pH entraîne un changement conformationnel du pHLIP permettant son insertion dans la membrane de la cellule cancéreuse. Lors de l'insertion dans les cellules, la libération de l'antimiR est facilitée par le clivage de la liaison disulfure dans le cytosol (Rupaimoole and Slack, 2017).

D'autres modifications structurales existent avec des antimiRs modifiés avec des LNA (« Locked Nucleic Acid ») dont le but est aussi de renforcer la stabilité des oligonucléotides (**Figure 42**) (Vester and Wengel, 2004).

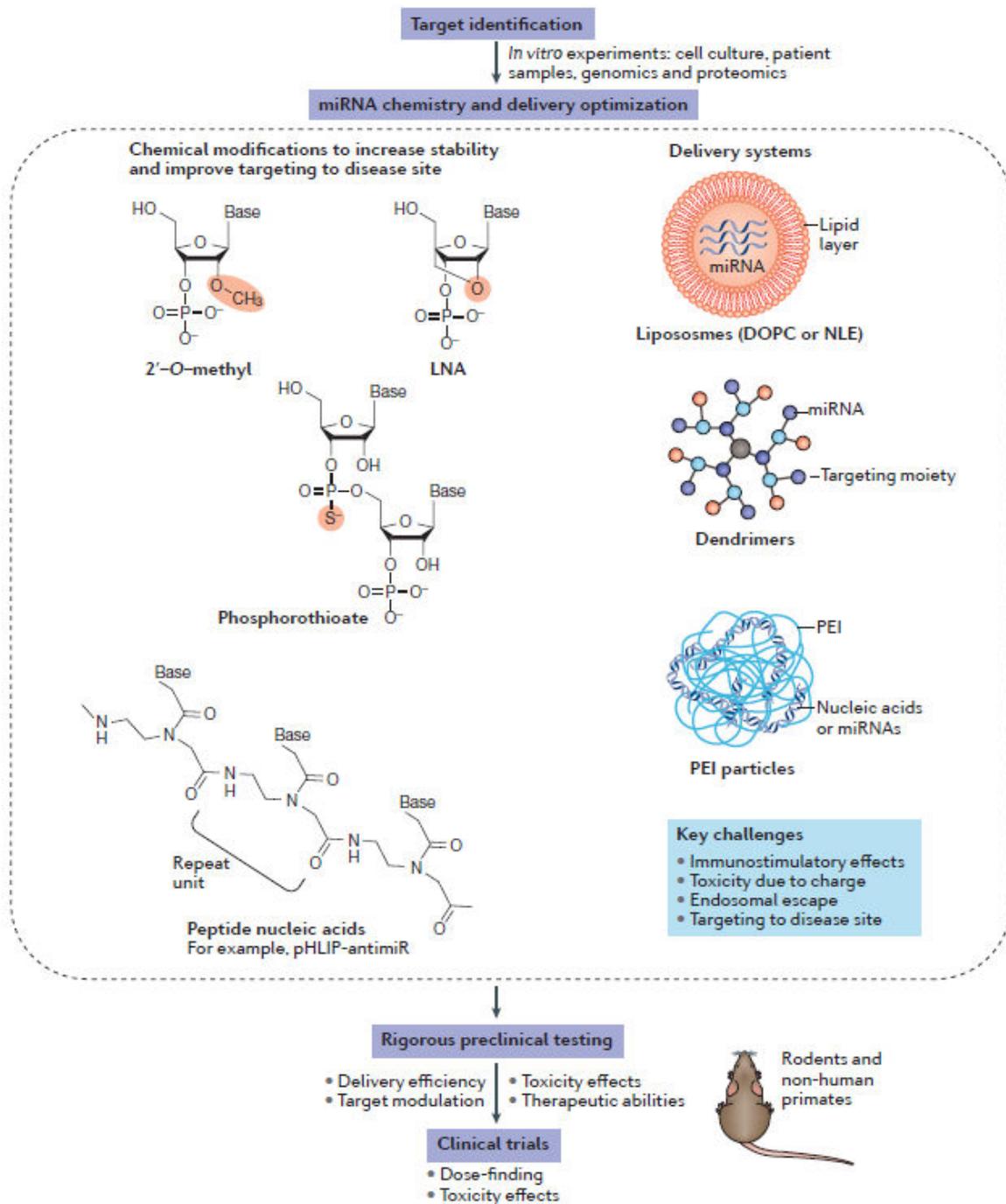
- **Les éponges à miRNAs**

Une approche intéressante pour inhiber l'action des miRNAs est de saturer leurs liaisons avec des ARNm cibles compétiteurs (Ebert et al., 2007). Des transgènes inhibiteurs de miRNAs ont été développés, appelés « éponges à miRNAs ». Ces éponges contiennent de multiples sites de fixation pour les miRNAs endogènes. De ce fait, la probabilité que les miRNAs endogènes atteignent leur ARNm cible est diminuée. L'avantage de ces éponges est leur capacité à piéger plusieurs miRNAs d'une même famille ayant une « seed région » identique (Ebert et al., 2007). Ces éponges se sont révélées plus efficaces que les antimiRs.

Plus récemment, il a été découvert que les longs ARNs non codant (lncRNA) pouvaient, en plus de réguler l'expression de nombreux gènes, jouer un rôle d'éponge à miRNAs (Lin, 2020).

- **Les SMIRs**

Les SMIRs (« Small Molecule Inhibitor to target specific miRNAs ») vont inhiber la production de miRNAs en agissant sur leur voie de biosynthèse (Melo et al., 2011).



**Figure 42 : Résumé des étapes clés pour le développement de miRNAs thérapeutiques (d'après Rupaimoole 2017).**

*b. Réexpression des miRNAs suppresseurs de tumeurs*

Les miRNAs suppresseur de tumeurs sont en général sous-exprimés dans les tissus cancéreux. Dans ce cas, des miRNAs synthétiques appelés miRNAs mimétiques peuvent être ré-introduits dans les tissus atteints pour rétablir l'expression normale des miRNAs (Bader et al., 2010). Ces miRNAs synthétiques sont des ARNs double-brins, le brin guide est identique

au miRNA suppresseur de tumeur dont l'expression est perdue. Le brin passager subira quelques modifications chimiques afin d'être plus stable. Les miRNAs mimétiques sont aussi pris en charge par le complexe RISC pour pouvoir réguler l'expression génique. Parmi les miRs dérégulés dans le cancer, certains ont particulièrement retenus l'attention comme la famille du miR-34 (Rupaimoole and Slack, 2017). Le **miR-34a**, l'un des membres de la famille le plus étudié, joue un rôle dans l'apoptose. Son réseau d'ARNm cibles affecte l'expression de protéines du cycle cellulaire, telles que la kinase 4 dépendante des cyclines (CDK4) et CDK6, des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et des protéines liées aux métastases telles que NOTCH, c-Myc et AXL (« Tyrosine-protein kinase receptor UFO ») (Rupaimoole and Slack, 2017). Etant donné le grand nombre d'ARNm oncogènes dont l'expression est diminuée par le miR-34, une grande attention a été portée aux thérapies destinées à rétablir l'expression du miR-34 au sein des cellules cancéreuses en clinique (Bader, 2012).

L'utilisation des miRNAs mimétiques est plus délicate que celle des anti-miRs. En effet, il a été émis l'hypothèse que l'on pourrait se retrouver dans une situation de déséquilibre stoechiométrique avec un plus grand nombre de miRNAs mimétiques par rapport au nombre de complexes RISC disponibles (Grimm et al., 2006). Ce déséquilibre pourrait saturer la machinerie enzymatique et donc conduire à limiter l'efficacité des miRNAs mimétiques suppresseurs de tumeurs.

### 3. Système de délivrance de miRNAs thérapeutiques

De nombreuses barrières se dressent face à l'utilisation des miRNAs thérapeutiques en clinique (van Rooij and Kauppinen, 2014; Rupaimoole and Slack, 2017). Leur délivrance spécifique au tissu cible impose un certain nombre de contraintes. De nombreux systèmes de vectorisation ont été mis en place afin d'assurer une administration la plus correcte des miRNAs synthétiques (Rupaimoole and Slack, 2017) (**Figure 42**).

#### ▪ Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux ont l'avantage d'avoir une excellente efficacité en tant que vecteurs de délivrance (Collins et al., 2008). Cependant, les vecteurs viraux actuels posent plusieurs problèmes. En termes d'utilisation pratique, il existe des différences de rendement de production, des restrictions de taille des transgènes dans certains vecteurs viraux, des réponses immunologiques de l'organisme anti-vecteurs qui limitent leur utilisation. De plus, plusieurs cellules cancéreuses humaines sont dépourvues de récepteurs viraux et ne peuvent donc pas

être sensibles à ce type d'approche (Thomas et al., 2003). D'un point de vue de la sécurité sanitaire, de nombreux virus sont toxiques et provoquent des réactions systémiques lors d'essais cliniques. En effet, certains essais ont mis en évidence des craintes concernant l'intégration de vecteurs viraux dans le génome (qui a entraîné des cas de leucémie) et des réponses immunitaires mortelles (Thomas et al., 2003; Yamamoto and Curiel, 2005).

- **Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA)**

Les PLGA sont des polymères largement utilisés pour la délivrance de petits ARN *in vivo*. Ces polymères ont une faible cytotoxicité en raison de leur charge neutre. Le taux de délivrance des molécules d'ARN peut être contrôlé en modifiant la composition des particules de PLGA (Blum and Saltzman, 2008; Rupaimoole and Slack, 2017). Le PLGA est utilisé en clinique pour des sutures biodégradables et il présente un profil de sécurité élevé. Cependant, ses limites incluent un faible taux de charge en siRNA ou miRNA. Une étude a utilisé une technique de double émulsion combinant un lipide cationique amphiphile, le BHEM-cholesterol, et des particules de PLGA, qui a permis d'augmenter l'efficacité d'incorporation de l'ARN interférent (Yang et al., 2011).

- **Emulsions Lipidiques Neutres (ELN) et 1,2-dioléosyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)**

Parmi les systèmes de distribution à base de lipides, les ELN constituent une proportion significative des véhicules testés. Les ELN sont composées de 1,2-dioléosyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) qui sont des liposomes à charge neutre, d'huile de squalène, de polysorbate et d'antioxydants. Ce sont des nanoparticules à charge neutre et à faible toxicité (Trang et al., 2011). L'efficacité d'administration des ELN et DOPC aux sites tumoraux reste néanmoins limité. Les DOPC sont passées à la phase I des essais cliniques pour les approches à base de siRNA (NCT01591356)

- **“EnGeneIC Delivery Vehicle nanocells” (EDV)**

Les EDV, également appelés TargomiR sont des particules de 400 nm dérivés de bactéries (Rupaimoole and Slack, 2017). Ce sont des mini-cellules non viables produites par la dépressurisation des sites polaires de division cellulaire dans les bactéries. Il a déjà été démontré auparavant la capacité de ces EDV à distribuer des agents chimiothérapeutiques. Ils ont été modifiés avec des anticorps conjugués à leur surface, tels des anticorps anti-EGFR, pour

permettre un ciblage spécifique des sites de la pathologie (MacDiarmid et al., 2007; Taylor et al., 2015).

- **Polyéthylèneimine synthétique (PEI)**

Le PEI est l'un des polymères de première génération étudiés pour la délivrance d'acides nucléiques (Akhtar and Benter, 2007). Après la formation d'un complexe avec des acides nucléiques, la PEI conserve une petite charge positive qui lui permet d'adhérer à la membrane cellulaire chargée négativement et de subir l'endocytose (Rupaimoole and Slack, 2017).

- **Poly(Ethylene Glycol) (PEG)**

Le PEG est un polymère synthétique qui convient bien aux applications biomédicales en raison de sa grande solubilité dans les milieux aqueux, de sa biocompatibilité et de sa bonne tolérance. Les médicaments conjugués au PEG sont approuvés par la FDA. C'est l'un des systèmes de délivrance de siRNA les plus avancés actuellement, et des essais cliniques sont en cours (Rupaimoole and Slack, 2017). Les acides nucléiques sont conjugués au PEG *via* une liaison disulfure (Kim et al., 2006). Ces particules ont montré une efficacité supérieure au système PEI. Ces conjugués ont ensuite été modifiés par une liaison à la cyclodextrine, un polymère de glucose qui a été largement utilisé dans des formulations médicales ; et les molécules résultantes ont été utilisées dans le premier essai clinique utilisant des siRNAs anti-cancéreux. L'essai a malheureusement été interrompu en raison d'une toxicité limitant la dose (Davis et al., 2010).

- **Les dendrimères**

Les dendrimères sont des acides nucléiques conjugués à la poly(amidoamine) ou à la poly(propylèneimine) (Rupaimoole and Slack, 2017). Ces molécules ont montré une grande efficacité dans la délivrance d'acides nucléiques tels que les siRNAs dans des études chez la souris. Cependant, en raison de leur charge cationique, elles sont souvent associées à une toxicité (Duncan and Izzo, 2005).

- **N-acétyl-D-galactosamine**

Les siARN ou les miARN mimétiques peuvent être conjugués à la N-acétyl-D-Galactosamine (GalNAc), ce qui conduit à leur absorption dans les cellules par endocytose à médiation par la clathrine (Rupaimoole and Slack, 2017). Un avantage des conjugués GalNAc est qu'ils peuvent être délivrés sans avoir besoin de molécules porteuses supplémentaires telles

que des lipides (Nair et al., 2014). Les conjugués GalNAc-miARN, tels que RG-101 et RG-125 (Regulus Therapeutics), ont ainsi été évalués en essai clinique. Les essais sur le RG-101 ont été interrompus car une grande quantité de bilirubine (provenant de la destruction des globules rouges) a été découverte dans le sang des patients. Les essais sur le RG-125 sont également interrompus.

- **Chitosan et Cyclodextrine**

D'autres polymères tels que la cyclodextrine (polymère de glucose) ou le chitosan (polymère cationique dérivé de la chitine) ont été utilisés pour délivrer des siRNAs lors d'essais pré-cliniques ou cliniques (Rupaimoole and Slack, 2017). La cyclodextrine a été utilisée lors d'essais cliniques mais a été interrompue à cause d'une cytotoxicité limitant la dose.

#### **4. Essais cliniques avec des miRNAs mimétiques ou des antimiRs**

Les principaux défis à relever pour transposer ces systèmes d'administration en clinique sont les effets immunostimulants potentiels et l'absence de ciblage spécifique des sites de la maladie. Une évaluation minutieuse des données de toxicité et des cibles des miRNAs est nécessaire pour éviter les échecs précoces lors des essais cliniques (Kalariya et al., 2017; Mandilaras et al., 2017; Rupaimoole and Slack, 2017) (**Tableau VIII**).

##### *a. Exemples d'essais cliniques avec des miRNAs mimétiques ou des antimiRs*

Le premier essai clinique, débuté en 2013, avec des miRNAs mimétiques concerne le **miR-34 mimic** (MRX34), encapsulé dans des nanoparticules de lipides. Au préalable, plusieurs études précliniques utilisant le miR-34 ont démontré son potentiel anticancéreux. Ainsi, l'encapsulation du miR-34 dans des nanoparticules de lipides a montré des résultats prometteurs dans des modèles murins de cancer du foie (Wiggins et al., 2010), de la prostate (Liu et al., 2011) et du poumon (Trang et al., 2011). Cet outil thérapeutique a alors été testé dans un essai clinique de phase I (NCT01829971) dans plusieurs tumeurs malignes solides et hématologiques. Cet essai clinique a été stoppé, fin 2016, à cause d'effets secondaires immunitaires sévères.

Les essais cliniques les plus développés avec les antimiRs sont ceux pour inhiber le miR-122. Le **LNA-antimiR-122** (Miravirsén) est ainsi entrée en phase II des essais cliniques pour le traitement des patients atteints d'hépatite C (Janssen et al., 2013).

Plus récemment, deux autres essais cliniques de phase I avec le **miR-29 mimic** (MRG-201 ; miRagen Therapeutics) chez des patients atteints de sclérodémie et avec l'**antimiR-155** (MRG-106 ; miRagen Therapeutics) chez des patients atteints de lymphome cutané à cellules T ont été lancés (NCT02603224 et NCT02580552 respectivement).

Name (company)	Therapeutic agent	Delivery system	Target diseases	Trial details	ClinicalTrials.gov identifier
<i>miRNA-based therapeutics</i>					
Mirvirasen (Santaris Pharma A/S and Hoffmann-La Roche)	AntimiR-122	LNA-modified antisense inhibitor	Hepatitis C (chronic infections included)	Single-centre phase I, completed	NCT01646489
				Multicentre phase II, completed	NCT01200420
				Multicentre phase II, ongoing	NCT01872936
				Single-centre phase II, ongoing	NCT02031133
				Single-centre phase II, ongoing	NCT02508090
RG-101 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-122	GalNAc-conjugated antimiR	Chronic hepatitis C	Phase I, completed	–
				Multiple phase II, ongoing	–
RG-125/ AZD4076 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-103/107	GalNAc-conjugated antimiR	Patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver diseases	Single-centre phase I, ongoing	NCT02612662
				Single-centre phase I/IIa, ongoing	NCT02826525
MRG-106 (miRagen Therapeutics)	AntimiR-155	LNA-modified antisense inhibitor	Cutaneous T cell lymphoma and mycosis fungoides	Multicentre phase I, ongoing	NCT02580552
MRG-201 (miRagen Therapeutics)	miR-29 mimic	Cholesterol-conjugated miRNA duplex	Scleroderma	Single-centre phase I, ongoing	NCT02603224
MesomiR-1 (EnGeneIC)	miR-16 mimic	EnGeneIC delivery vehicle	Mesothelioma, non-small cell lung cancer	Multi-centre Phase I, ongoing	NCT02369198
MRX34 (Mirna Therapeutics)	miR-34 mimic	LNPs (Smarticles)	Multiple solid tumours	Multicentre phase I, terminated	NCT01829971

DOPC, 1,2 dioleoyl-sn glycerol-3 phosphatidylcholine; eIF, eukaryotic initiation factor; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; HBV, hepatitis B virus; LNA, locked nucleic acid; LNPs, lipid nanoparticles; miRNA, microRNA; PEI, polyethylenimine; RSV, respiratory syncytial virus.

**Tableau VIII : Liste de miRNAs thérapeutiques en essais cliniques (d'après Rupaimoole & Slack, 2017).**

Le dernier miRNA-mimétique à entrer au stade d'essai clinique à ce jour est le **miR-16-mimic**. L'essai clinique (NCT023651158) utilise la technologie TargomiRs avec le miR-16 mimic (MesomiR-1 ; EnGeneIC) conditionné dans des EDV, chez des patients atteints de mésothéliome pleural malin ou de cancer avancé du poumon non à petites cellules. Les EDV sont conjuguées à un anticorps spécifique anti-EGFR pour cibler les cellules cancéreuses vasculaires. Il s'agit d'une nouvelle méthode d'administration de médicaments développée comme alternative aux méthodes basées sur les liposomes ou les nanoparticules, fréquemment utilisées pour délivrer les ARNm (MacDiarmid et al., 2007). Les résultats préliminaires de cet essai clinique ont démontré une réponse partielle sur 16 patients au bout de 8 semaines d'évaluation, mais avec une importante réaction inflammatoire comme avec le miR-34 mimic encapsulé dans des liposomes (Mandilaras et al., 2017).

## *b. Etudes pré-cliniques avec des miRNAs chez le CS*

A notre connaissance, aucune étude clinique incluant des miRNAs pour le traitement du CS n'a été menée à ce jour. Cependant, des études précliniques ont été publiées dans quelques modèles de xénogreffes de cellules de CS avec des miRNAs : miRs -494, -129-5p, -21-5p, -143/145 (classés dans l'ordre de leur publication) et également avec l'anti-miR-181a. *In vivo*, les sur-expressions des miRNAs varient d'une étude à une autre et sont en général réalisées par des vecteurs lentiviraux. Les xénogreffes sont réalisées dans presque toutes les études en site sous-cutané chez des souris immunodéficientes (*nude*, ou NOD-SCID moins couramment).

Un article de 2015 rapporte que le **miR-494** est sous-exprimé dans des tissus de CS et dans la lignée de CS SW1353 (Li et al., 2015a). Par ailleurs, la transfection du miR-494 a inhibé la migration et l'invasion des cellules SW1353. De plus, les chercheurs ont identifié SOX9 comme une cible directe du miR-494. Enfin, l'étude a montré que le miR-494, lorsqu'il est sur-exprimé de façon stable (procédure non décrite) dans les cellules SW1353, inhibe la croissance tumorale de xénogreffes sous-cutanées des cellules SW1353 chez des souris *nude*.

Pour résumer l'étude de Zang et al. (Zhang et al., 2017), le **miR-129-5p** inhibe la prolifération et l'invasion de cellules de CS (SW1353 et JJ012) en ciblant la voie de signalisation SOX4/Wnt/ $\beta$ -Catenin. L'étude a montré par ailleurs que le miR-129-5p ralentissait la progression tumorale en ciblant SOX4 dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules SW1353 et JJ012 chez la souris *nude*. Les cellules ont été transfectées au préalable à leur greffe avec un vecteur d'expression plasmidique codant le miR-129-5p, des siRNAs ciblant SOX4 et l'ADNc de SOX4.

Une autre étude a démontré que le **miR-21-5p**, en ciblant CCR-7 (« C-C chemokine receptor 7 »), inhibait la signalisation de STAT3 et de NF- $\kappa$ B, et qu'il prévenait de ce fait la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion et la TEM des cellules de CS (Li et al., 2019a). La transfection du vecteur lentiviral du miR-21-5p dans des cellules SW1353 a par ailleurs inhibé la formation de xénogreffes sous-cutanées chez la souris *nude*.

Les **miRs -143-3p et -145-5p** dérivent du même précurseur. Urdinez et al. ont montré récemment que leur niveau d'expression est inversement corrélé au grade tumoral des CS et que le miR-145-5p circulant pouvait être, en particulier, un biomarqueur diagnostique (Urdinez et al., 2020). De plus, ces auteurs ont montré que leur transfection transitoire ou la surexpression de leur précurseur (cloné dans un vecteur lentiviral dont l'expression est inductible par la

doxycycline) atténuent les propriétés malignes des lignées de CS SW1353 et JJ012 *in vitro*. Pour la partie *in vivo*, la particularité de leur étude est qu'ils ont utilisé un modèle de xéno greffe de CS de la lignée JJ012 implanté en site orthotopique paratibial, donc plus proche de la physiopathologie des CS. Ce modèle leur a permis de montrer que la surexpression inductible du précurseur des 2 miRs inhibe la croissance tumorale, mais n'affecte pas la propagation de métastases pulmonaires. Ils ont aussi mis en évidence que le gène *Fascin-1*, cible des miRs-143/145, contribuait à la malignité des CS.

L'étude de Sun et al. a identifié le **miR-181a** comme oncomiR qui favorise la progression du CS en inhibant RGS16 (« Regulator of G-protein Signaling 16 ») (Sun et al., 2015a). De plus, l'anti-miR-181 inhibe l'angiogenèse, la croissance tumorale, l'activité de la MMP-1 et la formation de métastases dans un modèle de xéno greffe sous-cutanée de la lignée de CS CS-1. Pour obtenir ces résultats, les auteurs de l'étude ont utilisé des cellules préalablement transfectées de façon stable avec un vecteur lentiviral exprimant l'anti-miR-181a. Plus récemment, cette équipe a utilisé des nanoparticules pour délivrer des oligonucléotides anti-miR-181a et a obtenu les mêmes résultats (Sun et al., 2019b).

### *c. Etudes pré-cliniques avec des miRNAs chez l'OS*

A notre connaissance, aucun essai clinique utilisant des miRNAs pour le traitement de l'OS n'a été initié. Cependant, il existe beaucoup d'études précliniques avec des miRNAs dans l'OS. La majorité des études utilisent des lignées cellulaires d'OS pour réaliser des xéno greffes sous-cutanées chez des souris *nude*. Néanmoins, quelques travaux ont vérifié l'efficacité des miRNAs pour le traitement des OS en utilisant des modèles orthotopiques, en site paratibial ou intratibial chez la souris, soit des modèles plus proches du microenvironnement tumoral des OS. Seuls quelques travaux seront développés, dont ceux qui ont étudié les miR-491-5p et -16-1-3p testés durant mon projet de thèse.

Chen et al. ont montré que le **miR-134** inhibe l'invasion et les métastases des cellules d'OS en ciblant MMP1 et MMP3 *in vitro* et *in vivo* (Chen et al., 2019). Les chercheurs ont utilisé une transfection stable avec un vecteur lentiviral pour sur-exprimer le miR-134 dans la lignée SaOS-2 avant de réaliser la xéno greffe des cellules en sous-cutané chez la souris *nude*.

Des expérimentations, réalisées *in vitro* et *in vivo* avec des lignées d'OS, ont montré que la sur-expression stable du **miR-491-5p** diminue l'invasion tumorale, la formation de métastases pulmonaires et la croissance des tumeurs primaires, alors qu'elle favorise

l'inhibition de la croissance tumorale et l'apoptose induites par le CDDP (Wang et al., 2017). En revanche, la sur-expression stable d'un oligonucléotide antisens du miR-491 a eu l'effet inverse. Les chercheurs ont suivi la croissance tumorale des OS après injection en sous-cutané chez la souris nude des cellules SaOS-2 et MG63 sur-exprimant le miR-491 ou son antisens. Pour obtenir des métastases pulmonaires, ils ont injecté les cellules modifiées génétiquement, soit dans la cavité intramédullaire du tibia (lignée 143B), soit dans la veine caudale (lignées MG63 et SaOS-2). L'étude a montré par ailleurs que le miR-491-5p cible l'ARNm de CRYAB qui code pour l'alpha-B-cristalline, une protéine qui inhibe l'apoptose et qui contribue à l'architecture intracellulaire.

Un autre travail a comparé l'effet de 3 miRNAs issus de 2 loci (Maximov et al., 2019). La sur-expression stable du **miR-16-5p** dit « guide », et surtout des **miRs -16-1-3p** et **-16-2-3p** dits « passagers », dans les cellules de la lignée d'OS HOS a réduit drastiquement la capacité des cellules à former des colonies en agar et leur indépendance à l'ancrage. La sur-expression du miR-16-2-3p, mais pas des 2 autres miRNAs, a sensibilisé les cellules HOS au cisplatine et à la doxorubicine. La sur-expression du miR-16-1-3p ou du miR-16-2-3p a complètement aboli la capacité des cellules HOS à former des tumeurs sous-cutanées chez la souris NOD/SCID, alors que la sur-expression du miR-16-5p réduit seulement cette capacité. La sur-expression des 3 miRNAs a aussi significativement réduit la taille des tumeurs après la xéno greffe des cellules HOS en site intratibial chez la souris NOD-SCID, avec un effet très marqué du miR-16-2-3p. Faute de pouvoir sélectionner des clones stables sur-exprimant le miR-16-1-3p, les chercheurs ont seulement pu valider une partie de ces résultats avec une autre lignée d'OS KHOS. Toutefois, ils ont aussi réalisé des xéno greffes en sous-cutané avec des cellules KHOS avec des éponges à miRNA pour chacun de ces 3 miRNAs. Les résultats n'ont toutefois pas montré d'augmentation significative du volume tumoral, mais une augmentation du nombre de métastases pulmonaires avec ces éponges.

Des études ont aussi permis de caractériser des miRNAs oncogènes dans l'OS *in vivo*, comme par exemple le **miR-184** (Du et al., 2018). La sur-expression du miR-184 par un vecteur lentiviral dans des cellules d'OS *in vitro* augmente les capacités prolifératives et invasives des cellules (lignées U-2OS et 143B). L'effet de cette sur-expression a également été étudié *in vivo* dans un modèle de xéno greffe orthotopique en site intratibial chez la souris *nude*. La sur-expression du miR-184 augmente le volume tumoral et les niveaux de  $\beta$ -caténine phosphorylée. Par contre, la sur-expression d'un oligonucléotide inhibiteur du miR-184 produit les effets inverses *in vivo*.

Plusieurs travaux ont montré que la sur-expression du **miR-34a** inhibe la prolifération et la tumorigénèse des cellules d'OS *in vitro* et *in vivo*. De façon plus originale, une étude s'est intéressée à son administration par voie systémique pour contrôler la progression tumorale. Les auteurs ont généré et purifié un plasmide d'expression du pré-miR-34a (tRNA/miR-34a) comme décrit dans leur recherche précédente (Wang et al., 2015). Ils ont mis en évidence que le tRNA/miR-34a inhibe de manière significative la prolifération des cellules d'OS 143B et MG-63, ce qui a été attribué à l'induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Zhao et al., 2016). Le promédicament tRNA/miR-34a a ensuite été préparé à l'aide de l'agent *in vivo*-jetPEI, puis injecté en intraveineuse chez des souris *nude* porteuses de tumeur d'OS en site orthotopique (cellules 143B injectées sous le périoste d'un tibia). Le tRNA/miR-34a a été injecté dans la veine caudale à partir du 9<sup>ème</sup> jour après la greffe, puis tous les 2-3 jours jusqu'au 22<sup>ème</sup> jour lorsque les souris ont été sacrifiées. Ces injections ont réduit de manière significative la croissance tumorale.

# E. Utilisation des bactéries en thérapie anti-cancéreuse

## I. Le potentiel thérapeutique des bactéries

### 1. Lien entre bactéries et tumeurs (historique)

La première bactérie à avoir eu un effet sur des cellules cancéreuses appartient au genre *Clostridium* (Baban et al., 2010). En 1813, une régression tumorale a été observée chez des patients présentant une « gangrène gazeuse » concomitante causée par *C. perfringens*. Les *Clostridia* sont des bactéries à Gram positif, sporulées, anaérobies obligatoires et de nombreuses souches sont pathogènes. Il a été maintenant établi que, pour de nombreuses espèces de *Clostridium*, lorsqu'elles sont injectées sous forme de spores, elles germent seulement dans un environnement anaérobie approprié. En effet, le genre *Clostridium* est strictement anaérobie et la grande majorité des espèces peuvent produire des spores permettant la survie, mais pas la croissance dans des conditions normoxiques. Lorsque les conditions sont favorables, ses spores peuvent germer et être métaboliquement actives. De plus, les *Clostridia* utilisées sont généralement sensibles à une large gamme d'antibiotiques, ce qui permet de contrôler leur répllication à tout moment.

Puis, un autre patient présentant un sarcome inopérable traité par le médecin W. Busch en 1868 fût placé dans le lit d'un patient avec une infection de la peau (érysipèle) liée à *Streptococcus pyrogenes*. Malgré son décès 9 jour plus tard, le médecin constata alors une régression de la tumeur primaire et des ganglions lymphatiques en une semaine (Pawelek et al., 2003).

Le potentiel curatif des bactéries et en particulier d'extraits bactériens dans le traitement de tumeurs malignes a finalement été établi par le Dr. William Coley, un jeune chirurgien de New-York en 1906 (Coley, 1910). A partir des observations précédentes, il utilisa des extraits de *Streptococcus* tués par la chaleur pour traiter ses patients cancéreux, puis ajouta des extraits inactivés de *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*) dans sa préparation. Ce cocktail est connu sous le nom de « Coley's toxins » (Wiemann and Starnes, 1994). Il a ainsi traité des centaines de patients avec sa toxine. Plus de 40 % d'entre eux ont eu des remissions cliniques, un taux qui n'est pas atteint avec la chimiothérapie moderne (**Tableau IX**).

Type of cancer	Total	A	B	C	D	E
Soft tissue sarcomas <sup>1</sup>	84	32	12	11	12	17
Lymphosarcomas (lymphomas) <sup>2</sup>	33	10	4	4	7	8
Osteosarcoma <sup>3</sup>	3	2	1	0	0	0
Ewing's tumor/reticulum cell sarcoma <sup>4</sup>	1	0	0	0	0	1
Ovarian carcinoma <sup>5</sup>	4	1	2	0	0	1
Cervical carcinoma <sup>5</sup>	2	0	1	0	0	1
Testicular <sup>6</sup>	14	5	3	3	2	1
Renal <sup>7</sup>	8	4	1	1	1	1
Multiple myeloma <sup>8</sup>	1	0	0	1	0	0
Colorectal carcinoma <sup>9</sup>	1	1	0	0	0	0
Breast carcinoma <sup>10</sup>	13	5	6	2	0	0
Melanoma <sup>11</sup>	6	2	3	0	1	0

**Tableau IX : Résumé des patients traités avec les toxines de Coley avant 1940.** L'évaluation a été limitée aux patients considérés comme inopérables au moment du traitement et qui n'ont reçu aucune autre thérapie que le vaccin. Les dossiers individuels des patients sont classés comme suit : A, ceux qui n'ont pas eu de réponse bénéfique au traitement ; B, ceux qui ont eu une réponse initiale, mais dont on sait qu'ils ont rechuté où dont le suivi a été perdu en moins de 5 ans ; C, ceux qui ont été rendus indemnes de maladie, mais dont le suivi a été perdu après au moins 5 ans, mais moins de 10 ans ; D, ceux qui ont été rendus indemnes de maladie, mais dont le suivi a été perdu après au moins 10 ans, mais moins de 20 ans ; E, ceux qui ont été rendus indemnes de toute preuve clinique de maladie pendant une période d'au moins 20 ans (d'après Wiemann & Starnes, 1994).

En 1935, Connell a utilisé des filtrats stériles de *Clostridium histolyticum* pour traiter des cancers avancés et a attribué la régression tumorale observée à la production d'enzymes protéolytiques (Connell, 1935). Par la suite, plusieurs souches de *Clostridium* ont été testées de manière extensive sur des modèles animaux ainsi que dans le cadre d'essais cliniques chez l'Homme, mais aucune n'a montré d'effets thérapeutiques significatifs. Ainsi, le domaine de la thérapie bactérienne du cancer a stagné jusqu'en 1976, jusqu'à ce que Morales, Eidinger et Bruce ont fait état d'un traitement réussi du cancer superficiel de la vessie avec le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) (Morales et al., 2002). Aujourd'hui, le BCG est devenu le traitement de choix pour les cancers superficiels de la vessie à haut risque dans la plupart des pays, avec un taux de traitement croissant d'environ un million de patients par an (Shintani et al., 2007).

Depuis, il a été démontré que plusieurs genres bactériens sont capables de s'accumuler dans les tumeurs solides et de s'y multiplier, incluant : *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Forbes, 2010). L'utilisation de bactéries natives et/ou génétiquement modifiées seules ou en combinaison avec des agents thérapeutiques conventionnels a été testée dans plusieurs modèles expérimentaux de cancer. Les genres bactériens qui ont retenu le plus l'attention sont *Listeria monocytogenes*, *Clostridium novyi* et *Salmonella* (Forbes et al., 2018).

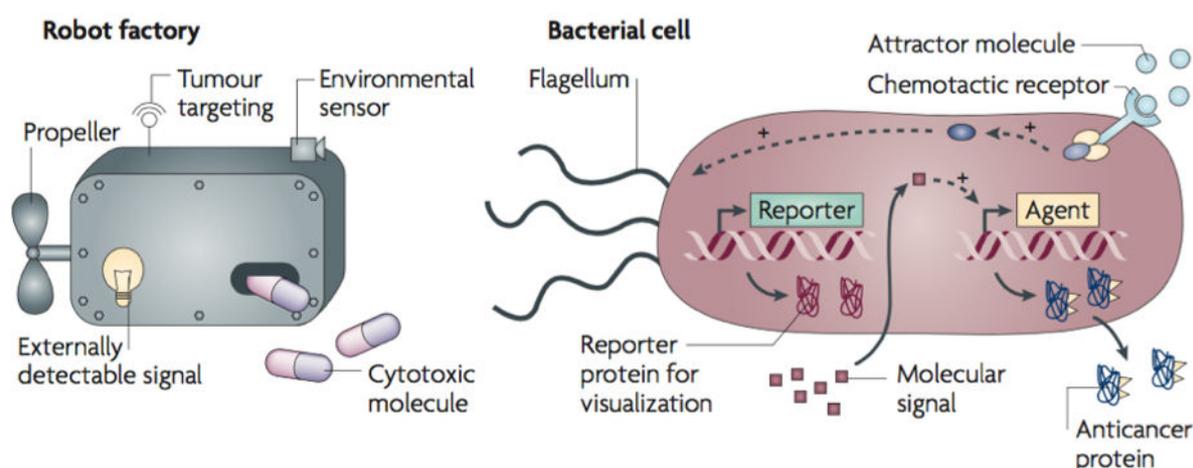
## 2. Intérêt des bactéries

Les bactéries ont des capacités uniques qui en font des agents anticancéreux pratiquement "parfaits". Leur génome étant facilement manipulable, les bactéries peuvent être modifiées pour surmonter les limites qui entravent les thérapies actuelles contre le cancer.

Afin de traiter efficacement les cancers, l'ingénierie cellulaire envisage la mise au point d'« usines robotisées » programmables (**Figure 43**) possédant les caractéristiques suivantes :

- Capacité à cibler les tumeurs.
- Produire des molécules cytotoxiques.
- S'auto-diriger jusqu'à la tumeur.
- Répondre à des signaux de déclenchement.
- Détecter le microenvironnement local.
- Produire des signaux détectables de l'extérieur.

Les bactéries disposent de mécanismes biologiques pour remplir ces fonctions : des machineries de transcription et de traduction pour produire des protéines anticancéreuses, des flagelles pour la chimiotaxie et se propulser jusqu'au site de la tumeur, des régions spécifiques de promoteurs de gènes pour répondre à des signaux-stimuli moléculaires, des récepteurs chimiotactiques pour détecter leur microenvironnement et une machinerie pour produire des molécules détectables par visualisation (Forbes, 2010).

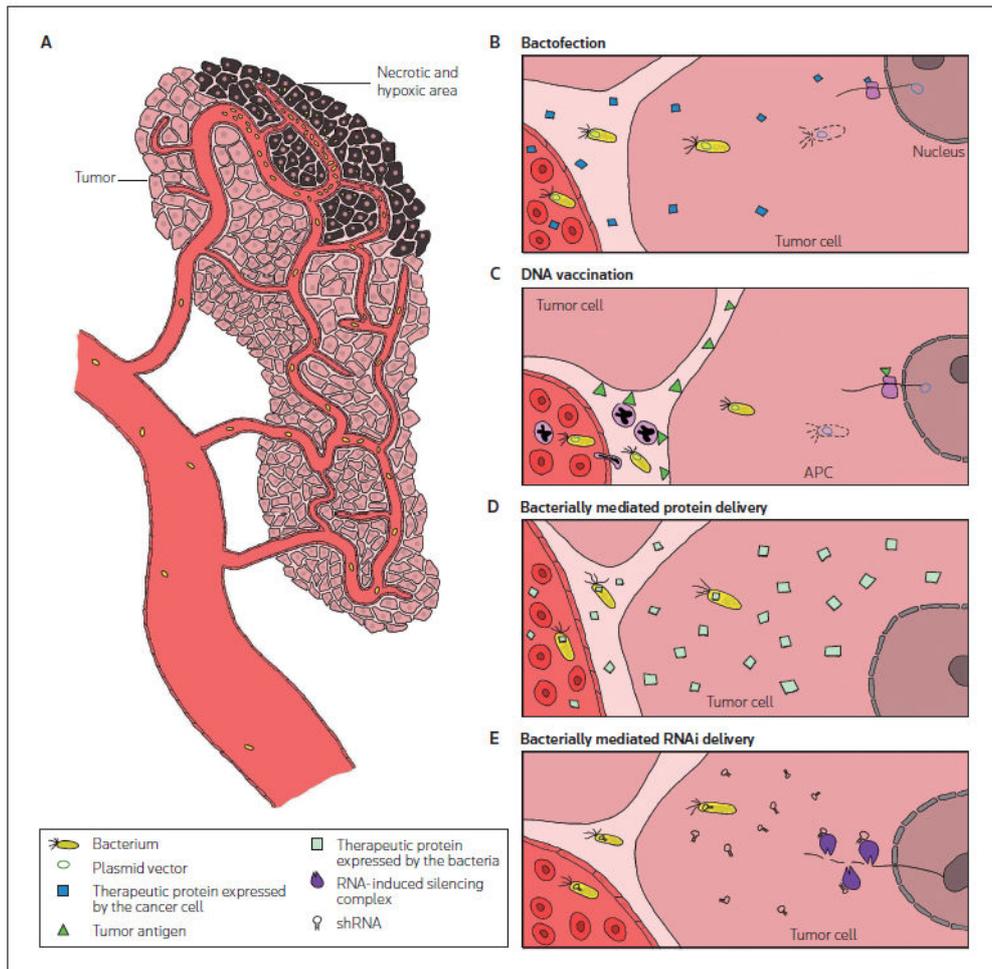


**Figure 43 : Les bactéries comme des usines robotisées « parfaites » pour lutter contre les cancers (d'après Forbes, 2010).**

Les bactéries peuvent agir sur les tumeurs selon différents modes d'action que nous détaillerons ultérieurement (**Figure 44**).

- Toxicité bactérienne naturelle.

- Stimulation de la réponse immunitaire *via* l'expression d'antigènes tumoraux.
- Bactofection ou transfert d'ADN bactérien.
- Délivrance d'agents anti-cancéreux.
- Extinction de l'expression génique par stratégie d'interférence par l'ARN (siRNA, shRNA, miRNA).



**Figure 44 : Les différentes approches thérapeutiques utilisant les vecteurs bactériens.** A. Illustration de la colonisation préférentielle des zones hypoxiques/nécrotiques des tumeurs par des bactéries anaérobies obligatoires ou facultatives, généralement hors d'atteinte par les traitements conventionnels. B. Illustration de la bactofection : une fois dans la cellule cible, la bactérie perturbe et libère un vecteur plasmidique codant pour le gène thérapeutique. Le plasmide est transféré dans le noyau de la cellule, et la protéine thérapeutique est exprimée par le système d'expression de la cellule hôte. C. Vaccination par l'ADN : de la même manière que la bactofection, la bactérie délivre un plasmide codant un antigène exprimé par les cellules tumorales pour aider à amorcer une réponse des lymphocytes T contre l'antigène tumoral présent. D. Production de protéines thérapeutiques par les bactéries. Les bactéries vont produire et délivrer, soit dans le microenvironnement extracellulaire, soit dans les cellules tumorales, les agents thérapeutiques. E. Livraison d'ARN interférent par les bactéries : les bactéries livrent, au sein de la tumeur, des ARN interférents dirigés contre un oncogène exprimé par la tumeur (d'après Gardlik & Fruehauf, 2010).

De nombreuses expériences ont montré que les thérapies bactériennes peuvent faire régresser les tumeurs avec succès et favoriser la survie chez les souris. Certaines ont abouti à des essais cliniques (**Tableau X**). Cependant, de nombreux défis restent à relever avant que les bactéries puissent être utilisées en clinique, notamment la production limitée de médicaments, la toxicité bactérienne intrinsèque, l'efficacité du ciblage, l'instabilité génétique et la combinaison avec d'autres thérapies. Il est nécessaire d'ajuster la production des médicaments afin de synthétiser des médicaments à des concentrations suffisantes pour induire des effets thérapeutiques, mais pas à des concentrations trop élevées qui peuvent provoquer une toxicité systémique. Le contrôle de la toxicité bactérienne sera crucial pour garantir la sécurité et permettre l'approbation réglementaire (Forbes, 2010).

Biological Agent	Bacterium	NCT#	Indication
IL-2	Salmonella	NCT01099631	Liver Cancer
<i>C. novyi-NT</i>	Clostridium	NCT00358397 NCT01118819 NCT01924689	Solid Tumors
APS001F	Bifidobacterium	NCT01562626	Solid Tumors
JNJ-64041757	Listeria	NCT02592967 NCT02625857	NSCLC Prostate Cancer
JNJ-757	Listeria	NCT03371381	Lung Cancer
pLADD	Listeria	NCT03189030	Metastatic Colorectal Cancer
ADU-623	Listeria	NCT01967758	Astrocytic Tumors
ADX511-001	Listeria	NCT01598792 NCT01266460	Oropharyngeal Cancer Cervical Cancer
CRS-207	Listeria	NCT01675765 NCT00585845 NCT02575807	Malignant Pleural Mesothelioma Adenocarcinoma of the Pancreas Ovarian Cancer
GVAX & CRS-207	Listeria/GVAX	NCT02004262	Pancreatic Cancer

In these clinical trials, *Listeria* do not colonize the tumor microenvironment

**Tableau X : Les essais publiés sur l'Homme utilisant des thérapies bactériennes contre le cancer (d'après Forbes, 2018).**

### 3. La colonisation bactérienne spécifique des tumeurs

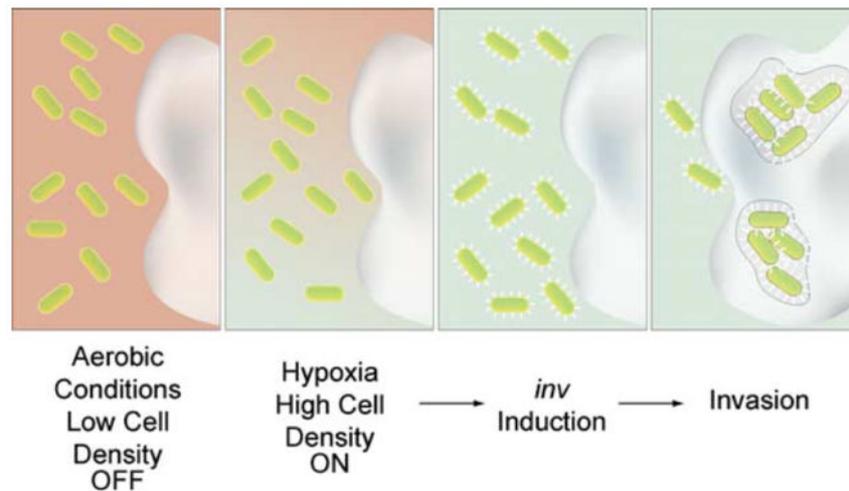
La colonisation bactérienne des tumeurs a été initialement attribuée à la nature hypoxique des tumeurs (Wei et al., 2008). La nature anaérobie des régions hypoxiques/nécrotiques des tumeurs favoriserait la croissance de bactéries anaérobies et facultativement anaérobies. Les zones de nécrose peuvent également fournir des nutriments tels que les purines pour favoriser davantage la croissance des bactéries (Al-Mariri et al., 2002). L'implication de la chimiotaxie bactérienne pour des composés chimio-attractifs présents dans les régions nécrotiques comme l'aspartate, la sérine, le citrate, le ribose et le galactose, produits par les cellules cancéreuses quiescentes a également été suggérée comme un facteur contributif (Kasinskas and Forbes, 2007). Par exemple, pour *Salmonella*, les récepteurs à l'aspartate

seraient essentiels à la chimiotaxie, les récepteurs à sérine induiraient la pénétration tissulaire et ceux aux ribose dirigerait les bactéries vers les zones nécrotiques (Forbes, 2010).

De plus, la colonisation bactérienne sélective des tumeurs semble indépendante à la fois des espèces bactériennes et de l'origine de la tumeur. La nature irrégulière des vaisseaux sanguins des tumeurs pourrait être un facteur responsable de ce phénomène. En se développant, les tumeurs favorisent l'angiogenèse avec la formation de néo-vaisseaux qui sont très désorganisés. Ces néo-vaisseaux possèdent des revêtements endothéliaux incomplets et des extrémités aveugles. Ceci peut entraîner une fuite sanguine et un ralentissement de la circulation sanguine. Ces particularités pourraient permettre aux bactéries circulantes de pénétrer dans la tumeur et de s'y loger. En effet, des bactéries administrées sous forme intraveineuse parviennent à s'installer et à se répliquer dans des plaies cutanées au fur et à mesure de la cicatrisation (Yu et al., 2004b). Le système vasculaire des plaies en cours de cicatrisation ressemblerait beaucoup à l'angiogenèse observée dans les tumeurs. Il est intéressant de noter que les bactéries ont été éliminées des plaies lors de ces expériences (probablement par le système immunitaire), ce qui n'est pas le cas au sein des tumeurs où l'activité immunitaire est parfois réduite. Les tumeurs représenteraient donc un sanctuaire immunologique, où les bactéries peuvent se développer à l'abri du système immunitaire (Sznol et al., 2000).

Les bactéries peuvent soit naturellement pénétrer dans les cellules tumorales, soit être modifiées pour s'internaliser afin de délivrer ou non des agents thérapeutiques. Ainsi, *S. typhimurium* AI-R est une souche atténuée en virulence qui a la capacité d'envahir de nombreuses tumeurs (pancréas, sein, mélanome...) et de les faire régresser. Une étude a aussi montré une régression tumorale par injection intra-tumorale de cette bactérie sur un modèle de xénotgreffe d'OS humain chez la souris (Murakami et al., 2017). Une autre équipe a également démontré la possibilité de modifier la bactérie *E. coli* non invasive afin de permettre son internalisation, dans des cellules d'OS, dans le but de délivrer des molécules thérapeutiques. L'expression du gène d'invasion *inv* est alors placé sous le contrôle de senseurs bactériens spécifiques (densité cellulaire, hypoxie, nutriments spécifiques) (**Figure 45**) (Anderson et al., 2006).

La compréhension des mécanismes expliquant la colonisation préférentielle des tumeurs par les bactéries n'est pas encore totalement élucidée, mais serait primordiale afin d'optimiser leur utilisation en thérapie.



**Figure 45 : Modèle de conception d'une bactérie invasive d'une cellule cancéreuse.** Dans des conditions de faible densité cellulaire ou de croissance aérobie normale, les bactéries modifiées ne sont pas invasives. Au-delà d'une densité cellulaire critique ou dans un microenvironnement hypoxique, des capteurs sont activés, ce qui entraîne l'invasion (d'après Anderson et al., 2006).

## II. Les différentes stratégies thérapeutiques utilisant des bactéries

### 1. Toxicité bactérienne naturelle

#### a. Expression de toxines

Plusieurs microorganismes pathogènes expriment et libèrent des toxines protéiques particulières qui affectent la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Certaines bactéries ont été testées pour le traitement du cancer (Zahaf and Schmidt, 2017). En général, elles peuvent inhiber la production ou la sécrétion d'anticorps et de cytokines et elles perturbent la migration des macrophages. La plupart du temps, les toxines bactériennes sont de puissantes enzymes à haute spécificité contre leurs substrats cellulaires, qui sont souvent des molécules des voies de signalisation. Ces enzymes ont la capacité d'entrer dans la cellule et de modifier leurs substrats dans le cytosol. Quelques molécules et au moins certaines toxines sont capables de modifier la fonction et la morphologie des cellules, ou éventuellement de tuer les cellules. La plupart de ces toxines ont des structures, des récepteurs cellulaires, des mécanismes moléculaires et des voies d'absorption bien connus. Elles ont été utilisées pour analyser ou influencer des voies de signalisation particulières des cellules de Mammifères (Zahaf and Schmidt, 2017). Par exemple, la cytolysine A (ClyA ou HlyE) est une toxine bactérienne qui fonctionne en formant des pores dans les membranes cellulaires des Mammifères induisant l'apoptose. Elle est produite par

plusieurs bactéries dont *E. coli*, *Shigella flexneri 2a*, *Salmonella enterica serovars typhi* et *typhimurium* (Jiang et al., 2010; Ryan et al., 2009). Il a été montré que le traitement de souris avec *E. coli* ou *S. typhimurium* qui expriment ClyA réduisait la croissance tumorale (Jiang et al., 2010; Nguyen et al., 2010)

### *b. Bactéries et immunothérapie*

L'immunothérapie consiste à déclencher une réponse immunitaire spécifique chez les patients pour permettre à divers types de cellules immunitaires de l'hôte d'attaquer les cellules cancéreuses. Une fois les cellules immunitaires activées (principalement les lymphocytes T CD 8+ et CD 4+ spécifiques à l'antigène tumoral), elles peuvent reconnaître et détruire les cellules tumorales. La toxicité naturelle de certaines bactéries peut être ainsi due à une sensibilisation du système immunitaire.

Les infections bactériennes peuvent entraîner la production de protéines de choc thermique telles que l'Hsp 70, libérée par les cellules nécrotiques, et les PAMP (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») libérées par les bactéries (Gelman and Turka, 2003). La protéine Hsp70 entraîne la maturation des cellules dendritiques, qui sont les cellules présentant l'antigène, nécessaire à la génération d'une réponse immunitaire efficace spécifique. Les PAMP se lient à des récepteurs de type « Toll-like » et les activent, stimulant ainsi la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (par exemple l'IL-12) et des molécules co-stimulatrices (par exemple le CD40). Par la suite, ces médiateurs provoquent la production d'IFN- $\gamma$  et une réponse à médiation cellulaire Th1-dépendante, essentiellement médiée par les cellules effectrices CD8+ (Kay, 2001). En effet, une étude a montré que les PAMP pourraient éradiquer les tumeurs solides chez les souris porteuses de cancer (Reuter et al., 2018).

La vaccination anti-tumorale par des bactéries a été étudiée par différentes équipes. En effet, il a été observé que des composés dérivés de bactéries (oligonucléotides CpG) peuvent être utilisés pour activer les cellules dendritiques et provoquer la régression complète des tumeurs de mélanome B16F10 (Furumoto et al., 2004).

## **2. La bactofection**

La bactofection utilise la bactérie pour transférer de l'ADN dans la cellule eucaryote cible. C'est à partir de cette technique que différentes stratégies thérapeutiques utilisant les bactéries ont ensuite vu le jour. Les bactéries peuvent transférer le matériel génétique dans les

cellules eucaryotes après leur entrée dans le cytoplasme de la cellule hôte et leur propre lyse ou autolyse (Gardlik and Fruehauf, 2010).

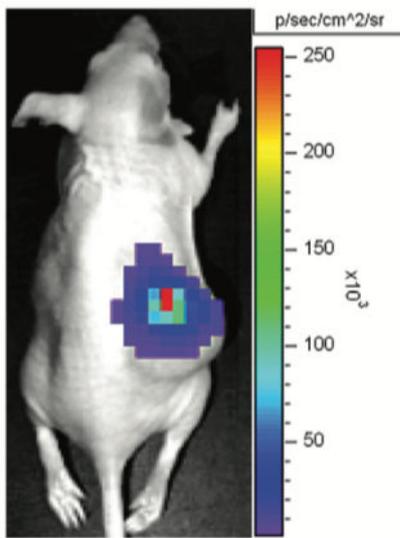
Pour certains genres, tels que *Salmonella* ou *Shigella*, le contact entre les bactéries et les cellules hôtes entraîne la sécrétion, par les bactéries, d'un ensemble de protéines d'invasion qui déclenchent des événements de signalisation intracellulaire, entraînant un réarrangement du cytosquelette, un froissement de la membrane plasmique et l'absorption de la bactérie par micropinocytose. Pour d'autres genres, tels que *Yersinia* ou *Listeria*, la liaison d'une seule protéine bactérienne à un ligand particulier à la surface de la cellule hôte est nécessaire et suffisante pour déclencher l'entrée dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires par un mécanisme de type fermeture éclair. La liaison de *Yersinia* porteuse du gène de l'invasine *inv* aux intégrines  $\beta 1$  entraîne l'entrée dans les cellules exprimant cette intégrine à leur surface. La liaison de *Listeria* porteuse du gène de l'internaline A avec l'E-cadhérine permet son entrée dans certains types de cellules. De même, l'introduction dans *E. coli* du plasmide de virulence (pWR100) de *S. flexneri* ou du gène *inv* de *Y. pseudotuberculosis* confère à cette bactérie extracellulaire, la capacité d'envahir des cellules non phagocytaires. L'efficacité de transfert peut être augmentée dans certaines cellules avec la co-expression du gène de la lystériolysine qui permet à la bactérie de s'échapper de la vacuole du phagosome (Grillot-Courvalin, 1999).

Ainsi, l'ADN plasmidique modifié des bactéries peut être transféré à la cellule et être transcrit par la machinerie cellulaire de l'hôte (Fu et al., 2008). L'inconvénient de la bactofection réside dans le ciblage non spécifique du transfert génétique, et sa faible efficacité, d'autant plus que l'ADN devra ensuite entrer dans le noyau pour être exprimé.

### **3. La thérapie génique utilisant les bactéries comme vecteur d'agent anticancéreux**

Avec les progrès en thérapie génique et les techniques de bactofection lors de ces dernières années, les vecteurs bactériens vivants sont devenus des outils précieux pour le développement de nouvelles thérapies (Gardlik and Fruehauf, 2010). L'intérêt d'utiliser des bactéries comme agents anticancéreux remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Toutefois, avec les progrès de la biologie moléculaire, l'intérêt pour cette méthodologie n'a été retrouvé que récemment (Bermudes et al., 2002; Nuyts et al., 2001). A la différence de la bactofection, où le principe est de transférer un ADN plasmidique dans la cellule cible, l'objectif ici, est de faire produire la protéine d'intérêt par la bactérie qui évolue au sein de la tumeur. Le vecteur bactérien délivre ainsi une grande quantité de protéines oncolytiques de façon continue.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses souches bactériennes anaérobies obligatoires et facultatives ont été utilisées comme agents oncolytiques en raison de leur capacité à se multiplier spécifiquement dans les tissus pauvres en oxygène (Taniguchi et al., 2010). Des bactéries peuvent coloniser les zones hypoxiques de la tumeur qui sont souvent hors d'atteintes ou insensibles aux traitements conventionnels. De plus, plusieurs études ont montré que les bactéries modifiées pour exprimer une protéine cytotoxique ou un gène rapporteur pourraient être utilisées dans le traitement des tumeurs ou l'imagerie des tumeurs (**Figure 46**).



**Figure 46 : Imagerie bioluminescente des bactéries.** Visualisation de *Bifidobacterium breve* viable exprimant la cassette du gène *luxADCDE* *in vivo* se développant spécifiquement dans les tumeurs sous-cutanées du carcinome pulmonaire de Lewis chez les souris (D'après Baban et al., 2010).

Les exemples de délivrance d'agents thérapeutiques par les bactéries sont nombreux (**Tableau XI**).

De nombreux vecteurs bactériens ont été utilisés pour délivrer des **gènes suicides**. Des gènes indirectement cytotoxiques se sont également révélés prometteurs. Les gènes activant les pro-médicaments (gènes suicides) codent pour une protéine capable de provoquer directement ou indirectement la mort cellulaire. En effet, certains gènes suicides expriment des produits directement cytotoxiques pour la cellule comme la toxine diphtérique ou l'exotoxine de *Pseudomonas* (Zheng et al., 2003).

D'autres agents codent des **enzymes** qui convertissent des pro-médicaments non toxiques en métabolites hautement cytotoxiques. Lors de la première étape, le transgène est délivré dans la tumeur, tandis que lors de la seconde étape, un pro-médicament est administré qui est sélectivement activé par l'enzyme exprimée dans le tissu tumoral.

Mode of action	Bacterium	Gene	Tumor model
<b>Suicide gene</b>	<i>S. typhimurium</i> (TAPET)	Cytosine Deaminase (TAPET-CD) gene delivery	Various murine models; Clinical trials
	<i>S. typhimurium</i> VNP20009	Carboxypeptidase G <sub>2</sub> (CPG2)	Murine models of breast and colon cancer
	<i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>	Cytosine Deaminase	Murine melanoma model
<b>Apoptosis induction</b>	<i>S. typhimurium</i>	TRAIL gene delivery, under control of prokaryotic radiation-inducible RecA promoter	4T1 mammary carcinoma model
<b>Oncolytic Vector</b>	<i>C. butyricum</i> M-55		Clinical trial-malignant gliomas
	<i>C. novyi</i> -NT	Combination with radiation therapy	Murine B16; CT26
	<i>C. butyricum</i> , Various non-pathogenic clostridia		Ehrlich Carcinoma Model.
	<i>S. typhimurium</i>		Phase I clinical trial, metastatic melanoma
	Auxotrophic/replication competent <i>S. typhimurium</i> A1		PC3 prostate tumor model
<b>Immunotherapy</b>	<i>S. typhimurium</i>	Fas ligand	Murine D2F2 breast carcinoma; CT-26 colon carcinoma; B16 melanoma
	<i>S. typhimurium</i>	IL-18	Murine D2F2 breast carcinoma; CT-26 colon carcinoma
	<i>S. typhimurium</i>	CCL21 cytokine	Murine D2F2 breast carcinoma; CT-26 colon carcinoma
<b>DNA Vaccination</b>	Various Salmonella spp.	Various tumor specific antigens	Various murine models
	<i>L. monocytogenes</i>	HPV 16 antigens, MAGE antigen.	Phase I clinical trial; various murine models
<b>Anti-angiogenesis</b>	<i>B. longum</i>	Endostatin	Murine model HepG2 liver cancer
	<i>S. choleraesuis</i>	Endostatin gene delivery	Murine B1 melanoma

**Tableau XI : Exemples de stratégies thérapeutiques utilisant des vecteurs bactériens aux niveaux précliniques et cliniques (d'après Baban et al., 2010).**

Le système le plus largement utilisé est le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSVtk) en combinaison avec le pro-médicament, le ganciclovir. HSVtk phosphoryle le ganciclovir pour produire un métabolite cytotoxique (Freeman, 2000). *Salmonella typhimurium* a été utilisée comme souche pour exprimer divers antigènes et enzymes de conversion dans les tumeurs (Felgner et al., 2017; Patyar et al., 2010; Ryan et al., 2009). *E. Coli* a aussi permis de délivrer des molécules oncolytiques (Buttaro and Fruehauf, 2010).

Les vecteurs bactériens peuvent également servir de médiateurs pour l'expression d'agents cytotoxiques, **inducteurs de l'apoptose**. Le domaine extracellulaire du « Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand » (TRAIL) est un agent apoptotique puissant dans les cellules tumorales, avec une cytotoxicité minimale pour les cellules non cancéreuses. La souche *S. typhimurium* atténuée a été utilisée pour exprimer TRAIL sous le contrôle du promoteur RecA procaryote, inductible par les radiations. L'administration

systémique de ce vecteur a entraîné une réduction tumorale de xénogreffes de carcinome mammaire (Ganai et al., 2009).

Malgré les succès précliniques obtenus avec *Salmonella* et *Clostridium*, l'efficacité thérapeutique n'est toujours pas prouvée chez l'Homme. Pour *Clostridium*, bien que l'on ait observé une oncolyse et la destruction de grandes parties de la tumeur, le bord extérieur de la tumeur n'a pas été affectée par ces bactéries, ce qui est probablement dû à un taux d'oxygène plus élevé dans cette région plus vascularisée qui ne convient pas à la survie de *Clostridium*, entraînant une nouvelle croissance des tumeurs (Baban et al., 2010).

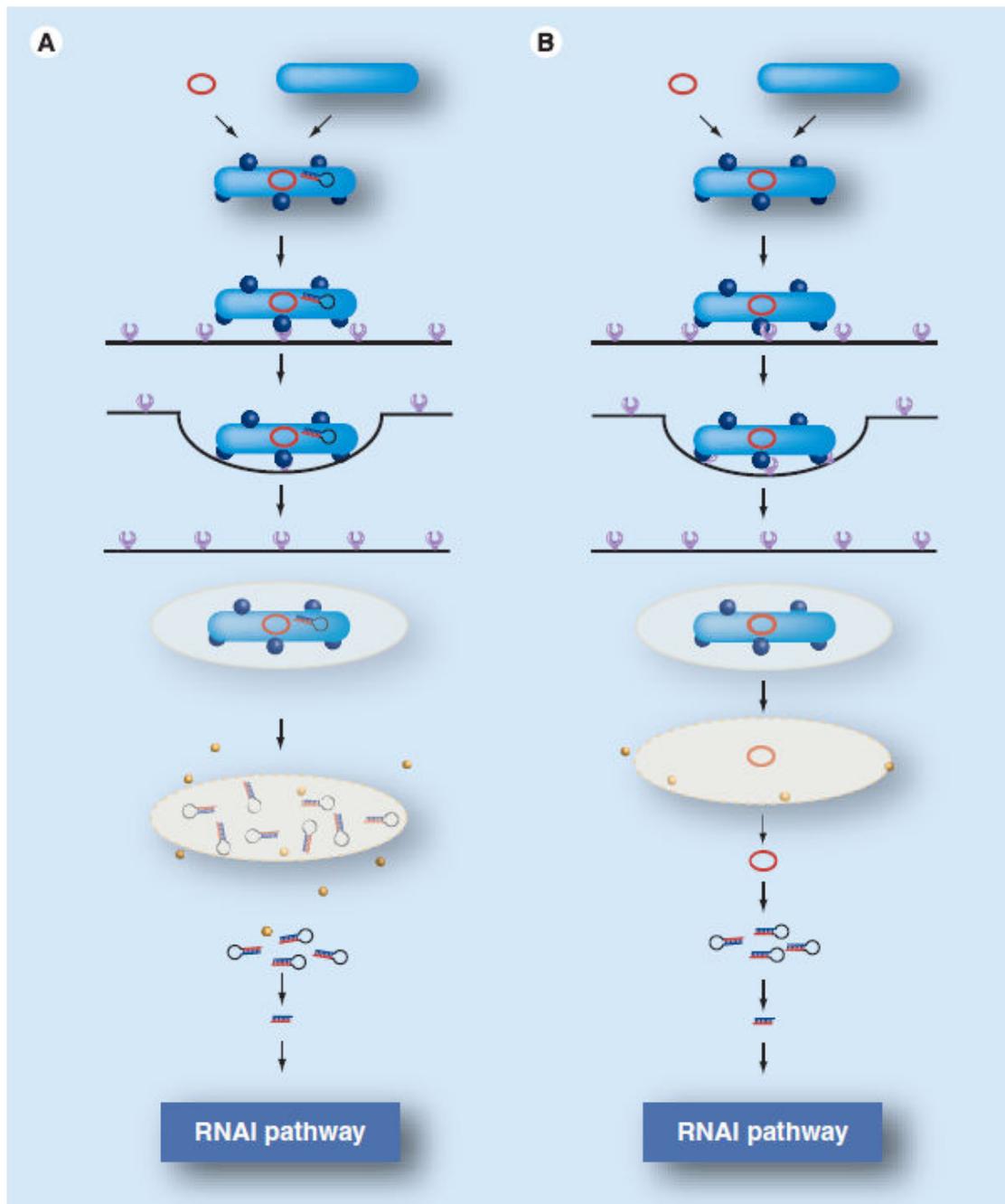
#### 4. Les bactéries comme vecteur d'ARNs interférents

Les bactéries peuvent être utilisées comme une plateforme innovante pour la délivrance d'ARNi. Cette approche s'appuie sur les travaux antérieurs avec les EDV qui peuvent délivrer des agents chimiothérapeutiques (MacDiarmid et al., 2007). Les bactéries peuvent également servir de vecteurs de shRNAs (« short hairpin RNA ») ou de miRNAs. Ces ARNi sont transcrits sous forme de séquences sens et antisens reliées par une boucle de nucléotides non appariés ressemblant aux pré-miRNAs (pour les shRNAs) ou aux pri-miRNAs (pour les miRNAs artificiels). Après la transcription, les miRNAs artificiels sont traités par le complexe Drosha-DGCR8 et exportés vers le cytoplasme, où ils engagent le complexe pré-RISC par la voie normale de biogenèse des miARN (**Figure 31**).

Deux systèmes ont été utilisés avec les bactéries pour la délivrance de shRNAs : le « transkingdom RNAi » (tkRNAi) et l'ARNi à médiation bactérienne (bmRNAi) (**Figure 47**) (Lages et al., 2012).

##### a. tkRNAi

Le tkRNAi, développé au Beth Israel Deaconess Medical Center, utilise des bactéries génétiquement modifiées pour produire et délivrer des shRNA contre des oncogènes ou des facteurs exprimés au sein de la tumeur dans les cellules tumorales. Ainsi, les bactéries invasives pénètrent dans la cellule tumorale cible, libèrent le shRNA dans le cytoplasme et activent la voie de l'ARNi pour inhiber l'expression des ARNm cibles.



**Figure 47 : Description des deux systèmes permettant la délivrance d'ARNi par les bactéries au sein d'une cellule.** (A) Les bactéries tkRNAi sont transformées par un vecteur codant pour les shRNA capables d'être transcrits à l'intérieur de la bactérie. Les shRNAs sont exprimés à l'intérieur des cellules bactériennes avant que les vecteurs ne soient libérés dans le cytoplasme de la cellule cible. Après la lyse de la bactérie, les molécules de shRNAs sont prises en charge par Dicer puis incorporés dans le complexe RISC. Le brin guide du shRNA s'hybride spécifiquement avec son ARNm cible, qui est ensuite dégradé par le RISC, ce qui conduit à l'extinction du gène au niveau post-transcriptionnel. (B) Le concept de bmRNAi utilise un plasmide codant le shRNA. Les bactéries pénètrent dans les cellules des mammifères par endocytose. Après la lyse de la bactérie, les vecteurs codant pour le shRNA sont libérés dans le cytoplasme de la cellule cible, puis rejoignent le noyau où la transcription a lieu *via* la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte. Les shRNAs transcrits sont ainsi pris en charge par Dicer et incorporés au complexe RISC pour exercer leur rôle inhibiteur de l'expression génique (d'après Lage & Fruehauf, 2011).

Pour la stratégie tkRNAi, un vecteur plasmidique spécialisé est nécessaire, contenant différents éléments génétiques (Lage and Fruehauf, 2011) :

- L'expression de shRNA thérapeutique d'intérêt contrôlée par un promoteur, ce qui permet une accumulation des molécules de shRNA thérapeutiques à l'intérieur de la cellule bactérienne.
- Pour l'invasion de la cellule cible, le locus *inv* de *Y. pseudotuberculosis* est nécessaire. Le gène code l'expression de la protéine invasine à la surface de la bactérie. L'invasine interagit avec l'intégrine- $\beta$ 1, un récepteur enchassé dans la membrane plasmique à la surface des cellules épithéliales. L'interaction invasine-intégrine  $\beta$ 1 déclenche un réarrangement du cytosquelette de la cellule cible, ce qui entraîne la formation d'un sillon et l'absorption par endocytose de la bactérie par la cellule cible.
- Après que la bactérie ait pénétré dans la cellule hôte par endocytose, la rupture de la membrane des vésicules endosomales est catalysée par la toxine listeriolysine O formant des pores, codée par le gène HlyA de *L. monocytogenes*. La paroi bactérienne est endommagée par des enzymes lysosomales ou par la déficience en nutriments lors de l'utilisation d'une souche de bactérie auxotrophe. Cela permet la libération des shRNA thérapeutiques de la bactérie dans le cytosol.

Les vecteurs d'expression, tels que le plasmide tkRNAi (TRIP), contenant les gènes d'invasion et d'évasion, *inv* et HlyA, ainsi que la séquence codante du shRNA sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7, sont introduits par exemple dans une souche d'*E. coli* non pathogène compétente BL21(DE3) qui exprime l'ARN polymérase T7. Etant donné que l'organisme modèle *E. coli* représente une bactérie physiologiquement présente dans l'intestin humain, cette stratégie de tkRNAi est principalement adaptée au traitement des troubles intestinaux importants tels que le cancer du côlon ou les maladies chroniques de l'intestin.

La première application du concept de tkRNAi a été conçue pour cibler l'ARNm codant la  $\beta$ -caténine oncogène associée au cancer du côlon (Xiang et al., 2006). La  $\beta$ -caténine, un composant de la voie de signalisation Wnt avec des caractéristiques oncogènes, a déjà été démontrée comme étant impliquée dans le développement de la majorité des cancers du côlon (Saif and Chu, 2010). Dans la première expérience de preuve de concept (Xiang et al., 2006), la lignée cellulaire SW480 de cancer du côlon humain a été utilisée pour l'exposition *in vitro* à *E. coli* contenant le système TRIP shRNA-anti- $\beta$ -caténine, puis traitée avec différents antibiotiques pour éliminer les bactéries extracellulaires. L'expérience a démontré que l'expression de la  $\beta$ -caténine oncogène diminuait aux niveaux de l'ARNm et protéique. Ces

données ont pu être confirmées *in vivo*. Les bactéries ont été administrées à des souris par voie orale plusieurs fois par semaine pendant 4 semaines. Une baisse du niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine a également été observée.

Pour évaluer la puissance et l'efficacité du concept tkRNAi dans un modèle complètement différent, cette technologie a été appliquée pour cibler la pompe d'extrusion de médicaments MDR1/P-gp (ABCB1). Dans cette étude, l'efficacité biologique de l'approche tkRNAi a été évaluée dans la lignée cellulaire EPG85-257RDB bien caractérisée de carcinome gastrique humain (Kruehn et al., 2009). Ce modèle cellulaire a déjà été utilisé pour différentes stratégies d'ARNi, telles que l'inhibition *in vitro* de MDR1/P-gp par des siRNA synthétisés chimiquement (Nieth et al., 2003), des shRNA administrés par des adénovirus (Kaszubiak et al., 2007), ainsi que des shRNA codés par des plasmides (Stege et al., 2004). Avec la technologie tkRNAi, l'expression de MDR a bien été inhibée et ceci a eu pour conséquence d'améliorer la sensibilité des cellules face aux traitements médicamenteux. Cependant, l'ampleur de la diminution de l'expression de l'ARNm de MDR par le tkRNAi était moins prononcée que ce qui avait été observé avec des siRNA synthétisés chimiquement (Nieth et al., 2003), et encore moins qu'avec les shRNA véhiculés par des adénovirus (Kaszubiak et al., 2007) ou des plasmides (Stege et al., 2004).

Plusieurs raisons doivent être prises en compte pour expliquer l'activité moins prononcée de ce système tkRNAi de première génération par rapport aux techniques conventionnelles d'ARNi (Kruehn et al., 2009). Différentes voies d'optimisation sont possibles au niveau de la biosynthèse bactérienne de molécules d'ARN thérapeutiques, l'optimisation devra porter sur le promoteur du bactériophage T7, sur la lyse des vésicules d'entrée contenant le shRNA et sur la diminution des dommages possibles au shRNA par modification chimique. De plus, des longueurs variables de l'ARN codé par le shRNA synthétisés pourraient conduire à un traitement par Dicer inefficace et, par conséquent, à une faible quantité de shRNAs véritablement actifs.

Cequent Pharmaceuticals (aujourd'hui Marina Biotech) a développé et breveté une nouvelle génération de plasmides tkRNAi et de bactéries porteuses qui démontrent une efficacité bien meilleure dans l'inhibition de l'expression génique (Lage and Fruehauf, 2011). Cette nouvelle génération de tkRNAi comprend plusieurs améliorations par rapport au système tkRNAi de première génération. Les nouvelles caractéristiques les plus importantes comprennent la production bactérienne de shRNA à partir d'un ensemble (une combinatoire) de différents promoteurs et de terminateurs non « T7 », et la stabilisation intracellulaire du

shRNA. Une thérapie à base de tkRNAi (CEQ508) utilisant cette technologie est actuellement en cours d'essais cliniques pour la polypose adénomateuse familiale au Massachusetts General Hospital (USA) (Lage and Fruehauf, 2011). Le traitement CEQ508 a franchi les premières phases des essais cliniques en 2017, mais ces essais auraient été interrompus en 2019.

### *b. bmRNAi*

Le concept de bmRNAi utilise des bactéries invasives pour délivrer des vecteurs plasmidiques bactériens contenant la séquence codant le shRNA dans la cellule cible. La transcription des shRNAs est alors assurée par la cellule hôte. Après la translocation des ARNi du noyau cellulaire de l'hôte vers le cytoplasme, la voie de l'ARNi peut être utilisée (Lages et al., 2012) (**Figure 47**).

La première étude par bmRNAi a utilisé la souche LH430 de *S. typhimurium* (atténuée, facultativement anaérobie et invasive), pour l'administration de plasmides codant pour le shRNA anti-Stat3 dans la lignée cellulaire RM-1 du carcinome de la prostate de souris *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al., 2007). Stat-3 est un membre de la famille des facteurs de transcription STAT (« Signal Transducers and Activators of Transcription »). Stat-3 est constitutivement activée par des tyrosines kinases dans un large spectre de tumeurs humaines. Il joue des rôles importants dans la promotion du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et l'inhibition de l'apoptose. De ce fait, Stat-3 constitue une molécule cible potentielle pour le traitement du cancer (Costantino and Barlocco, 2008).

*In vitro*, l'approche bmRNAi par *S. typhimurium* a diminué les niveaux d'expression de l'ARNm de Stat-3 et protéiques à 13-18% par rapport aux constructions contrôles (Zhang et al., 2007). L'inhibition de Stat-3 a été accompagnée par celle des effecteurs en aval de Stat-3 (c'est-à-dire Bcl-2, la cycline D1, c-Myc, le VEGF et la MMP-2). Ces effets ont entraîné l'induction de l'apoptose, l'arrêt en phase G1 et la diminution de la viabilité des cellules. De plus, les cellules RM-1 traitées avec *S. typhimurium* contenant le vecteur shRNA anti-Stat-3 n'ont pas formé de tumeurs lorsqu'elles ont été injectées dans les flancs de souris.

D'autres expériences avec un modèle orthotopique de cancer de la prostate chez la souris ont confirmé l'effet anti-tumoral de la souche LH430 de *S. typhimurium* utilisée. Cependant, il a été démontré qu'un traitement avec *S. typhimurium* seule sans plasmide codant pour le shRNA anti-Stat-3 exerçait déjà des effets anti-tumoraux, mais moindres. Un effet anti-métastatique avec le shRNA anti-Stat-3 a cependant pu être observé. Au final, les courbes de survie à long

terme ont montré une augmentation de la survie après traitement avec *S. typhimurium* contenant le plasmide shRNA anti-Stat-3.

Bcl-2 est surexprimé dans diverses tumeurs, y compris le mélanome. Il apparaît comme une molécule cible idéale pour le traitement du cancer. Une étude a utilisé la technique bmRNAi pour inhiber son expression (Yang et al., 2008). Dans cette étude, les cellules de mélanome B16-F10 de souris surexprimant Bcl-2 ont été traitées avec la souche atténuée LB5000 de *S. typhimurium* contenant des plasmides codant des shRNA dirigés contre l'ARNm du facteur anti-apoptotique Bcl-2. En conséquence, l'expression protéique et des transcrits de Bcl-2 ont été diminués avec un taux d'apoptose spontané accru dans les cellules. Ensuite, des cellules B16-F10 ont été implantées par voie sous-cutanée chez la souris. Après la formation de la tumeur, les souris ont reçu par voie orale *S. typhimurium* atténuée contenant un plasmide codant le shRNA anti-Bcl-2. Les chercheurs ont pu observer un retard dans la croissance de la tumeur et une prolongation de la survie des souris.

Malgré ces succès, comme pour l'approche tkRNAi, la stratégie bmRNAi semble avoir moins d'efficacité qu'avec des ARNi classiques (Lages et al., 2012).

### *c. miRNAs*

La capacité des bactéries à synthétiser et véhiculer un miRNA a été démontrée plus récemment. La première équipe à utiliser des bactéries pour véhiculer et produire un miRNA l'a fait chez la souris atteinte d'eczéma (Yoon et al., 2011, 2012). La souche *S. typhimurium* vivante et atténuée administrée oralement a été utilisée pour produire et véhiculer un miRNA pour inhiber l'expression de CCL22 (« C-C motif chemokine 22 ») responsable de l'inflammation chez des souris souffrant d'eczéma.

D'autres études utilisent les bactéries pour produire les miRNAs en laboratoire, les purifient ensuite pour des études fonctionnelles dans les cellules de mammifères. Cela concerne, par exemple, le miR-27b (Li et al., 2014), le miR-1291 (Li et al., 2015c), le miR-29b (Pereira et al., 2016), le miR-34a (Wang et al., 2015) et une trentaine de miRs, dont les miR-34a-5p et -124a-3p, dans l'étude de Ho et ses collaborateurs (Ho et al., 2018). Ces derniers proposent une technologie nCAR (« non coding RNA carrier »)/pré-miR qui serait adaptée à la production des miRs en plateforme de biotechnologie.

Différentes stratégies de production sont en fait utilisées avec différents vecteurs (Ho and Yu, 2016). Les rendements d'expression des miRNAs sont en général faibles dans la plupart des études.

# RESULTATS

---

# A. Rôle suppresseur de tumeur du miR-342-5p et du miR-491-5p dans les cellules de chondrosarcome humain

Cet article a été soumis pour publication dans la revue Cell & Bioscience (IF : 5,026)

## I. Contexte de la publication

Les traitements conventionnels par la radiothérapie et la chimiothérapie sont inefficaces pour le CS. Plusieurs voies de signalisation moléculaires sont impliquées dans ces mécanismes de résistance. Du fait qu'un miRNA a la capacité d'inhiber l'expression de plusieurs gènes différents de façon simultanée, leur utilisation offre une approche thérapeutique multi-cibles pertinente pour le traitement du CS. Cette approche permettrait en utilisant un seul miRNA, d'inhiber l'expression de plusieurs cibles moléculaires impliquées dans la résistance ou la survie des cellules de CS. Un miRNA pourrait donc permettre de rétablir la sensibilité des cellules tumorales aux traitements conventionnels, voire induire un effet cytotoxique direct. Le but de cette première étude était donc de mettre en évidence un miRNA cytotoxique ou chimiosensibilisateur dans différentes lignées de CS.

Au préalable à mon projet de thèse, le laboratoire d'accueil a identifié par criblage haut débit des miRNAs potentiellement cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs au cisplatine dans la lignée de CS SW1353. Ceci a été réalisé sur une banque de 1200 miRNAs humains par mesure de l'activité cellulaire en temps réel par impédancemétrie (technologie xCELLigence). Cette technologie permet, grâce à des mesures d'impédance, de suivre en temps réel, l'adhésion, la prolifération et la survie des cellules. Les effets cytotatiques et cytotoxiques des miRNAs peuvent donc être appréhendés par cette technologie, sans pouvoir déterminer précisément leur mode d'action. Par ailleurs, les plaques de culture qui ont été utilisées pour le criblage haut débit possèdent un fond en verre recouvert d'électrodes en or, plutôt qu'un fond en plastique comme utilisé classiquement en culture. Une analyse fonctionnelle individuelle des miRNAs présélectionnés par analyse haut débit a donc été nécessaire pour valider et préciser leur effet.

La première étape de cette analyse fonctionnelle a été de réaliser une analyse *in silico* parmi les miRNAs présélectionnés, pour identifier ceux possédant potentiellement des cibles impliquées dans des voies de signalisation régulant l'apoptose. C'est ainsi que, 5 miRNAs

(miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p et miR-149-5p) ont été sélectionnés pour une validation fonctionnelle sur 4 lignées de CS (SW1353, OUMS27, CH2879 et L835). Cette validation a été effectuée en normoxie, mais aussi en hypoxie qui correspond à la physioxie des CS. Les effets chimiosensibilisateurs des miRNAs ont également été évalués en utilisant des doses subléthales de CDDP pour les différentes lignées, c'est-à-dire des doses de CDDP induisant un blocage du cycle cellulaire en phase S et/ou G2/M. Lors de la validation fonctionnelle, le CDDP a été ajouté 48 h après la transfection du miRNA. Le but était de déterminer si le miRNA pouvait sensibiliser les cellules au CDDP.

Parmi ces 5 miRNAs, nous avons uniquement validé l'effet cytotoxique des miRs-491-5p et -342-5p dans la lignée SW1353, et ils ne se sont pas avérés chimiosensibilisateurs dans nos conditions expérimentales. Nous avons donc poursuivi nos investigations avec ces 2 miRNAs pour mettre en évidence leur mécanisme d'action et valider leurs cibles prédites par l'approche *in silico*. De plus, pour se rapprocher au mieux des conditions physiopathologiques, nous avons étudié l'action des miRNAs dans un modèle d'organoïde en 3 dimensions (3D) en hypoxie.

## II. Publication n°1

### **Tumor suppressive role of miR-342-5p in human chondrosarcoma cells and 3D organoids**

**Clément Veys<sup>1</sup>, Abderrahim Benmoussa<sup>1,2</sup>, Romain Contentin<sup>1</sup>, Amandine Duchemin<sup>1</sup>, Emilie Brotin<sup>3,4,5</sup>, Jérôme Lafont<sup>6</sup>, Yannick Saintigny<sup>7,8</sup>, Laurent Poulain<sup>4,5</sup>, Christophe Denoyelle<sup>3,4,5</sup>, Magali Demoor<sup>1</sup>, Florence Legendre<sup>1</sup> and Philippe Galéra<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Normandie University, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000, Caen, France.

clement.veys@unicaen.fr; contentinr@email.chop.edu; aduchemin@uliege.be; magali.demoor@unicaen.fr; florence.legendre@unicaen.fr; philippe.galera@unicaen.fr

<sup>2</sup> Research Center of the UHC Sainte-Justine and Department of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C54. abderrahim.benmoussa@umontreal.ca

<sup>3</sup> Normandie University, UNICAEN, ImpedanCELL Platform, Federative Structure 4206 ICORE, 14000, Caen, France. e.brotin@baclesse.unicancer.fr

<sup>4</sup> Normandie University, UNICAEN, Inserm U1086 ANTICIPE, Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancer (BioTICLA), 14000, Caen, France. l.poulain@baclesse.unicancer.fr; cdenoyelle@baclesse.unicancer.fr

<sup>5</sup> UNICANCER, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, 14000, Caen, France.

<sup>6</sup> CNRS UMR 5305, Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, Université Claude Bernard Lyon 1, Univ Lyon, 69367, Lyon, France. jerome.lafont@univ-lyon1.fr

<sup>7</sup> LARIA, iRCM, François Jacob Institute, DRF-CEA, 14000 Caen, France. yannick.saintigny@cea.fr

<sup>8</sup> Normandie University, UNICAEN, UMR6252 CIMAP, CEA - CNRS - ENSICAEN, 14000, Caen, France.

Correspondence: Philippe Galéra ; philippe.galera@unicaen.fr

## Abstract

**Background:** Chondrosarcomas are malignant bone tumours. Their abundant extracellular matrix of cartilaginous nature and their hypoxic microenvironment contribute to their resistance to chemotherapy and radiotherapy, and no effective therapy is currently available. The use of microRNAs may represent an interesting alternative to develop new therapeutic options.

**Methods:** High throughput functional screening by impedancemetry, performed for the first time in chondrosarcoma cells, allowed us to identify 5 miRNAs with potential antiproliferative or chemosensitive effects on SW1353 chondrosarcoma cells. An individual functional validation was then performed on three chondrosarcoma cell lines under normoxia and hypoxia. First, the metabolic and cytotoxic effects of miRNAs were evaluated. Then cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. Thereafter, western-blot, real time quantitative PCR, luciferase reporter assays and the study of autophagy by fluorescence microscopy were carried out to delineate the mechanisms of action of two cytotoxic miRNAs. Finally, the effects of miRNAs were studied on a 3D relevant chondrosarcoma organoid model under normoxia and hypoxia.

**Results:** The cytotoxic effects of miR-342-5p and miR-491-5p were confirmed on three chondrosarcoma cell lines. Both miRNAs induced apoptosis and miR-342-5p also induced autophagy. Western-blot and luciferase reporter assays identified for the first time Bcl-2 as a direct target of miR-342-5p, and also Bcl-xL as a direct target of both miR-342-5p and miR-491-5p in chondrosarcoma cells. MiR-491-5p also inhibited EGFR expression. Finally, only miR-342-5p induced cell death on a relevant 3D chondrosarcoma organoid model in hypoxia that mimics *in vivo* microenvironment.

**Conclusion:** Altogether, these results revealed the tumour suppressive activity of miR-342-5p, and to a lesser extent of miR-491-5p, on chondrosarcoma. Through this work, we also confirmed the potential of Bcl-2 family members as therapeutic targets in chondrosarcomas.

**Keywords:** chondrosarcoma, miR-342-5p, miR-491-5p, Bcl-2/Bcl-xL, apoptosis, autophagy.

## **Background**

Chondrosarcomas are the second most common primary malignant bone tumours after osteosarcomas [1,2]. They mainly affect adults between 30 and 70 years old. Chondrosarcomas are an heterogeneous group of tumours characterized by the production of an extracellular matrix with cartilaginous characteristics [3]. They are classified into different histological grades, from low to high, related to their metastatic potential and associated survival rates. Chondrosarcomas are resistant to conventional radiotherapy and chemotherapy. Several mechanisms are involved in their resistance [4]. For instance, they are poorly vascularized, produce an abundant cartilaginous extracellular matrix and are composed of a limited number of proliferating cells which, as whole, constitute important barriers for drug efficacy. The hypoxic microenvironment of chondrosarcomas is also an important contributor to their radioresistance because it prevents the formation of antineoplastic reactive oxygen species (ROS) after irradiation [4]. As a consequence, lethality varies between 10 and 50 %. Consequently, the only effective treatment for chondrosarcomas is the extensive resection of the tumour [4]. However, surgery is not always feasible, especially for the tumours located, for example, at the base of the skull. Therefore, there is an urgent need for new therapeutic strategies to treat chondrosarcomas and/or overcome their resistance to conventional therapies.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of about 20-25 nucleotides, which act as post-transcriptional regulators of mRNA most of the time through base-pairing and subsequent translation blockade or mRNA decay [5]. A single miRNA can regulate several hundred different mRNAs. Additionally, several miRNAs can share the same mRNA as a target, thereby allowing miRNAs to be key regulators of complex networks of targets [6,7]. MiRNAs play an essential role in many physiological processes, but also in numerous pathological conditions, particularly in cancer progression, including chondrosarcomas. Several studies have reported an aberrant expression of miRNAs in chondrosarcomas [8,9]. For example, miR-100, already identified as a tumour suppressor in many cancers, was down-regulated in chondrosarcoma compared to normal articular chondrocytes [8]. Another study found that miR-100 was able to resensitize resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of mTOR [10]. Consequently, miRNAs could be used as diagnostic and prognostic biomarkers, but may also allow the discovery of novel therapeutic targets in chondrosarcomas [9,11,12]. Various pathways, regulated by miRNAs, and influencing proliferation, progression, invasion, angiogenesis and chemosensitivity, were identified in chondrosarcoma. However, and to the best of our knowledge, no study explored the effect of

miRNAs that directly target anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 in chondrosarcoma. Only two studies using siRNA designed against the anti-apoptotic molecules Bcl-2, Bcl-xL, XIAP or survivin demonstrated an increase of sensitivity to doxorubicin or irradiation [13,14]. The restoration of chemosensitivity to doxorubicin and cisplatin was also obtained with the BH3 mimetic ABT-737 in various chondrosarcoma cell lines [15,16].

In the present study, using a functional high-throughput miRNA screening and miRNA target prediction, we selected 5 miRNAs that could induce apoptosis in SW1353 chondrosarcoma cell line by targeting *BCL2*, *BCL2L1* or *MCL1* mRNAs. We performed, thereafter, individual functional studies with miR-149-5p, miR-342-5p, miR-491-5p, miR-541-5p and miR-625-5p. The potential cytotoxic and chemosensitizing effects of the miRNAs were studied under both normoxia and hypoxic physioxia conditions, the latter being more representative of the *in situ* physiopathology microenvironment of chondrosarcomas [17]. We validated the apoptotic effects of miR-491-5p and miR-342-5p in three chondrosarcoma cell lines in both oxic conditions and identified key signalling pathways involved in their activity. Through a luciferase assay, we demonstrated a direct post-transcriptional inhibition of both anti-apoptotic *BCL2L1* and *BCL2* mRNAs by miR-342-5p, and a direct post-transcriptional inhibition of *BCL2L1* mRNA by miR-491-5p. Considering the importance of autophagy for cancer biology and the growing number of autophagy-related miRNAs [18], we also evaluated autophagy, and found that miR-342-5p can activate this process. Finally, we reported for the first time the tumour suppressive effect of miR-342-5p in a 3D organoid, in hypoxia, a culture model more representative of the physiopathology of chondrosarcomas than 2D cell-culture.

## Results

### *A high-throughput screening identifies miRNAs with potential antiproliferative and chemosensitive effects on a chondrosarcoma cell line.*

We performed a functional high-throughput screening using a human library of 1200 miRNAs mimics in the SW1353 chondrosarcoma cell line. The study was based on continuous measurement of impedance to analyse the dynamic behaviour of the cells (adhesion, proliferation and survival) after transfection with miRNAs mimics combined or not with cisplatin (CDDP) treatment. The effect of each miRNA was compared with that of the miR-Ctrl. We used three criteria to select the most potent cytotoxic miRNAs [the shape of the curve,

area under the curve (AUC), and the cell index (CI) at the end of the experiment] (Figure 1). Moreover, morphological observation of the cell confluence provides us complementary information for the final selection of miRNAs (Figure S1). Finally, of all these miRNAs, 5 were found to have significant effect on cell proliferation/attachment (Figure 1 and S1).

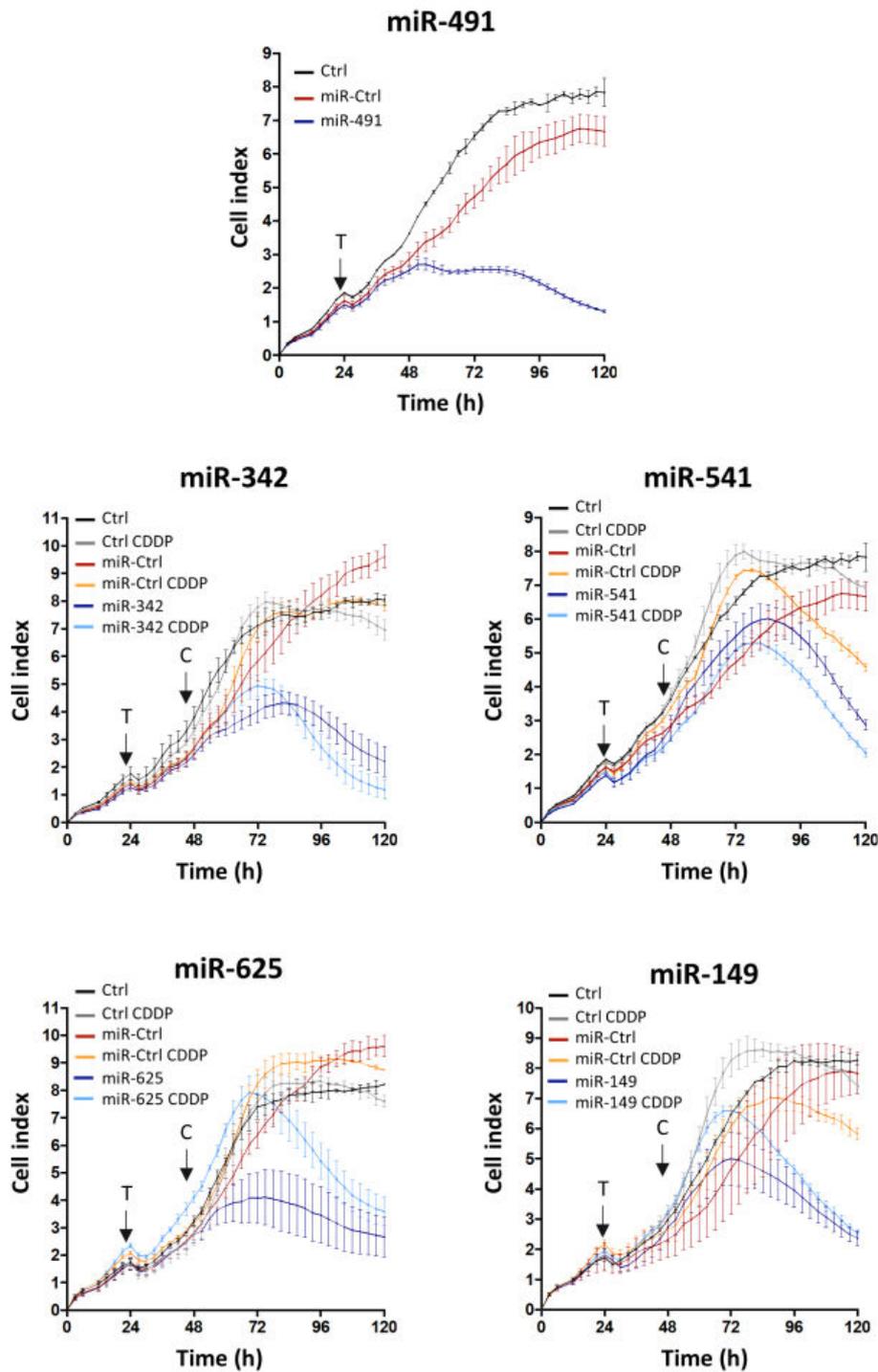
MiR-491-5p, an “apoptomiR” previously identified as cytotoxic in ovarian cancer cells with the same xCELLigence system [19], was initially used as a positive control. In SW1353 cells, compared to miR-Ctrl, miR-491-5p greatly altered the shape of the curve as early as 24 h after transfection. Consequently, at 96 h post-transfection, the cell index was decreased by 4.4-fold relative to miR-Ctrl ( $p$  value  $< 0.01$  by unpaired Student’s  $t$  test), clearly demonstrating the potential cytotoxic effect of miR-491-5p in SW1353 cells.

MiR-342-5p modified the cell index from approximately 36 h post-transfection until the end of the experiment (5-fold decrease relative to miR-Ctrl, 120 h after plating the cells,  $p < 0.0001$ ). In the presence of a sublethal dose of CDDP and miR-342-5p, the cell index was further decreased (7-fold relative to miR-Ctrl + CDDP, 120 h after seeding,  $p < 0.001$ ) suggesting that miR-342-5p could sensitize SW1353 cells to CDDP.

We observed similar results when combining miR-541-5p and CDDP with a final cell index lower than for miR-541-5p alone. However, the antiproliferative effect of miR-541-5p seemed less marked than that of miR-342-5p. It only decreased by 2.1-fold the cell index, 120 h after seeding ( $p < 0.01$  relative to miR-Ctrl), and its effect was delayed by 28 h (started approximately 60 h post-transfection versus 32 h for miR-342).

MiR-625-5p and miR-149-5p also diminished the cell index from 36 h and 48 h post-transfection, respectively, supporting their antiproliferative activity. Compared to miR-Ctrl, the transfection of these miRNAs led to a 3.8- and 3.2-fold decrease in cell index, respectively, 120 h after seeding ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively). Cell indices were higher in the presence of CDDP for both miRNAs. The final cell index was the same for miR-149 with or without CDDP and was higher for miR-625 with CDDP than without CDDP.

At the end of the experiment, morphological examination of the cells confirmed that all miRNAs under study reduced cell proliferation compared to miR-Ctrl (Figure S1).



**Figure 1: Identification of miRNAs with potential antiproliferative and chemosensitizing effects by high-throughput screening.** SW1353 cells were seeded in triplicate onto 96-well E-plates VIEW. They were grown for 24 h before transfection (arrow surmounted by a T) with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p. The cells were additionally treated or not with 1  $\mu$ g/ml of CDDP 24 h post-transfection (arrow surmounted by a C). Each condition was performed in triplicate. Real time growth curves were monitored with the xCELLigence System. Impedance was recorded every 2 h during 120 h. Cell index profiles of one experiment per miRNA, with mean  $\pm$  SD, are shown. CDDP : cisplatin, Ctrl : control.

***MiR-491-5p and miR-342-5p have antimetabolic and cytotoxic effects on the SW1353 chondrosarcoma cell line.***

Next, we assessed the antiproliferative effects of these 5 selected miRNAs with a functional analysis performed in both normoxia and hypoxia in SW1353 cells.

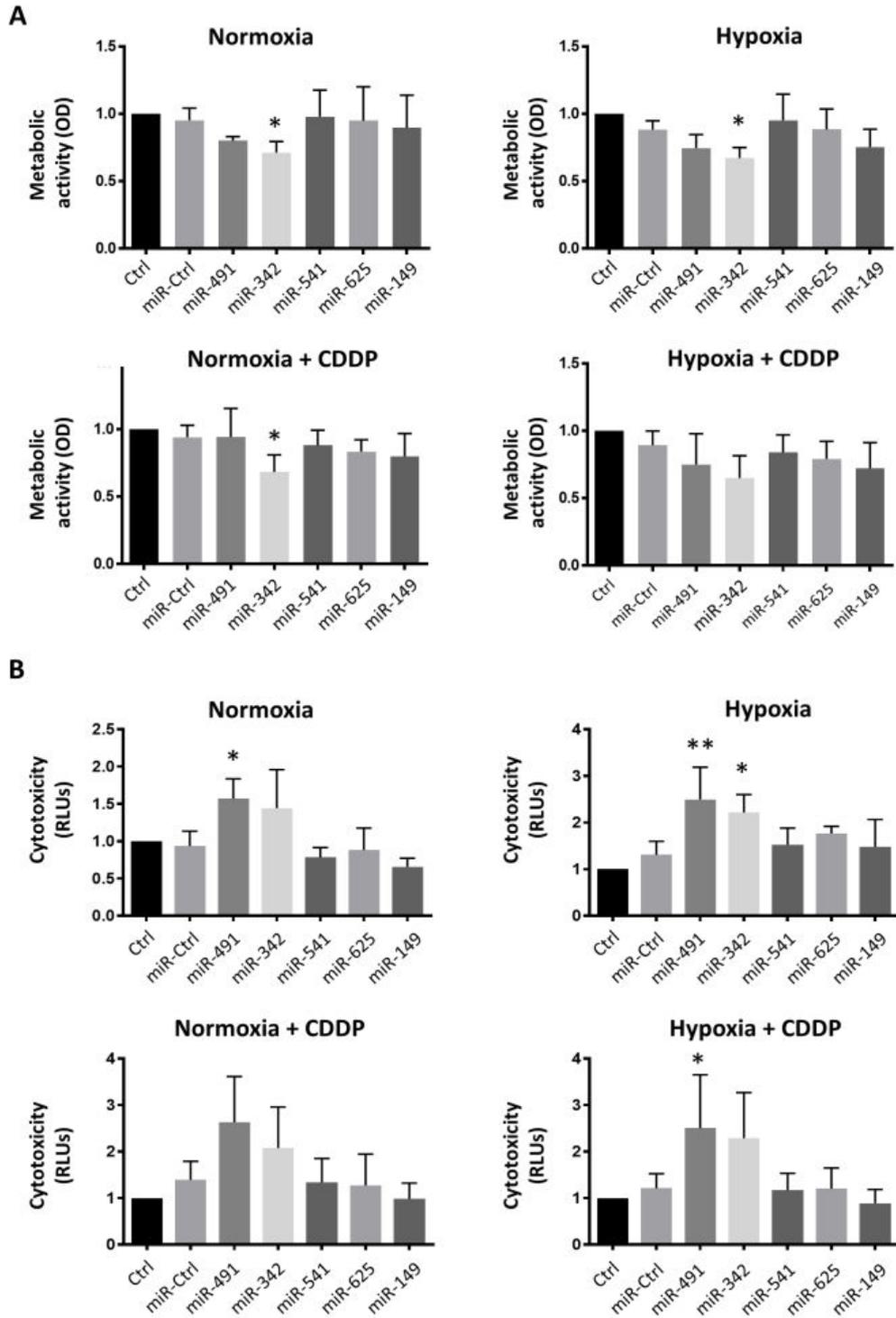
First, we carried out an XTT assay measuring the metabolic activity of the cells (Figure 2A). Only miR-342-5p significantly decreased cellular metabolism under normoxia and hypoxia (0.7-fold decrease relative to miR-Ctrl,  $p < 0.05$ ). MiR-491-5p seemed to reduce metabolic activity (0.8-fold decrease), but this effect was not statistically significant.

Afterwards, we investigated the potential chemosensitizing effect of the 5 miRNAs of interest (Figure 2A). Upon sublethal exposure to CDDP, only the cells treated with miR-342-5p under normoxic conditions experienced a significant decrease in their metabolic activity (0.75-fold decrease relative to miR-Ctrl/CDDP-treated cells,  $p < 0.05$ ). In all cases, the metabolic activity did not further decrease with the combination of miRNAs and CDDP, compared to miRNAs alone.

Then, we investigated the potential cytotoxic effects of these miRNAs (Figure 2B). Only miR-491-5p and miR-342-5p elicited significant cytotoxic effects on the SW1353 cells with a 1.7- and 1.9-fold increase in cytotoxicity for miR-491-5p under normoxia and hypoxia respectively, and a 1.7-fold increase for miR-342-5p under hypoxia, compared to their respective miR-Ctrl. In the presence of CDDP, these miRNAs increased cytotoxicity by the same magnitude as without CDDP, suggesting non chemosensitizing effects. In this assay, we did not confirm the potential chemosensitizing effect of miR-342-5p and miR-541-5p expected from the high-throughput screening using the xCELLigence System.

***MiR-491-5p and miR-342-5p induce cell death in three chondrosarcoma cell lines, but do not affect the cell cycle of healthy human articular chondrocytes.***

We analyzed cell cycle progression using flow cytometry in the SW1353 chondrosarcoma cell line (Figure 3). None of the miRNA under investigation induced cell cycle blockade, but miR-491-5p and miR-342-5p induced a significant accumulation of cells in the sub-G1 phase associated to a cell death induction.



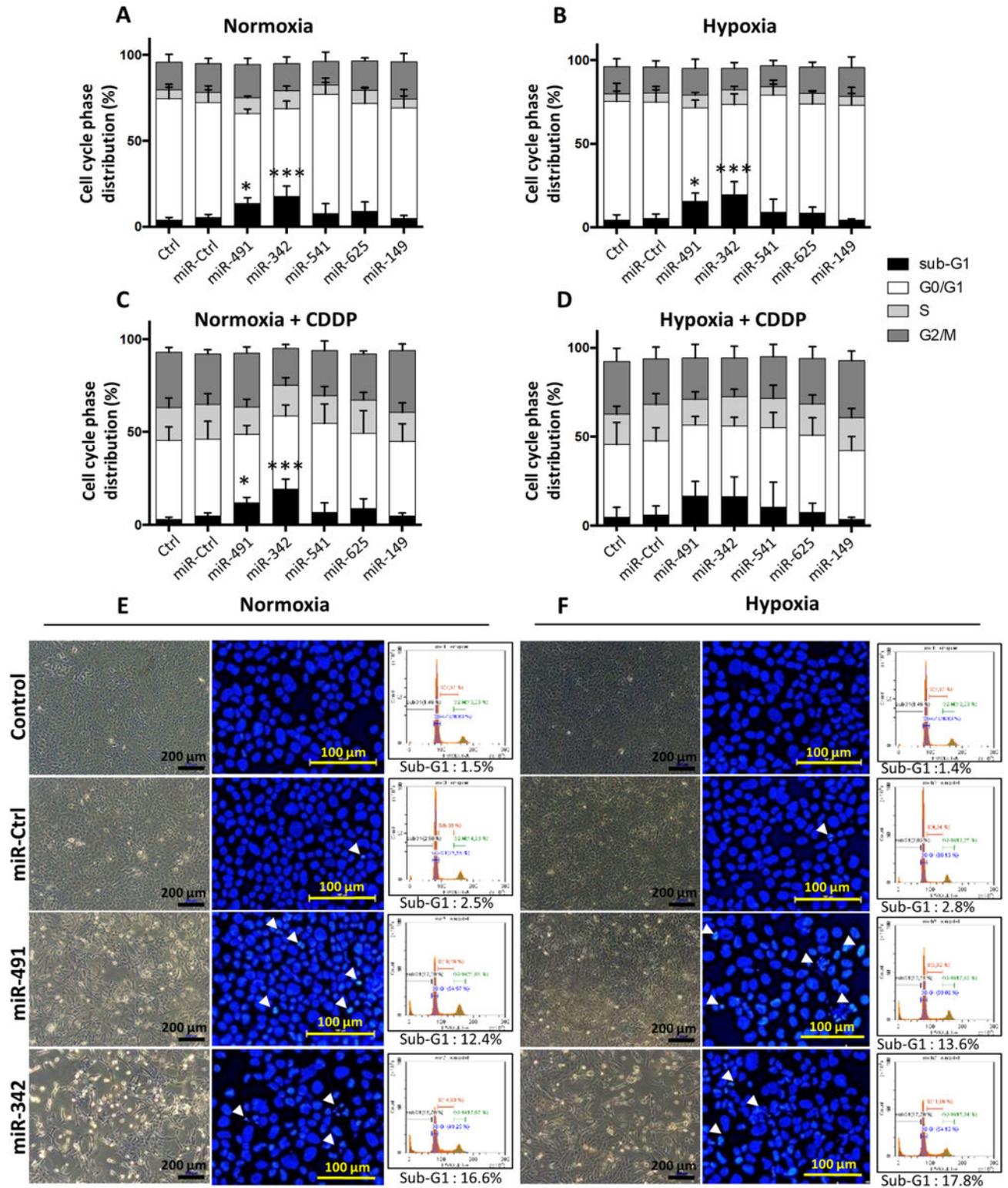
**Figure 2: Analysis of the cytotoxic and anti-metabolic effects of miRNAs on SW1353 cells.** SW1353 cells were cultured under normoxia or hypoxia. They were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p. The treatment with CDDP (1  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24h. (A) The metabolic activity of cells was evaluated 72 h post-transfection and expressed as mean of OD  $\pm$  SD of 5 independent experiments. (B) The cytotoxicity of the miRNAs was evaluated 72 h post-transfection and expressed as mean of RLU  $\pm$  SD of 4 independent experiments. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

Whatever the oxic condition, miR-491-5p and miR-342-5p increased the percentage of sub-G1 events: 2.8-fold average increase under normoxia and 3.4-fold average increase under hypoxia ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  relative to miR-Ctrl-treated cells in each group; Figures 3A and B). The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 5.4%, 13.4% and 17.4% under normoxia, 5.2%, 15.6%, and 19.4% under hypoxia, for miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p respectively. There was also a decrease in cellular density, more cellular debris and condensed and/or fragmented chromatin, typical of apoptotic cells, after miR-491-5p and miR-342-5p transfection (Figures 3E and 3F).

The efficiency of the transfection of miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p was to a similar extent as observed for miR-491-5p and miR-342-5p (overexpression of at least 3000-fold,  $p < 0.001$ ; Figure S2). However, their overexpression did not induce cell death (Figures 3A and 3B), and the cells reached confluency and no cellular debris were detected (data not shown).

The treatment with a sublethal dose of CDDP increased the percentage of events in the S and G2/M phases at the expense of the G0/G1 phase (Figures 3C, 3D and S3). MiR-491-5p and miR-342-5p increased the percentage of sub-G1 events when combined with CDDP: 2.6-fold average increase under normoxia and 3.4-fold average increase under hypoxia. The significance was reached only under normoxia ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively relative to miR-Ctrl/CDDP-treated cells). The proportions of cells in the sub-G1 phase were: 4.7%, 11.8% and 19.3% under normoxia, 6.1%, 16.5%, and 16.5% under hypoxia, for miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p respectively. The miRNAs-induced increases in sub-G1 peaks were comparable with or without CDDP, suggesting no chemosensitizing effect for all the miRNAs. From these results, we concluded that the antiproliferative effects of miR-491-5p and miR-342-5p were due to induction of cell death in the SW1353 cell line, without any chemosensitizing effect.

We thus focused investigations on these two miRNAs and assessed their effects on 3 other chondrosarcoma cell lines (OUMS-27, CH2879 and L835) and on primary human articular chondrocytes (HAC) as healthy controls (Figure 4). In OUMS-27 cells, miR-491-5p increased the percentage of sub-G1 events under normoxia and hypoxia (by 1.6- and 1.5-fold respectively but with no significance; Figure 4A). MiR-342-5p induced a 2.2-fold increase ( $p < 0.05$ ) in the sub-G1 peak compared to miR-Ctrl-treated cells, under both oxic conditions. The proportions of cells in the sub-G1 phase were: 20.7%, 32.9% and 46% under normoxia, 21.7%, 32.9%, and 47.8% under hypoxia, for miR-Ctrl, miR-491 and miR-342-5p respectively.



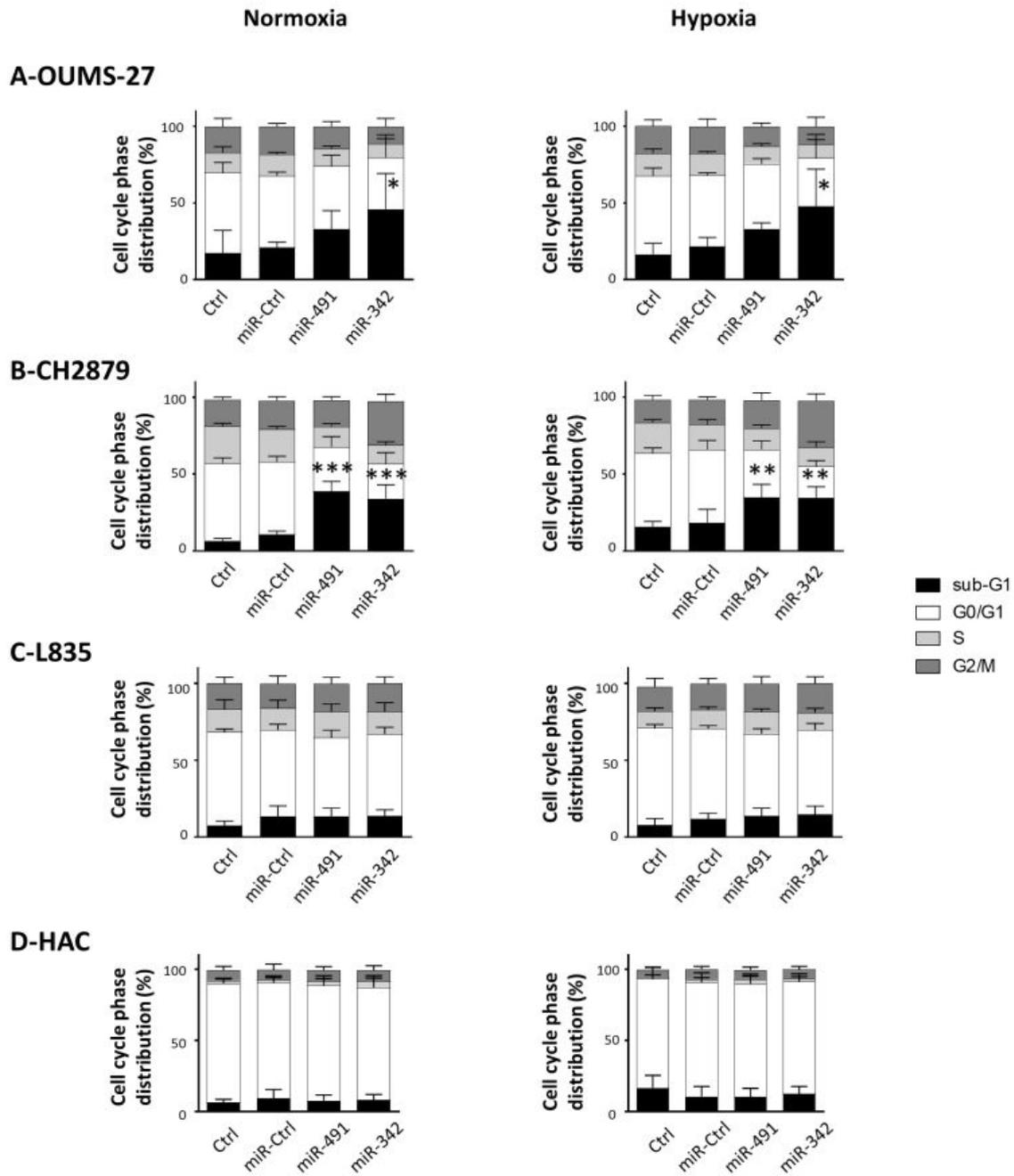
**Figure 3: Individual functional validation of cytotoxic or chemosensitizing effects of miRNAs on SW1353 cells.** SW1353 cells were cultured under normoxia (A, C, E) or hypoxia (B, D, F). They were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p, and miR-149-5p. An additional treatment with CDDP (1  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection (C and D). Analyses were carried-out 72 h post-transfection. (A-D) Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. The histograms represent the analysis of 5 independent experiments (mean  $\pm$  SD) with the different phases of the cycle. Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events, between miR-Ctrl and miRNA-treated cells, were

determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). (E-F) In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of the panels, nuclear morphology was obtained after DAPI staining as described in the "Materials and Methods" section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of the panels, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 5 independent experiments.

In CH2879 cells, miR-491-5p significantly increased the percentage of sub-G1 events (by 3.6-fold under normoxia ( $p < 0.001$ ) and 1.9-fold under hypoxia ( $p < 0.01$ ); Figure 4B). MiR-342-5p also raised the percentage of sub-G1 events (by 3.2-fold under normoxia ( $p < 0.001$ ) and 1.9-fold under hypoxia ( $p < 0.01$ )). The proportion of cells in the sub-G1 phase were 10.6%, 38.8% and 34% under normoxia, 18.4%, 34.9%, and 34.6% under hypoxia, for miR-Ctrl, miR-491 and miR-342-5p respectively. The increase in sub-G1 peaks with miR-491-5p and miR-342-5p, that translates induction of cell death in both cell lines, was supported by the numerous cellular debris and apoptotic cells observed through fluorescence microscopy on DAPI-stained slides (Figure S4). In L835 cells, miR-491-5p and miR-342-5p did not induce any cell cycle arrest, nor did they significantly alter the sub-G1 peak, whatever the oxic condition (Figures 4C and S5A). Therefore, these two miRNAs did not induce cell death in this chondrosarcoma cell line. We observed similar results for primary HAC transfected with miR-491-5p and miR-342-5p, in both oxic conditions, suggesting that these miRNAs have no cytotoxic effects on healthy cartilage cells (Figures 4D and S5B).

On OUMS-27 and CH2879, the treatment with a sublethal dose of CDDP significantly increased the percentage of events in the S phase under normoxia and hypoxia (from 1.5- to 2-fold; Figure S6-A et S6-B). On L835 cells, CDDP treatment increased the percentage of G2/M events: 1.9-fold in normoxia ( $p < 0.05$ ) and 2.7-fold in hypoxia ( $p < 0.001$ ) (Figure S6-C). As on SW1353 cells, miR-491-5p- and miR-342-5p-induced increases in sub-G1 peaks were similar with or without CDDP, suggesting no chemosensitizing effects of these miRNAs.

Overall, miR-491-5p and miR-342-5p seem to be apoptomiRs in SW1353, OUMS-27 and CH2879 chondrosarcoma cell lines, but they do not seem to be chemosensitizers to the activity of CDDP.



**Figure 4: Analysis of the cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on chondrosarcoma cells and on HAC.** OUMS-27 cells (A), CH2879 cells (B), L835 cells (C), and HAC (D) were cultured under normoxia or hypoxia. Cell lines were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p. Primary HAC were transfected with 20 nM miRNAs 5 days after seeding. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry 72 h post-transfection. The histograms represent the analyses of the different phases of the cell cycle of at least 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD). Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

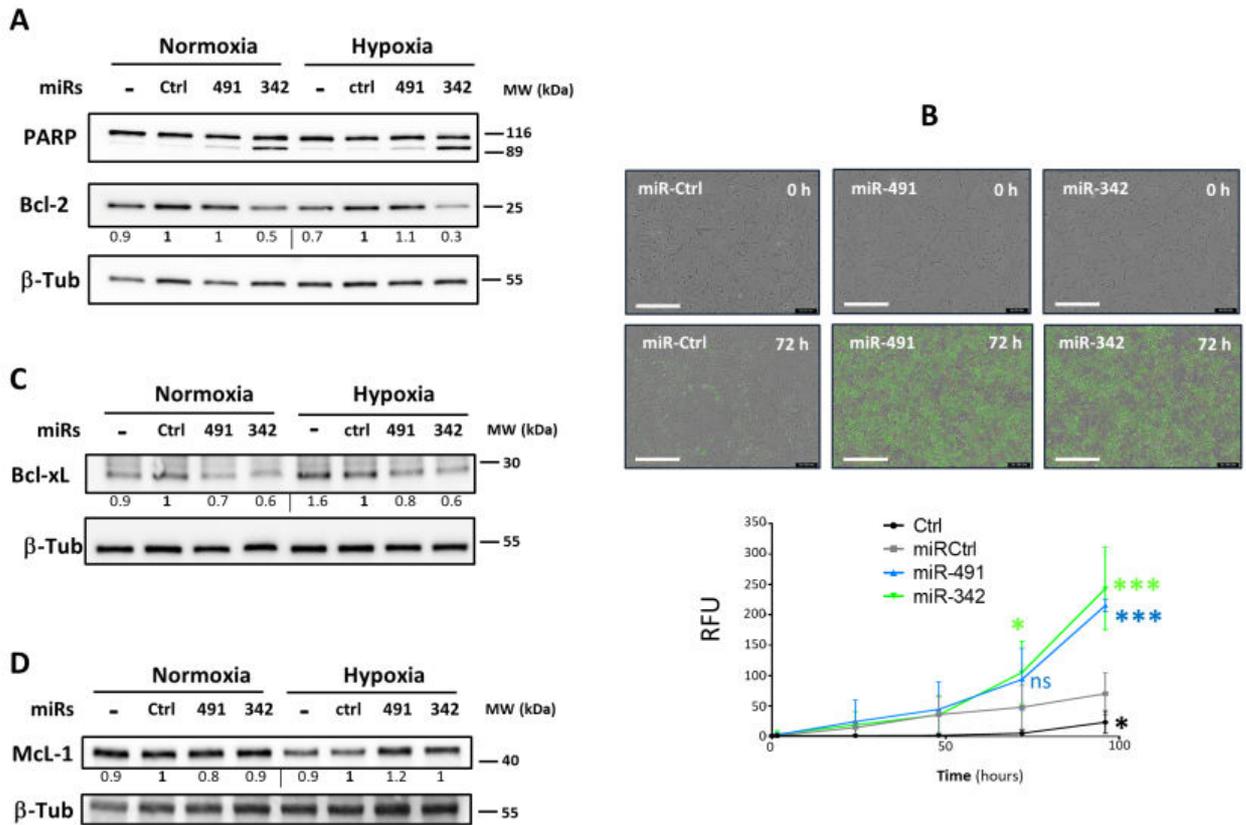
***MiR-491-5p and miR-342-5p activate the apoptosis pathway under normoxia and hypoxia in chondrosarcoma cells.***

We next focused investigation on the induction of apoptosis. Regardless of the oxygen level, miR-491-5p and miR-342-5p induced the cleavage of PARP, with more marked effects of miR-342-5p on SW1353 cells (Figure 5A), which is in accordance with our previous results on cell death (Figure 3). PARP was also cleaved in OUMS-27 and CH2879 cell lines, in both oxic conditions (Figure S7A). In addition, caspase 3/7 activity in SW1353 cells was evaluated with the measurement of green fluorescence in the nuclei, using the Incucyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay. Both miRNAs increased caspase-3/7 activity in SW1353 cells, with the higher significance observed 96 h post-transfection ( $p < 0.001$ , Figure 5B). Because PARP cleavage by activated caspases is also a hallmark of apoptosis, these two results imply that miR-491-5p and miR-342-5p induce apoptosis in chondrosarcoma cells.

Members of the anti-apoptotic Bcl-2 family are among the predicted targets for both miRNAs (Bcl-xL (validated) and Mcl-1 for miR-491-5p; Bcl-2, Bcl-xL (validated) and Mcl-1 for miR-342-5p, tables S1 and S2). We therefore evaluated their expression to assess their involvement in the induction of apoptosis by these miRNAs in chondrosarcoma cell lines.

Bcl-2 protein expression was greatly decreased upon miR-342-5p overexpression in SW1353 cells (by 2-fold under normoxia and 3.3-fold under hypoxia compared to their respective miR-Ctrl, figure 5A). We obtained comparable results for OUMS-27 and CH2879 cells (Figure S7B). By contrast, miR-491-5p did not modulate the expression of Bcl-2 in SW1353 (Figure 5A) and OUMS-27 cells (Figure S7B), independently of the oxic condition, while it decreased by approximately 2-fold Bcl-2 protein levels in CH2879 cells in hypoxia (Figure S7B). MiR-491-5p and miR-342-5p decreased the protein expression of Bcl-xL in SW1353 cells under both oxic conditions (from 1.3- to 1.7-fold, Figure 5C). Both miRNAs also reduced Bcl-xL protein levels in OUMS-27 and CH2879 cells (Figure S7C). Although Mcl-1 could be a potential target of these two miRNAs, they had no effect on its expression in both SW1353 (Figure 5D) and OUMS-27 cells (Figure S7D). On the contrary, they rather tended to increase Mcl-1 protein levels in CH2879 cells (in particular with miR-491-5p, Figure S7D).

In summary, miR-342-5p seems able to limit the expression of Bcl-2 and Bcl-xL, and miR-491-5p seems to be a negative regulator of Bcl-xL which underly their pro-apoptotic activity in chondrosarcoma cells.



**Figure 5: Analysis of the apoptotic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on SW1353 cells.** In panels A, C, and D SW1353 cells were cultured under normoxia or hypoxia. They were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p. Analysis were carried-out 72 h post-transfection. Protein extracts were analyzed by western blotting to evaluate PARP, Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 levels versus b-tubulin (b-Tub) loading control. Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to b-tubulin and to the corresponding miR-Ctrl for each oxitic condition. (B) SW1353 cells were cultured under normoxia and transfected 24 h after seeding as before. The caspase-3/7 activity was then assessed in real time for 96 h as described in the “Material and Methods” section. The images shown are representative of the experimental results obtained. Scale bar: 400  $\mu$ m. The graph provides the analysis of fluorescence of 4 independent experiments (mean of RFU  $\pm$  SD). The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using two-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

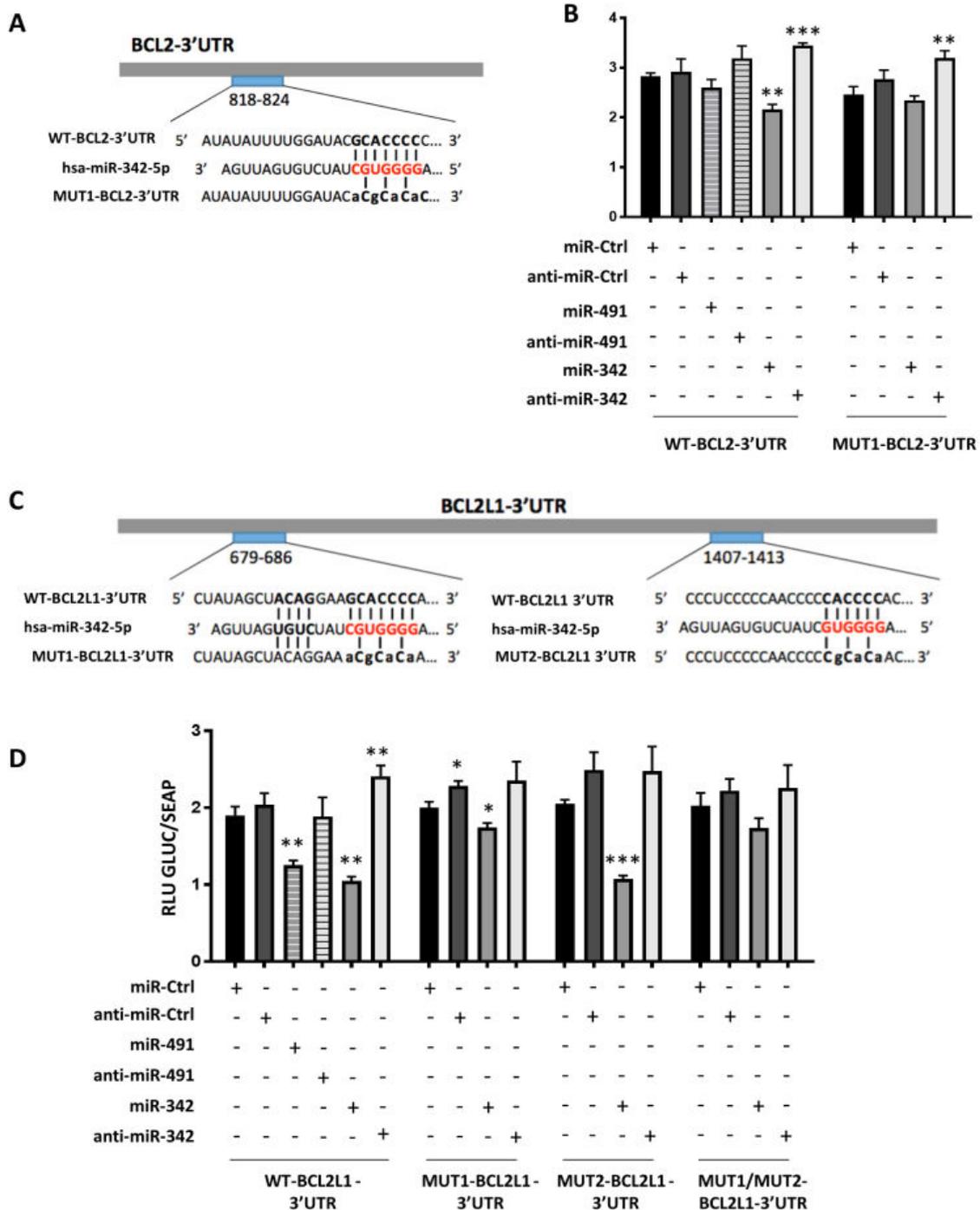
***MiR-342-5p targets BCL2L1 and BCL2 mRNAs, whereas miR-491-5p targets only BCL2L1 mRNA in the SW1353 chondrosarcoma cell line.***

To verify that miR-491-5p and miR-342-5p effects on Bcl-2 (*BCL2* gene) or BCL-xL (*BCL2L1* gene) were through direct binding to their respective mRNA, we co-transfected, in SW1353 cells, luciferase-reporter vectors containing the 3'UTR sequence of these mRNAs along with either miR-491-5p or miR-342-5p mimics or their corresponding hairpin inhibitors.

*In silico* analysis identified a potential binding site for miR-342-5p between nucleotides 818 and 824 on BCL2-3'UTR (Figure 6A). Only the transfection of miR-342-5p significantly decreased the luciferase activity of the reporter vector containing the WT-BCL2-3'UTR (-23% relative to miR-Ctrl,  $p < 0.01$ , figure 6B). By contrast, the co-transfection with anti-miR-342-5p significantly increased RLU (by 22%) which is consistent with an inhibitory effect of miR-342-5p. Mutation in the binding site for miR-342-5p in the 3'UTR of BCL2 prevented the inhibitory effect of this miRNA. As previously, co-transfection with anti-miR-342-5p increased RLU (+30%,  $p < 0.01$ ).

*In silico* analysis did not identify any potential binding site for miR-491-5p in the 3'UTR of *BCL2 mRNA*. Expectedly, miR-491-5p did not modulate the luciferase activity of WT-BCL2-3'UTR reporter construct (Figure 6B). Therefore, in SW1353 cells, only miR-342-5p can downregulate Bcl-2 protein expression through direct binding to the 818-824 region in the 3'UTR of *BCL2 mRNA*.

We identified 2 putative binding sites for miR-342-5p in BCL2L1-3'UTR, at positions 679-686 and 1407-1413. We thus made constructs where these sites were mutated separately (MUT1 and MUT2 respectively, figure 6C). Transfection of miR-342-5p led to a significant decrease in luciferase activity only when co-transfected with WT-BCL2L1-3'UTR or MUT2-BCL2L1-3'UTR (-45% and -47%,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively; figure 6D). In comparison, the overexpression of this miRNA diminished the reporter activity by only 13% ( $p < 0.05$ ) for the MUT1-BCL2L1-3'UTR construct and by 14% (NS) for the double mutant MUT1/MUT2-BCL2L1-3'UTR construct. In parallel, co-transfection of anti-miR-342-5p with all the constructs led to a slight increase in the luciferase activities. Therefore, in SW1353 cells, miR-342-5p downregulates Bcl-XL protein expression through preferential and direct binding to the 679-686 region in the 3'UTR of *BCL2L1 mRNA*.



**Figure 6: Inhibition of both *BCL2* and *BCL2L1* mRNAs by miR-342-5p and of *BCL2L1* mRNA by miR-491-5p.** (A) The 3'UTR sequence of *BCL2* has been aligned with the conserved sequence complementary to hsa-miR-342-5p. Wild (WT) and mutant (MUT1) luciferase vectors of *BCL2*-3'UTR are indicated. (B) WT and MUT1 reporter vectors of *BCL2*-3'UTR (0.25 ng/ $\mu$ l) were co-transfected with the indicated miR or anti-miR (20 nM) in SW1353 cells. (C) The 3'UTR sequences of *BCL2L1* have been aligned with the conserved sequence targeted by hsa-miR-342-5p. WT and mutants (MUT1, MUT2) luciferase vectors including *BCL2L1*-3'UTR are indicated. The MUT1/MUT2-*BCL2L1*-3'UTR vector contains both mutations 1 and 2. (D) WT and mutant vectors of *BCL2L1*-3'UTR (1 ng/ $\mu$ l) were co-transfected with the indicated miR or anti-miR (20 nM) in SW1353 cells. (B, D) SEAP and GLUC luciferase activities were measured 24 h post-transfection. GLUC activity was normalized to SEAP activity and expressed as RLU. The data show a representative experiment (mean  $\pm$  SD) of 4 independent experiments performed in triplicate. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA- or anti-miRNA-treated cells was evaluated by two-tailed Student's t-test (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

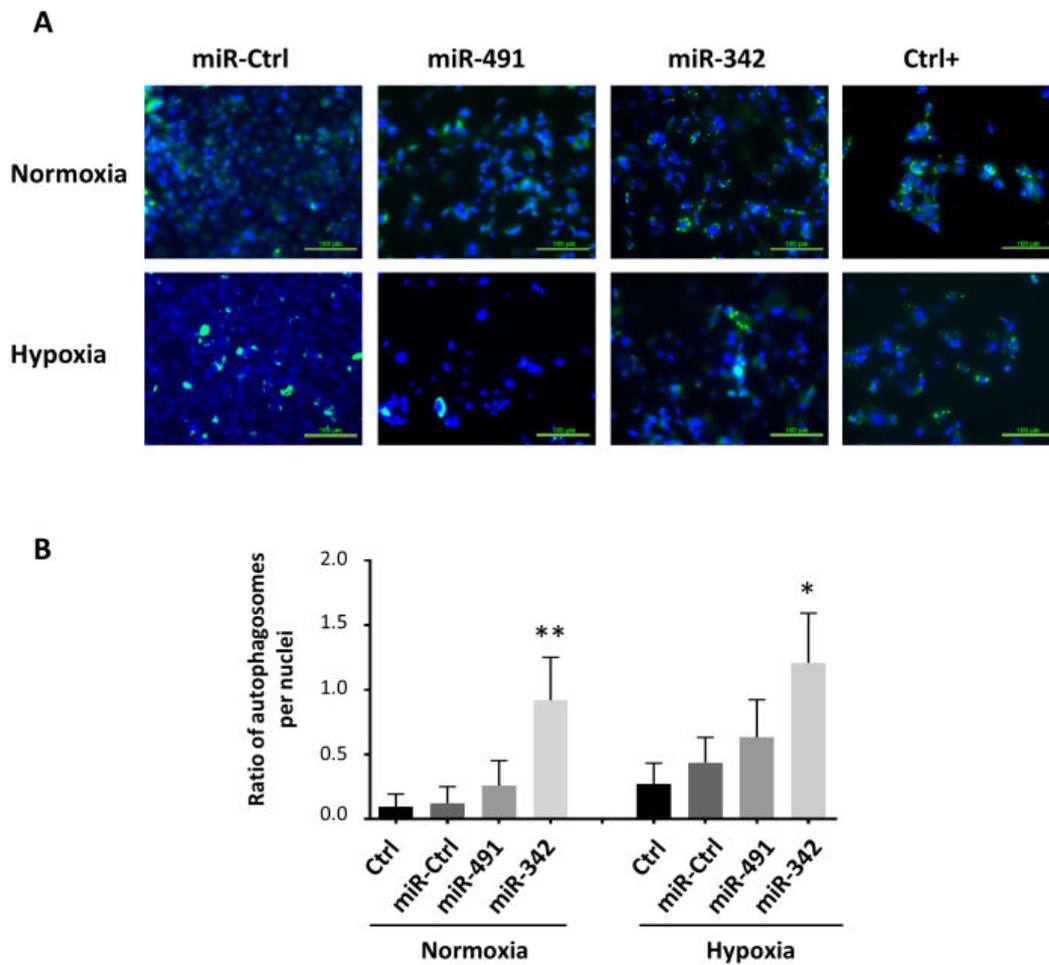
Functional binding sites for miR-491-5p have previously been identified in the 3'UTR of *BCL2L1* mRNA [19–21]. Accordingly, co-transfection of miR-491-5p and WT-BCL2L1-3'UTR, bearing 3 binding sites for miR-491-5p, led to a significant decrease in the luciferase activity of the reporter vector (-34 % relative to miR-Ctrl,  $p < 0.01$ , figure 6D). This repression was specifically abolished with the anti-miR-491-5p. Therefore, as previously reported in other cancer cells, *BCL2L1* mRNA is also a direct target of miR-491-5p in SW1353 chondrosarcoma cell line.

***MiR-342-5p increases autophagy in the SW1353 chondrosarcoma cell line.***

To further investigate the mechanisms of action of miR-342-5p and miR-491-5p, we next looked at their ability to regulate autophagy, which can also contribute to cell death. Specific autophagosome green marker of Cell meter™ Autophagy Fluorescence Imaging Kit and DAPI staining of the nuclei were used to quantify the number of autophagosomes per nuclei. Whatever the oxic conditions, miR-491-5p did not significantly modulate the number of marked autophagosomes (Figure 7). MiR-342-5p significantly increased the number of autophagosomes under normoxia (by 7.4-fold relative to miR-Ctrl-treated cells,  $p < 0.01$ ), and to a lesser extent under hypoxia (by 2.8-fold,  $p < 0.05$ ). Therefore, miR-342 increases the autophagic activity of SW1353 cells, which might participate in its tumour-suppressive activity.

***MiR-491-5p and miR-342-5p modulate the expression of numerous proteins related to proliferation or apoptosis and affect mitogenic signalling pathways in chondrosarcoma cells.***

To gain further insight into the mechanisms underlying the activity of these two miRNAs, we finally looked at the expression of some of their predicted, or validated, targets (Tables S1 and S2); with a special focus on those involved in cell survival/death and/or in signalling pathways commonly altered in cancer.

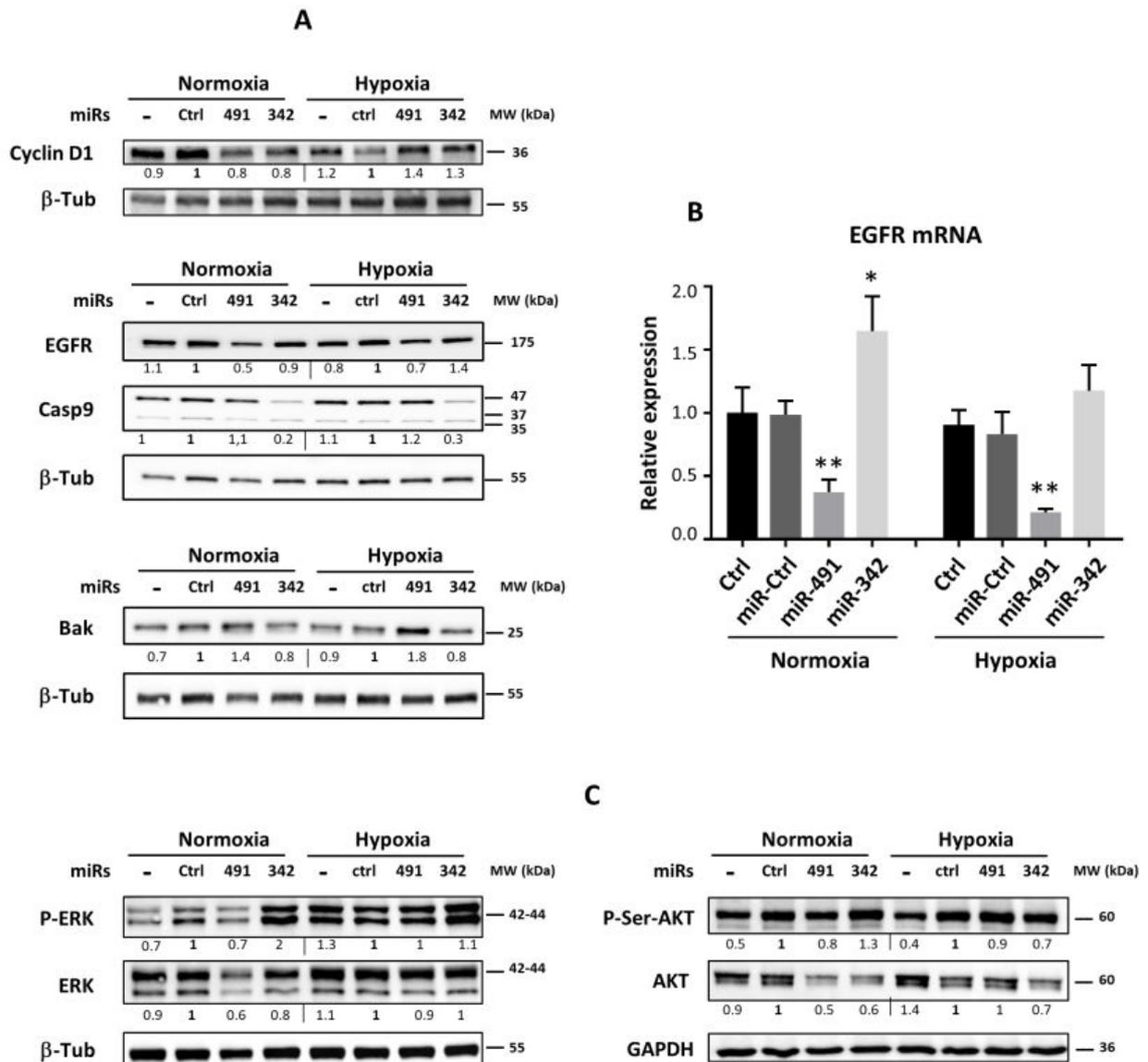


**Figure 7: Effects of miR-491-5p and miR-342-5p on the autophagic activity of SW1353 cells.** SW1353 cells were cultured and transfected as previously described in figure 5, with an additive positive control (5% FCS in PBS for the last 24 h). Analyses were carried-out 72 h post-transfection. The autophagosomes (green) and the nuclei (blue) were labelled as described in the “Materials and Methods” section. (A) The images shown are representative of the experimental results obtained. Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) The graph gives the number of autophagosomes normalized to the number of nuclei (mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments). The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

Although *in silico* analysis showed that *CCND1* mRNA was a validated target of miR-342-5p (Table S2), the transfection of this miRNA did not clearly impacted CCND1 protein expression in chondrosarcoma cell lines. In SW1353 cells, miR-491-5p and miR-342-5p led to a slight decrease in cyclin D1 protein expression under normoxia, whereas they tended to increase its levels under hypoxia (Figure 8A). We did not detect any reproducible alteration in cyclin D1 expression at the *CCND1* mRNA steady-state levels (data not shown). In CH2879 and OUMS-27 cells, there was no significant alteration in cyclin D1 expression independently of the oxic condition (Figure S8A).

We then measured the expression of *EGFR*, a direct target of miR-491-5p in glioblastoma and ovarian cancer cells [19,22] (Table S1), and a predicted target of miR-342-5p (Table S2). In SW1353 cells, at the mRNA level, miR-491-5p repressed the expression of EGFR by 2.5-fold ( $p < 0.01$ ) under both oxic conditions, whereas miR-342-5p increased its expression by 1.6-fold ( $p < 0.05$ ) only under normoxia (Figure 8B). At the protein level, miR-491-5p decreased EGFR expression from 1.4- to 2-fold depending on the oxic condition (Figure 8A). This effect on EGFR protein was more marked in OUMS-27 and CH2879 chondrosarcoma cell lines than in SW1353 (Figure S8B). MiR-342-5p did not have any significant effect on EGFR protein expression in any of the three chondrosarcoma cell lines.

Caspase-9 was also identified as a direct target of miR-342-5p ([23], Table S2). MiR-342-5p did not significantly modulate caspase-9 mRNA level in SW1353 cells (data not shown). However, in the three chondrosarcoma cell lines, it caused a strong decrease (at least 3-fold) in pro-caspase-9 protein expression (47 kDa), this without induction of the large cleaved caspase-9 fragments (37 and 35 kDa) (Figures 8A and S8B). MiR-491-5p had no effect on pro-caspase-9 protein expression and it did not increase the cleavage of caspase-9.

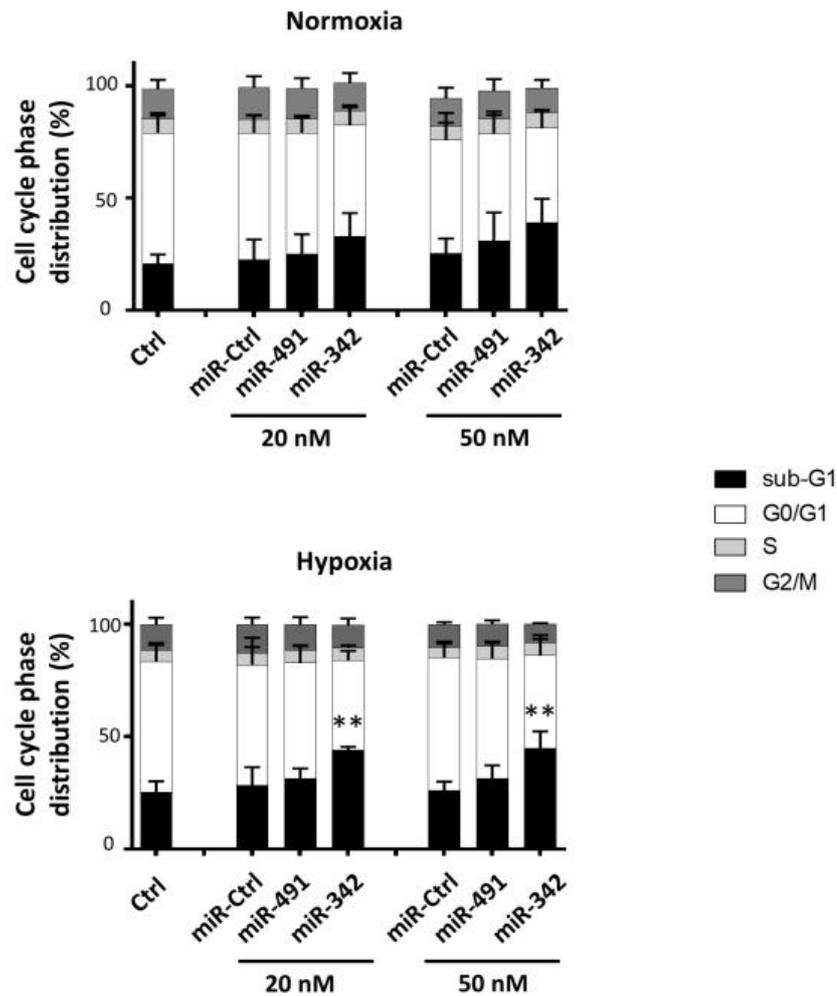


**Figure 8: Analysis of some survival/death proteins and mitogenic signaling pathways affected by miR-491-5p and miR-342-5p.** SW1353 cells were cultured and transfected as described in figure 5. Analyses were carried-out 72 h post-transfection. (A, C) Protein extracts were analyzed by western blotting to evaluate the levels of Bak, Cyclin D1, EGFR, Caspase-9, P-Thr202/Tyr204-ERK, ERK, P-Ser473-AKT, and AKT versus b-tubulin (b-Tub) or GAPDH. Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to b-tubulin or GAPDH, and to the corresponding miR-Ctrl for each oxic condition. (B) Total RNA was extracted as described in the "Materials and Methods" section. Relative expression of *EGFR* was determined by RT-quantitative PCR and normalized to both *PPIA1* and *GAPDH* levels and to Ctrl. Data are expressed as mean of triplicate samples  $\pm$  SD. The results are representative of three independent experiments. The significance of the results was evaluated by two-tailed Student's t-test compared to the corresponding miR-Ctrl (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

The pro-apoptotic proteins Bax and Bak are essential for mitochondrial outer membrane permeabilization and induction of cell death. None of the considered miRNA impacted Bax protein expression (data not shown). Bak protein was upregulated when exposing the three chondrosarcoma cell lines to miR-491-5p, especially under hypoxia, whereas miR-342-5p tended to decrease Bak expression (from 1.3-fold to 3-fold increase with miR-491-5p and approximately 1.2-fold decrease with miR-342-5p, figures 8A and S8C). Finally, we analyzed the effects of these miRNAs on two essential mitogenic signalling pathways involved in cell survival (MAPK/ERK and AKT/PKB). On the ERK pathway, the effects of these miRNAs were quite variable from one cell line to another, and were dependant on the oxic condition. In SW1353 cells, miR-491-5p decreased activated and total ERK proteins under normoxia (by approximately 1.5-fold, figure 8C). miR-491-5p had no marked effect on ERK pathway in OUMS-27 cells (Figure S8D). It diminished phosphorylated or total ERK proteins levels under normoxia and hypoxia in CH2879 cells (maximum decrease of 1.6-fold for phosphorylated ERK under normoxia; Figure S8D). These results suggest that miR-491-5p could decrease the expression of ERK proteins and their activated/phosphorylated forms in chondrosarcoma cells.

In SW1353 cells, miR-342-5p did not alter total ERK proteins expression (Figure 8C). However, it increased the levels of phosphorylated ERKs under normoxia. In OUMS-27 and CH2879 cells, miR-342-5p did not seem to significantly influence total or phosphorylated ERK proteins levels (Figure S8D). Therefore, miR-342-5p does not significantly influence ERK signalling pathway in chondrosarcoma cells.

The effects of miRNAs on AKT signalling pathway were also heterogeneous between the chondrosarcoma cell lines. In SW1353 cells, miR-491-5p decreased total AKT protein only under normoxia (by 2-fold, relative to miR-Ctrl-treated cells; Figure 8C), without clearly inhibiting AKT activation. miR-342-5p downregulated the expression of total AKT protein under both normoxia and hypoxia (by approximately 1.5-fold), with subsequent inhibition of AKT phosphorylation only under hypoxia (by 1.4-fold). In OUMS-27 cells, there was no significant variation in phosphorylated or total AKT proteins levels, with both miRNAs and under both oxic conditions (Figure S8E). In CH2879 cells, whereas both miR-342-5p and miR-491-5p decreased total AKT protein expression (from 1.5- to 5-fold), they also increased the level of phosphorylated AKT under normoxia and hypoxia (Figure S8E). Consequently, these results suggest that the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on AKT signalling are dependent on the chondrosarcoma cell line. They could decrease AKT expression and at the same time participate to its activation.



**Figure 9: Effects of miR-491-5p and miR-342-5p on SW1353 cells cultured in 3D.** SW1353 cells were cultured in collagen sponge scaffolds under normoxia or hypoxia. They were transfected 24 h after seeding with 20 nM or 50 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p. Analyses were carried-out 72 h post-transfection. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. The histograms represent the analysis of the different phases of the cell cycle of 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD). Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*\*:  $p < 0.01$ ).

### ***Only miR-342-5p induces cell death in a 3D organoid chondrosarcoma model.***

Finally, we tested the anti-tumour activity of miR-342-5p and miR-491-5p on SW1353 cells cultured in 3D, a model that mimics more accurately the *in vivo* physiopathological microenvironment. SW1353 cells were transfected with either 20 or 50 nM of miRNAs mimics. Cells were cultured under normoxia and hypoxia with the same kinetics as described before (Figure 9).

Compared to miR-Ctrl, miR-491-5p had no effect on the cell cycle and did not modulate the percentage of sub-G1 events, independently of the oxic condition or its concentration. By contrast, miR-342-5p increased the number of sub-G1 peaks, with the same efficiency at 20 and 50 nM (approximately 1.5-fold relative to the respective miR-Ctrl, only significant under hypoxia with  $p < 0.01$ ). In conclusion, miR-342-5p, but not miR-491-5p, induced cell death in our organoid chondrosarcoma culture model, especially in hypoxia.

## **Discussion**

The resistance of chondrosarcomas to conventional radiotherapy and chemotherapy calls for the development of new treatments. The use of therapeutic miRNAs offers the advantage of a multi-target approach and can help to discover new therapeutic targets for clinical applications [9,11]. In previous works, the function of about twenty miRNAs were reported in chondrosarcoma [9,24]. Using a high-throughput screening of a human library of 1200 miRNAs, we found numerous miRNA with the ability to diminish cell proliferation in SW1353 chondrosarcoma cell line. Among these, we identified 5 miRNAs with a predicted pro-apoptotic activity by potentially targeting anti-apoptotic molecules such as Bcl-xL and Bcl-2, thought to play a critical role in the chemoresistance of chondrosarcoma chondrocytes [15,16,25]. Moreover, 2 miRNAs (miR-342-5p and miR-541-5p) seemed also exert chemosensitizing effects when combined with CDDP. Real-time cell analysis and endpoint morphological analysis were performed in glass culture plates under normoxia, whereas chondrosarcoma cells live in a hypoxic environment. Therefore, we realized individual functional analyses in classical plastic culture plates to validate our approach and to unambiguously identify miRNAs with real cytotoxic and chemosensitizing effects. Considering the role of hypoxia in the resistance of tumour cells to conventional treatments [4,26], we performed functional analyses under both normoxia (21% O<sub>2</sub>) and hypoxia (3% O<sub>2</sub>). We validated the tumour-suppressive effects of miR-491-5p and miR-342-5p on three

chondrosarcoma cell lines cultured as monolayers. Their effects were already described in other cancers, but to date, our work is the first to identify miRNAs acting as tumour suppressors in a hypoxic microenvironment. Moreover, since the traditional 2D cell culture does not reflect the *in situ* physiopathologic microenvironment, we used for the first time a 3D organoid culture model to further confirm the effects of miRNAs on SW1353 cells.

We used four cell lines derived from central conventional chondrosarcomas of grade II (SW1353) and of grade III (OUMS-27, CH2879 and L835). They are all resistant to cisplatin: CH2879 and OUMS-27 are the least resistant (IC<sub>50</sub> to achieve 50% reduction in cell viability of 40  $\mu$ M and 50  $\mu$ M respectively), L835 has an IC<sub>50</sub> of at least 200  $\mu$ M, and SW1353 is the most resistant with an IC<sub>50</sub> of at least 400  $\mu$ M [15]. Mutation analysis performed on TP53 and on Isocitrate Dehydrogenase (IDH) 1 or 2 revealed distinct characteristics: SW1353 harbours both IDH2 and TP53 mutations, OUMS-27 harbours a TP53 mutation, CH2879 is wild type for IDH and TP53 mutations, and L835 harbours an IDH1 mutation [27,28]. Only L835 cell line did not respond to miR-491-5p and miR-342-5p, and harbours an IDH1 mutation. Gain-of-function mutations of IDH1/2 are found in 38-70% of primary central chondrosarcomas and are only leading to DNA hypermethylation. Moreover, direct inhibition of the IDH1 mutant enzyme does not change the tumorigenic properties of chondrosarcoma cell lines *in vitro* [29]. The four cell lines express Bcl-2 and Bcl-xL proteins at different levels [15,25]. These 2 latter studies showed that L835 cells express more Bcl-xL protein than Bcl-2 protein. Moreover, inhibition of Bcl-xL and Bcl-2 with ABT-737 reduces the cell viability and induces apoptosis of L835 cells after 72 h incubation [15]. Inhibition of Bcl-xL by both miR-491-5p and miR-342-5p should therefore have resulted in cell death by apoptosis. Complementary experiments would be necessary to verify this inhibition.

Unlike miR-541-3p [30,31], miR-541-5p has never been studied in cancers. MiR-625-5p and miR-149-5p have been previously reported to have tumour suppressive roles in various cancers, alone or combined with different chemotherapeutic agents [32–36]. Even if miR-149-5p seems to play a dual role in cancer [37], both miR-625-5p and miR-149-5p can induce apoptosis. Although our screening showed that these three miRNAs could have antiproliferative effects, we did not confirm any significant antimetabolic, cytotoxic or killer effects on the SW1353 chondrosarcoma cell line. We also did not validate the chemosensitizing effect of miR-541-5p 72 h post-transfection. As cells growing on glass are more sensitive than cells growing on plastic, it is possible that killer effects require a longer incubation period in classic cell culture conditions, possibly over 96 h post-transfection.

MiR-491-5p was already described as a tumour suppressor in various cancers and several of its direct targets have been identified and include: Bcl-xL in colorectal cancer [21], Bcl-xL and EGFR in ovarian cancer [19], Bcl-xL and TP53 in pancreatic cancer [20], Bcl-xL, EGFR and CDK6 in glioblastoma [22], PKM2 [38] and FOXP 4 in osteosarcoma [39], the most common type of bone cancers. In our study, miR-491-5p was first used as a positive control of cytotoxicity in the high-throughput screening. Given its high therapeutic potential, we next wanted to confirm its tumour suppressive effect on chondrosarcoma cell line, in which it has never been studied. We found it was able to induce cell death in SW1353, OUMS-27 and CH2879 chondrosarcoma cell lines cultured in monolayer under normoxia and hypoxia.

EGFR is constitutively activated in high grade chondrosarcoma tumours [40]. Regardless of the oxygen level, miR-491-5p inhibited EGFR at both protein and mRNA levels. This suggests a possible downstream inhibition of AKT and MAPK signalling pathways, leading to a decrease in chondrosarcoma cell proliferation and migration as shown by others upon inhibition or silencing of EGFR in chondrosarcoma [40]. In previous works, the downstream inhibition of MAPK and AKT activity by miR-491-5p was dependent on the type of cancer or the cell line. In the SW1990 pancreatic cell line, miR-491-5p inhibited PI3K/AKT, but not RAS/MAPK [20]. This miRNA also inhibited AKT and MAPK signalling pathways in IGROV1-R10 ovarian cancer cells whereas SKOV3, another ovarian cell line, maintained its AKT and MAPK activity [19]. In the present study, its effect on AKT and MAPK signalling pathways was heterogeneous between the chondrosarcoma cell lines and was also dependent on the oxidic conditions.

MiR-491-5p did not influence the expression of the Bcl-2 anti-apoptotic protein in the 3 investigated chondrosarcoma cell lines sensitive to miR-491-5p. Although the anti-apoptotic Mcl-1 could be a potential target of miR-491-5p, it did not influence its protein expression in SW1353 and OUMS-27 cell lines, and rather tended to increase its expression in CH2879 cells, as observed in IGROV1-R10 ovarian cell line [19]. Like others, we found that miR-491-5p directly targets *BCL2L1* mRNA [19,20,22]. Consequently, miR-491-5p decreased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the 3 chondrosarcoma cell lines responding to miR-491-5p under both oxidic conditions. It also increased the expression of the Bak pro-apoptotic protein. Both these two events might therefore contribute to its apoptotic activity in chondrosarcoma cells.

MiR-342-5p mechanism of action has been less investigated than that of miR-342-3p and, to our knowledge, never in chondrosarcoma. It has been identified as a tumour suppressor

in neuroblastoma [30]. It inhibited colon cancer tumorigenesis through direct targeting of the N-a-acetyl transferase 10 protein (NAA10) and also promoted apoptosis [41]. In osteosarcoma, miR-342-5p was also found to inhibit cell growth, migration and invasion, and restored sensitivity to doxorubicin through direct targeting of Wnt member 7B (Wnt7b) [42]. In the present study, high-throughput screening revealed that miR-342-5p has some antiproliferative effects on SW1353 cells. However, miR-342-5p did not significantly affect AKT and ERK mitogenic signalling pathways as previously reported for breast cancer cells [43], or *AKT* mRNA in inflammatory macrophages [44]. We observed AKT inhibition at the protein level in 2 out of the 3 cell lines (SW1353, CH2879), but at the same time the phosphorylation of AKT increased in CH2879 cells. There is evidence in the literature that miR-342-5p increases the level of phosphorylated forms of AKT *via* targeting a phosphatase on cardiomyocytes [23]. Others have shown that miR-342-5p attenuated the protein level of total AKT, whereas its phosphorylated protein level was stable in neural stem cells [45]. In view of our results, we cannot assume that the antiproliferative effects of miR-342-5p are linked to AKT and ERK pathways, but rather linked to its pro-apoptotic effects. Indeed, miR-342-5p induced cell death and apoptosis in SW1353, OUMS-27 and CH2879 cells, independently of the oxygen level. In the 3 chondrosarcoma cell lines, miR-342-5p inhibited the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, but not that of Mcl-1, with a more sustained effect under hypoxia. We also reported for the first time that miR-342-5p downregulates Bcl-2 protein expression through direct binding to sequence 818-824 of BCL2-3'UTR. Like Soriano *et al.* [30], we found that miR-342-5p directly targets *BCL2L1* gene and in addition, we identified its binding site at position 679-686 of BCL2L1-3'UTR. The authors also identified *CCND1* gene as a direct target of miR-342-5p in neuroblastoma, but in our experiments on 3 chondrosarcoma cell lines, cyclin D1 protein expression was not affected by miR-342-5p.

Surprisingly, in the three chondrosarcoma cell lines, this miRNA had also anti-apoptotic effects, since it tended to decrease (by 1.2-fold) the protein expression of the Bak pro-apoptotic protein, and that of the pro-caspase-9 (at least 3-fold). Our data are in line with the study of Hou *et al.* who identified exosomal miR-342-5p as a key cardioprotective molecule inhibiting apoptotic signaling *via* direct targeting of caspase-9 and JNK2 in cardiomyocytes [23]. Caspase-9 activation is stimulated by dimerization instead of cleavage within the apoptosome. Dimerization facilitates autocatalytic cleavage which results in the stabilization of the dimer [46]. Caspase-9 showed complete activity in its uncleaved form [47]. This caspase initiates apoptosis by cleaving and thereby activating executioner caspases-3, -6 and -7. In our study,

cleaved caspase-9 was not clearly observed in all chondrosarcoma cell lines, even with miR-491-5p whose activation of the intrinsic apoptosis pathway has already been demonstrated [19,20]. Despite anti-apoptotic potential, miR-342-5p clearly induced apoptosis as demonstrated by the induction of cleaved PARP and caspase-3/7 activity.

Autophagy is a lysosomal degradation pathway that protects cells from deleterious cytoplasmic components. Autophagy can also be associated with cell death [48,49]. Here we found that miR-342-5p induced autophagy in SW1353 cells. The effect was less significant in hypoxia, probably because autophagy was already activated in a hypoxic environment. We also reported the inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL by miR-342-5p, which could contribute to the activation of autophagy. Indeed, Bcl-2 family proteins can inhibit autophagy by targeting and inhibiting Atg6/Beclin 1, which has an essential role in the formation of autophagosomes [50–52] Inhibition of Bcl-xL by miR-491-5p did not, however, appear to be enough to induce autophagy. We cannot rule out the possibility that miR-342-5p can directly target autophagy-related components but we identified, for the first time, miR-342-5p as an autophagy-regulating miRNA.

In a previous study in SW1353, OUMS-27, CH2879 and L835 cells, inhibition of Bcl-xL and Bcl-2 with ABT-737 restored the chemosensitivity to doxorubicin and cisplatin (5  $\mu$ M), with the more marked inhibition in cell viability after 72 h [15]. This team also used 10  $\mu$ M CDDP in combination with WEHI-539, a selective inhibitor of Bcl-xL, to induce apoptosis of chondrosarcoma cells after 72 h treatment [25]. By contrast, in our study, miR-491-5p, which inhibits Bcl-xL, and miR-342-5p, which down-regulates both Bcl-2 and Bcl-xL, did not chemosensitize chondrosarcoma cells to CDDP. We used sublethal doses of CDDP to induce a cell cycle stalling at the S and/or G2/M phases: 0.33  $\mu$ M (0.66 % of IC<sub>50</sub>) for OUMS-27, 1.65  $\mu$ M (0.82 % of IC<sub>50</sub>) for L835, 1.65  $\mu$ M (4.12 % of IC<sub>50</sub>) for CH2879, and 3.3  $\mu$ M (0.82% of IC<sub>50</sub>) for SW1353 [15]. We performed functional analysis 24 h after CDDP treatment. Therefore, the chosen kinetics and these sublethal doses of CDDP may not be adequate to unveil chemosensitive effects of these miRNAs Other experiments would be required to explore this hypothesis.

We showed that miR-491-5p and miR-342-5p do not impact primary healthy HAC cell cycle, nor do they cause any cell death, supporting their biosafety on non-cancerous chondrocytes. Finally, we investigated their effects on a 3D organoid chondrosarcoma model that mimics the *in vivo* microenvironment, rather than using a classical xenograft model. We previously used collagen sponges scaffolds to successfully redifferentiate dedifferentiated

HAC, or to differentiate mesenchymal stem cells into chondrocytes, with the combination of growth factors/siRNAs/hypoxia [53–55]. These collagen sponges scaffold were also used to study the impact of irradiations in a 3D chondrosarcoma model [56]. Compared with the conventional subcutaneous xenograft implantation in *nude* mice, our 3D culture model allows to control oxygen tension during experimentations. The effects of the miRNAs were thus studied under hypoxia in order to closely mimic the *in situ* microenvironment of chondrosarcomas. In this model, we found that miR-491-5p was not able to induce cell death, whereas miR-342-5p provoked cell death in normoxia and hypoxia, with only a higher level of significance in the more biologically relevant hypoxia. This miRNA would therefore be the most effective if considering miRNAs as a therapeutic avenue for the treatment of chondrosarcomas.

### **Conclusions**

Our study unambiguously demonstrated the antiproliferative, antimetabolic and cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on the SW1353 chondrosarcoma cell line. However, both miRNAs were unable to induce chemosensitivity to cisplatin in our experimental conditions, but tumour suppressive effects of these miRNAs were validated in 3 out of 4 chondrosarcoma cell lines cultured under normoxia and hypoxia. MiR-491-5p inhibited the expression of EGFR whose constitutive activation is associated with cell proliferation, survival and migration. Both miRNAs induced apoptosis and miR-342-5p also promoted autophagy. We identified Bcl-xL and Bcl-2 as direct targets of miR-342-5p, and Bcl-xL as a direct target of miR-491-5p in chondrosarcoma chondrocytes. This study therefore provides additional evidence of the therapeutic potential to specifically target the Bcl-2 family members in chondrosarcomas. Only miR-342-5p appeared to be effective in a more relevant 3D culture model in hypoxia. The loss of efficiency of miR-491-5p in the organoid culture system demonstrates the importance of considering the tumour microenvironment in order to develop new efficient therapeutic tools.

## Methods

### Cell culture

The chondrosarcoma cell line SW1353 (ATCC® HTB-94) was grown and treated in high glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM, Biowest) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Eurobio), 3 µg/ml ciprofloxacin (Sigma Aldrich) and 0.5 µg/ml amphotericin (Eurobio). The chondrosarcoma cell lines OUMS-27, L835 and CH2879, were kindly provided by Y. Saintigny (LARIA, Caen, France) and they initially originate from J.V.M.G Bovée's team (Department of Pathology, Leiden, the Netherlands). They were grown and treated in RPMI 1640 medium (Eurobio) with 10% FCS and a mixture of penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/ml) (Eurobio).

HAC (Human articular chondrocytes), obtained with appropriate ethical approval, were prepared from macroscopically healthy zones of femoral heads obtained from patients undergoing joint arthroplasty as previously described [57]. The study was performed in full accordance with local ethics committee guidelines and all the cartilage samples were collected after written and informed consent of the donors according to the legislation. All the experimental protocols were approved by the French ministry of higher education and research (ethics committee for research with human samples CODECOH: DC 2014–2325). Chondrocytes were seeded at  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in plastic dishes, with a medium consisting of HG-DMEM supplemented with 10% FCS and a mixture of 100 IU/mL of penicillin, 100 mg/mL of erythromycin, and 0.25 mg/mL of fungizone (Eurobio).

All cells were certified mycoplasma-free with PCR analysis. They were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Treatments were performed under normoxia (21% O<sub>2</sub>) and hypoxia (3 % O<sub>2</sub>). Hypoxic cultures, including any handling, were exclusively performed in a sealed chamber, with a controlled rate of oxygenation [57].

For 3D experiments, SW1353 cells were grown in collagen scaffolds manufactured by Symatèse Biomatériaux (Chaponost, France), as described previously by our team for the redifferentiation of HAC [53] or to study the impact of radiations in a 3D chondrosarcoma model [56] with some modifications. The collagen sponge scaffolds were composed of native type I collagen (90-95 %) and type III collagen (5-10 %) from calf skin. These sponges, 2 mm thick and 5 mm in diameter, were cross-linked with glutaraldehyde to increase their stability and sterilized with  $\gamma$ -radiations. Briefly, SW1353 cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cells/sponge in 96-well culture plates and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in HG-DMEM supplemented with

10% FCS and antibiotics. After 1 h, each cell construct was transferred to 24-well plates and incubated in the same medium pre-equilibrated or not to 3% O<sub>2</sub> by bubbling. Cells were then cultured under normoxia or hypoxia.

### **Drug and miRNAs**

Cisplatin (CDDP) was purchased from Mylan (Merk, France). Sublethal doses of CDDP were used during the transfection of miRNA as follows: 1 µg/ml (3.3 µM) for SW1353, 0.5 µg/ml (1.65 µM) for L835 and CH2879 cells, and 0.1 µg/ml (3.3 µM) for OUMS-27 cells. All miRNA mimics were purchased from Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). MiRNA-Control (miR-Ctrl, MIMAT0000039), was based on *C. elegans* miRNA sequence that has been confirmed to have minimal sequence identify with human miRNAs. Human miRNA hsa-miR-491-5p (MIMAT0002807, noted miR-491), hsa-miR-342-5p (miR-342, MIMAT0004694), hsa-miR-541-5p (miR-541, MIMAT0004919), hsa-miR-625-5p (miR-625, MIMAT0003294), hsa-miR-149-5p (miR-149, MIMAT0000450) were also used in this study. MiRNA hairpin inhibitors were purchased from Dharmacon: hsa-miRNA-491-5p-hairpin inhibitor (anti-miR-491, IH-300751-06), hsa-miRNA-342-5p-hairpin inhibitor (anti-miR-342, IH-301083-02) and miRNA hairpin inhibitor Negative Control (anti-miR-ctrl, IN-001005-01).

### **Real-time cell analysis (xCELLigence)**

MiRNA- and cisplatin-mediated cytotoxicity were initially monitored by high throughput screening using Real-Time Cell Analyser (RTCA) multi-plate instrument (xCELLigence System; ACEA, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) under normoxia. This system monitors cellular events in real-time by measuring electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated into the bottom surfaces of 96-well E-plates VIEW (Ozyme). RTCA 2.1.0 software calculates the cell index (CI) based on the impedance. CI correlates with the area of cells attached to the bottom of the plate as described elsewhere [58]. Briefly, 3.5x10<sup>3</sup> SW1353 cells/well were plated in 96-well E-plates VIEW. They were left to grow for 24 h before transfection with 20 nM miRNAs using Interferin™ (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). In each plate, miR-Ctrl was used as a negative control of cytotoxicity. The cells were treated or not with CDDP 24 h post-transfection. Impedance was continuously measured until the end of the treatment (i.e. 96 h post-transfection and 120 h after seeding). MiRNA effect was established according to three criteria: the shape of the curve, the

area under the curve (AUC) and the CI at the end of the experiment. Standard deviations of triplicates were analyzed with the RTCA software. Endpoint morphological analysis of cells was also done in a high throughput cell imaging system (Cellavista; Roche) at the end of the experiment.

### **Transfection of miRNA and CDDP treatment**

For individual characterization and validation studies, exponentially growing cells were seeded at  $7.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (for OUMS-27),  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (for SW1353 cells) and  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (for L835 and CH2879 cells). Cell lines were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miRNA mimics using INTERFERin<sup>TM</sup> (Polyplus-Transfection) according to the manufacturer's instructions. An additional CDDP treatment was realized 48 h post-transfection with sublethal doses of CDDP.

For 3D experiments, SW1353 cells were transfected with 20 or 50 nM miRNA the day after seeding in collagen sponge. HAC were transfected with 20 nM miRNA at passage 0 and at 80% confluency. In all cases, cells and media were harvested at the end of the experiment (72 h post-transfection) for further analysis.

### **Metabolic activity analysis**

SW1353 cells were seeded onto 96-well microplates at a density of  $3.5 \times 10^3$  cells/well in triplicates. Transfection of 20 nM miRNA was performed 24 h later with or without an additional CDDP treatment 48 h post-transfection, as described above. Cellular metabolic activity was estimated 72 h post-transfection using the XTT assay (Roche). This assay is based on the cleavage of the tetrazolium salt XTT to a soluble formazan salt only in viable cells. Therefore, the amount of formazan dye formed directly correlates to the number of metabolically active cells in the culture. The medium was removed and the cells were incubated with XTT working solution (per well: 100  $\mu$ l of culture medium, 50  $\mu$ l of XTT and 1  $\mu$ l of electron coupling reagent). Optical density (OD) was measured at 450 nm and 600 nm with an absorbance microplate reader (Spark 10M, Tecan) after 1 h incubation.

### **Cytotoxicity assay**

In parallel with the metabolic activity analysis, a bioluminescence cytotoxicity assay kit (Interchim) was used to evaluate miRNA-induced cytotoxicity 72 h post-transfection. This kit is based on the measurement of adenylate kinase (AK) rapidly released into the culture medium upon damage to the plasma membrane. AK detection was realized in the supernatant in a simple one-step procedure involving two chemical reactions. The first reaction converts ADP to ATP by AK. The second reaction uses luciferase to catalyze the formation of the light from ATP and luciferin. The emitted light was then measured with a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan) and expressed as relative luciferase units (RLU), reflecting the number of dead cells.

### **Cell cycle analysis**

Adherent cells were harvested by trypsinization. The supernatant, containing the detached cells, and the trypsinized cells were pooled, centrifuged (1400 rpm, 10 min), rinsed with PBS, fixed in 70% ethanol, and stored at -20°C until analysis. Fixed cells were then centrifuged (3000 rpm, 10 min) and rinsed with PBS to remove all traces of ethanol. After centrifugation (2000 rpm, 5 min), the cells were resuspended and incubated for 30 min in a PBS solution containing 20 µg/ml propidium iodide (Sigma Aldrich) and 100 µg/ml RNase (Fisher Scientific). Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry using the Cytoflex S Flow Cytometer (Beckman Coulter). Data were computed with the Cytexpert® acquisition software (Beckman Coulter).

### **Analysis of nuclear morphology**

Both detached and adherent cells were pooled and applied to a poly-L-lysine-coated glass slide by cyto-centrifugation at 850 rpm for 5 min (Cytospin, Thermo Scientific). They were fixed with a solution of ethanol/chloroform/acetic acid (6: 3: 1) before DNA staining. Slides were then treated with the UltraCruz™ Mounting Medium with DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The observations were made on a fluorescence microscope (Nikon eclipse Ti).

## **Western-blotting**

Both detached and adherent cells were centrifuged at 1400 rpm for 5 min, washed with PBS and stored at -20°C until analysis. Total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer as previously described [59]. Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (BioRad). Then, 15 µg of total proteins were separated in 10% or 12% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, BioRad) using the Trans Blot®Turbo™ Transfer system (BioRad). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween (TBST) for 1 h. Then, protein level were analyzed by immunoblotting with antibodies from Cell Signaling Technology (Ozyme), according to the manufacturer's instructions : EGFR (4267), PARP (9542), Caspase-9 (9502), Bcl-xL (2764), Cyclin D1 (2878), Bak (3814), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204 of Erk1/2, 4370), p44/42 MAPK (Erk1/2, 9102), phospho-AKT (Ser473, 4060), AKT (9272). We also used Mcl-1 (S-19), GAPDH (FL-335) and β-Tubulin (D-10) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, and the Bcl-2 (M0887) antibody from DAKO. After the incubation, membranes were washed in TBST, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Signals were visualized with a chemiluminescence imaging system (ChemiDoc™ Touch imaging system, BioRad). Each immunoblot is representative of at least three distinct experiments. Protein expression was estimated by quantifying the density of immunoblots bands adjusted to β-Tubulin or GAPDH (ImageLab® software).

## **Real-time detection of caspase-3/7 mediated apoptosis**

Caspase-3/7 activity was assessed using the Incucyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (Essen BioScience). This reagent couples the activated caspase-3/7 recognition motif (DEVD) to NucView™488, a DNA intercalating dye. Thus, caspase-3/7 activity correlates with an increase of the green fluorescence in the nuclei. Briefly,  $3.5 \times 10^3$  SW1353 cells/well were grown in 96-well plates and monitored in the Incucyte® S3 acquiring images (objective x 10) every 3 hours in 2 separate regions per well after transfection of 20 nM miRNA. Each experiment was done in triplicate and analyzed with the Incucyte® software.

### **RNA isolation and PCR assay**

Total RNA (including miRNA) was isolated from transfected cells using the NucleoSpin® miRNA kit (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were assessed using the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Reverse transcription was performed to generate cDNA from 1 µg total RNA with the miScript II RT kit (Qiagen). PCR was performed on a CFX96 Touch real Time PCR (Biorad). Data were analyzed using CFX manager software. For detection of miRNAs, we used QuantiTect™ SYBR Green PCR master mix (Qiagen) with an universal miScript primer and specific miScript primers provided by Qiagen: Hs\_miR-491-5p\_1 (miR-491-5p), Hs\_miR-342-5p\_1 (miR-342-5p), Hs\_miR-541\*\_1 (miR-541-5p), Hs\_miR-625\_3 (miR-625-5p), Hs\_miR-149\_1 (miR-149-5p), Hs\_RNU6-2\_11 (U6 small nuclear 6 or RNU-6B) and Hs\_miR-15a\_1 (miR-15a). The cycling conditions were 15 min polymerase activation at 95°C, followed by 40 cycles at 94°C for 15 s, 55°C for 30 s and 70°C for 30 s. In addition, melting curves were performed to ensure specificity of PCR products. Expression values of miRNAs were normalized to both RNU-6B and miR-15a with CFX manager software. They were expressed as mean of triplicate samples ± SD.

For RNA transcripts quantification, we used GoTaq®qPCR Master Mix (Promega). The following primers were purchased from Eurogentec: EGFR F-5'-TGGCATCTTTAAGGGCTCCA-3', EGFR R-5'-TGGCTAGTCGGTGTAAACGT-3', PPIA1 F-5'-CGGATTTGATCATTGGTG-3', PPIA1 R-5'-CAGGGAATACGTAACCAG-3', GAPDH F-5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3', GAPDH R-5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGGG-3'. GAPDH and PPIA1 were both used as endogenous reference genes to normalize EGFR expression, expressed as mean of triplicate samples ± SD.

### **Luciferase miRNA target reporter assay**

Targetscan 7.2 (<http://www.targetscan.org>) was used for miRNA target prediction. Wild type (WT) and mutant (MUT) vectors of BCL2L1-3'UTR and BCL2-3'UTR were purchased from GeneCopoeia (USA). The full length BCL2L1-3'UTR (217HmiT108616-MT05; 1489 bp) and of the proximal part of BCL2-3'UTR (217HmiT016211a; 2761 bp) were inserted downstream of a Gaussia luciferase (GLUC) reporter gene in the pEZMX-MT05 vector. This vector also carries the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene for normalization of GLUC luciferase activity, as a function of transfection efficiency. SW1353 cells were seeded

at  $8 \times 10^4$  cells/well (triplicates) in a 24-well plate the day before transfection. The cells were co-transfected with 20 nM miRNA mimic or miRNA hairpin inhibitor and with BCL2-3'UTR vector (0.25 ng/ $\mu$ L) using jetOPTIMUS™ DNA transfection reagent (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). BCL2L1-3'UTR vector (1 ng/ $\mu$ l) and miRNA were co-transfected with EndoFectin transfection reagent (Genecopoeia, USA). Culture medium was collected 24 h later to measure luciferase activities with the secrete-pair dual luminescence assay kit (Genecopoeia) and a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan). Luciferase activities were expressed as relative luciferase units (RLU) corresponding to GLUC/SEAP ratio.

### **Autophagy assay**

Cell meter™ Autophagy Fluorescence Imaging Kit (AAT Bioquest®) was used to analyse the autophagic activity of the cells. The kit uses Autophagy Green™ reagent as a specific autophagosome marker. SW1353 cells were seeded onto 96-well microplates at a density of  $3.5 \times 10^3$  cells/well in triplicates. They were transfected 24 h later with 20 nM miRNA as described above, and incubated for 72 h. As positive controls, cells were incubated for the last 24 h in PBS with 5 % FCS. 72 h post-transfection, the medium was replaced by the Autophagy Green™ working solution. The cells were incubated in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator for 1 h. After washing with PBS, the nuclei were counterstained with DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The cells were then observed under a fluorescence microscope (Nikon eclipse Ti). Autophagosomes and nuclei were counted with the ImageJ software.

### **Statistical analysis**

All experiments were repeated at least three times. Values are reported as means  $\pm$  SD. Statistical significances of the mean of at least three independent experiments were assessed by one-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Dunnett's test, or two-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Sidak's test. Alternatively, two-tailed unpaired student's t test with Welch's correction was used to analyse statistical differences within representative experiments performed in triplicate. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 7 software. P-values of less than 0.05 were considered significant: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , and \* $p < 0.05$ .

## **List of abbreviations**

AK: Adenylate kinase; AKT: protein kinase B; AUC: Area under the curve; Bak: Bcl-2 homologous antagonist-killer; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell Lymphoma-2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; CDDP: Cisplatin; EGFR: Epidermal growth factor receptor; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; IDH: Isocitrate dehydrogenase; MiRNA: microRNA; CI: Cell index; FCS: Fetal calf serum; HAC: Human articular chondrocyte; Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1; OD: Optical density; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; RLU: Relative luciferase unit; RTCA: Real-time cell analyzer; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

The study was performed in full accordance with local ethics committee guidelines and all the cartilage samples were collected after written and informed consent of the donors according to the local legislation (ethic committee for research with human samples CODECOH: DC2014-2325).

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

The datasets used and analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding**

This work was supported by the “Regional Council of Normandy” through an “Emergence” program (to C.D., L.P. and P.G.) and a “RIN Recherche OncoThera” program (to L.P. and P.G.), by 2 grants to F.L. from the “Ligue Contre le Cancer” of Normandy confederation (Orne and Seine Maritime committees), by the French Government and the European Community (ERDF (European Regional Development Funds)) to P.G.. The xCELLigence apparatus (Core Facility Federative structure 4206 ICORE of Normandie University) was financed by the European Community (ERDF) and the Comprehensive Cancer Center F. Baclesse (Caen). These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication

## **Authors’ Contributions**

Conceptualization: P.G., C.D., L.P. C.V., F.L.; Methodology: A.B., C.V., R.C., A.D., E.B., Y.S., J.L., M.D., P.G., F.L.; Formal analysis: C.V., A.B., E.B., F.L.; Software: A.B., E.B.; Validation: C.V., F.L., P.G.; Investigation: C.V., A.B, R.C., A.D, E.B., F.L.; Resources: P.G., C.D., L.P., M.D., J.L., Y.S.; Data Curation: E.B. and C.D.; Writing - Original Draft Preparation: C.V., F.L.; Writing - Review & Editing: F.L., P.G.; Visualization: C.V., F.L, M.D., A.B., C.D., P.G.; Supervision: F.L., P.G.; Project Administration: F.L., P.G.; Funding Acquisition: P.G., C.D., L.P., F.L.

All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments**

We thank Marilyne Duval (Flow cytometry Core Facility, Federative Structure 4206 ICORE, Normandie University) for her technical help. C.V. is a recipient of a PhD scholarship from the French Ministry for Higher Education and Research. R.C. was supported by a PhD scholarship co-financed by the Fonds Eperon and the Regional Council of Normandy.

## References

- [1] Gelderblom H, Hogendoorn PC., Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AHM, et al. The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *Oncologist* 2008;13:320–9.
- [2] Nazeri E, Gouran Savadkoohi M, Majidzadeh-A K, Esmaeili R. Chondrosarcoma: An overview of clinical behavior, molecular mechanisms mediated drug resistance and potential therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;131:102–9.
- [3] Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2010;10:481–8.
- [4] Onishi AC, Hincker AM, Lee FY. Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* 2011;2011:381564.
- [5] Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;173:20–51.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33.
- [7] Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20:21–37.
- [8] Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, Numoto K, Kikuta K, Ozaki T, et al. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J Orthop Res* 2013;31:1992–8.
- [9] Palmi G, Marini F, Brandi ML. What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma? *Molecules* 2017;22.
- [10] Zhu Z, Wang C, Zhang Y, Nie L. MicroRNA-100 resensitizes resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of mTOR. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:917–23.
- [11] Pu F, Chen F, Shao Z. MicroRNAs as biomarkers in the diagnosis and treatment of chondrosarcoma. *Tumour Biol* 2016;37:15433–6.
- [12] Jeong W, Kim H-J. Biomarkers of chondrosarcoma. *J Clin Pathol* 2018;71:579–83.
- [13] Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, et al. Targeting of cell survival

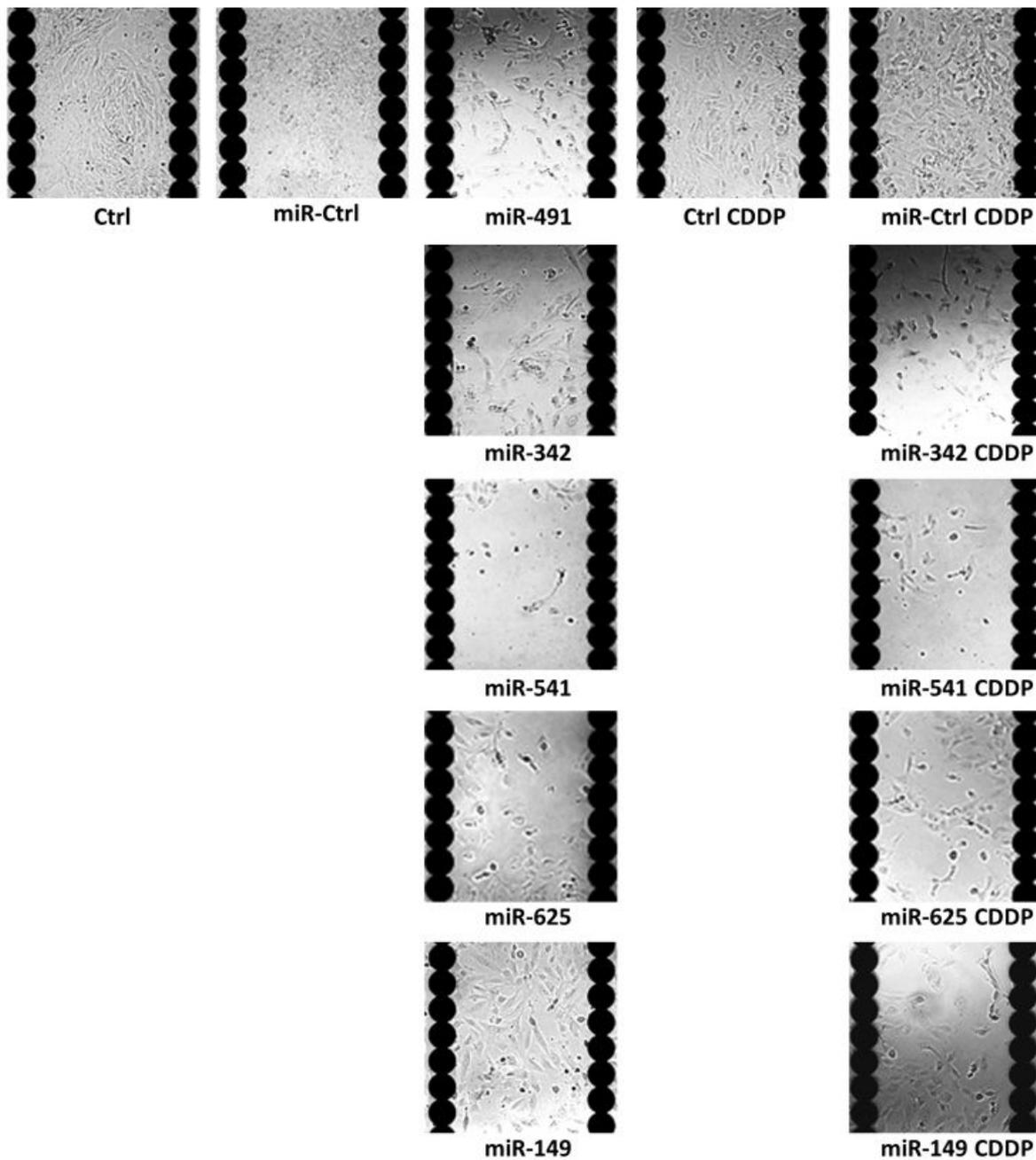
- genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 2007;25:820–8.
- [14] Lechler P, Renkawitz T, Campean V, Balakrishnan S, Tingart M, Grifka J, et al. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. *BMC Cancer* 2011;11:120.
- [15] van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH, Cleton-Jansen AM, Gelderblom H, et al. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2012;23:1617–26.
- [16] de Jong Y, van Maldegem AM, Marino-Enriquez A, de Jong D, Suijker J, Briaire-de Bruijn IH, et al. Inhibition of Bcl-2 family members sensitizes mesenchymal chondrosarcoma to conventional chemotherapy: report on a novel mesenchymal chondrosarcoma cell line. *Lab Invest* 2016;96:1128–37.
- [17] Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90:364–70.
- [18] Gozuacik D, Akkoc Y, Ozturk DG, Kocak M. Autophagy-Regulating microRNAs and Cancer. *Front Oncol* 2017;7:65.
- [19] Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuière M, Vigneron N, Brotin E, Lecerf C, et al. miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis* 2014;5:e1445.
- [20] Guo R, Wang Y, Shi W-Y, Liu B, Hou S-Q, Liu L. MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. *Molecules* 2012;17:14733–47.
- [21] Nakano H, Miyazawa T, Kinoshita K, Yamada Y, Yoshida T. Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2010;127:1072–80.
- [22] Li X, Liu Y, Granberg KJ, Wang Q, Moore LM, Ji P, et al. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene* 2015;34:1619–28.
- [23] Hou Z, Qin X, Hu Y, Zhang X, Li G, Wu J, et al. Longterm Exercise-Derived Exosomal

- miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection. *Circ Res* 2019;124:1386–400.
- [24] Chang L, Shrestha S, LaChaud G, Scott MA, James AW. Review of microRNA in osteosarcoma and chondrosarcoma. *Med Oncol* 2015;32:613.
- [25] de Jong Y, Monderer D, Brandinelli E, Monchanin M, van den Akker BE, van Oosterwijk JG, et al. Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma. *Oncogenesis* 2018;7:74.
- [26] Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:31–40.
- [27] van Oosterwijk JG, de Jong D, van Ruler MAJH, Hogendoorn PCW, Dijkstra PDS, van Rijswijk CSP, et al. Three new chondrosarcoma cell lines: one grade III conventional central chondrosarcoma and two dedifferentiated chondrosarcomas of bone. *BMC Cancer* 2012;12:375.
- [28] Kunisada T, Miyazaki M, Mihara K, Gao C, Kawai A, Inoue H, et al. A new human chondrosarcoma cell line (OUMS-27) that maintains chondrocytic differentiation. *Int J Cancer* 1998;77:854–9.
- [29] Suijker J, Oosting J, Koornneef A, Struys EA, Salomons GS, Schaap FG, et al. Inhibition of mutant IDH1 decreases D-2-HG levels without affecting tumorigenic properties of chondrosarcoma cell lines. *Oncotarget* 2015;6:12505–19.
- [30] Soriano A, Masanas M, Boloix A, Masiá N, París-Coderch L, Piskareva O, et al. Functional high-throughput screening reveals miR-323a-5p and miR-342-5p as new tumor-suppressive microRNA for neuroblastoma. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:2231–43.
- [31] Xu L, Du B, Lu QJ, Fan XW, Tang K, Yang L, et al. miR-541 suppresses proliferation and invasion of squamous cell lung carcinoma cell lines via directly targeting high-mobility group AT-hook 2. *Cancer Med* 2018;7:2581–91.
- [32] Gong X, Xu B, Zi L, Chen X. miR-625 reverses multidrug resistance in gastric cancer cells by directly targeting ALDH1A1. *Cancer Manag Res* 2019;11:6615–24.
- [33] Dao R, Wudu M, Hui L, Jiang J, Xu Y, Ren H, et al. Knockdown of lncRNA MIR503HG suppresses proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-489-3p and miR-625-5p. *Pathol Res Pract* 2020;216:152823.
- [34] Zhang Y, Guo X, Xiong L, Yu L, Li Z, Guo Q, et al. Comprehensive analysis of

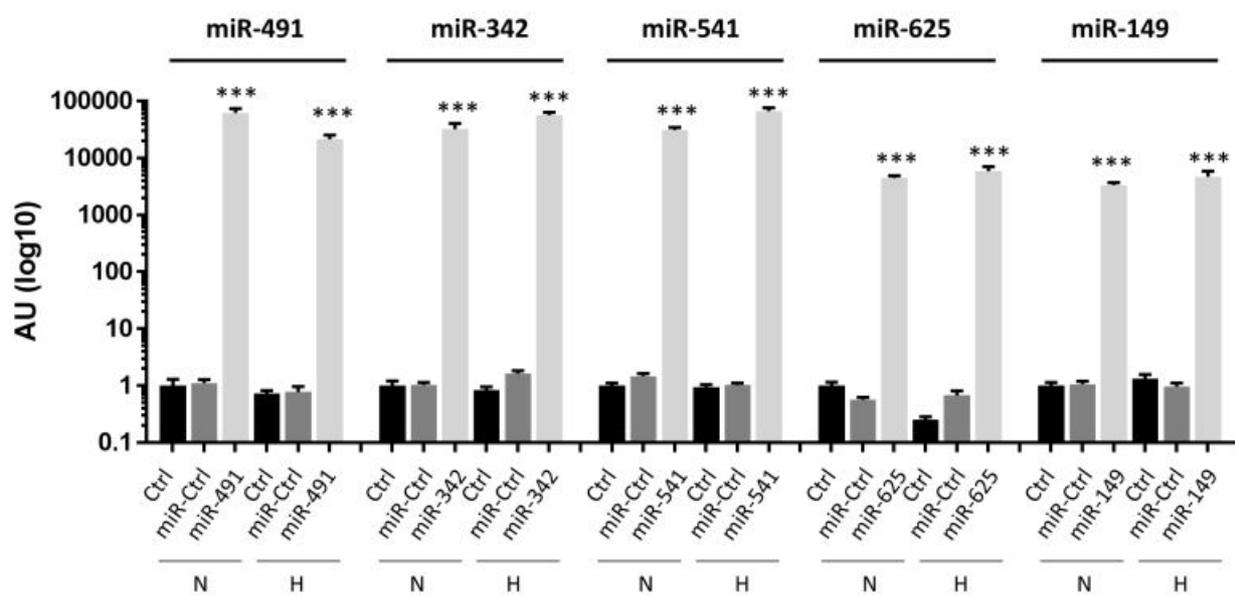
- microRNA-regulated protein interaction network reveals the tumor suppressive role of microRNA-149 in human hepatocellular carcinoma via targeting AKT-mTOR pathway. *Mol Cancer* 2014;13:253.
- [35] Xu R-D, Feng F, Yu X-S, Liu Z-D, Lao L-F. miR-149-5p inhibits cell growth by regulating TWEAK/Fn14/PI3K/AKT pathway and predicts favorable survival in human osteosarcoma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2018;32:2058738418786656.
- [36] Sun L, Zhai R, Zhang L, Zhao S. MicroRNA-149 suppresses the proliferation and increases the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting X-linked inhibitor of apoptosis. *Oncol Lett* 2018;15:7328–34.
- [37] He Y, Yu D, Zhu L, Zhong S, Zhao J, Tang J. miR-149 in Human Cancer: A Systemic Review. *J Cancer* 2018;9:375–88.
- [38] Chen T, Li Y, Cao W, Liu Y. miR-491-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting PKM2. *Oncol Lett* 2018;16:6472–8.
- [39] Yin Z, Ding H, He E, Chen J, Li M. Up-regulation of microRNA-491-5p suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP4 in human osteosarcoma. *Cell Prolif* 2017;50:e12308.
- [40] Qin J, Shaukat I, Mainard D, Netter P, Barré L, Ouzzine M. Constitutive activation of EGFR is associated with tumor progression and plays a prominent role in malignant phenotype of chondrosarcoma. *Oncotarget* 2019;10:3166–82.
- [41] Yang H, Li Q, Niu J, Li B, Jiang D, Wan Z, et al. microRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget* 2016;7:2709–20.
- [42] Liu Q, Wang Z, Zhou X, Tang M, Tan W, Sun T, et al. miR-342-5p inhibits osteosarcoma cell growth, migration, invasion, and sensitivity to Doxorubicin through targeting Wnt7b. *Cell Cycle* 2019;18:3325–36.
- [43] Leivonen S-K, Sahlberg KK, Mäkelä R, Due EU, Kallioniemi O, Børresen-Dale A-L, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Mol Oncol* 2014;8:93–104.
- [44] Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Chan L, Zhu M, Heyll K, Corbalán-Campos J, et al. The microRNA-342-5p fosters inflammatory macrophage activation through an Akt1- and microRNA-155-dependent pathway during atherosclerosis. *Circulation* 2013;127:1609–19.

- [45] Gao F, Zhang Y-F, Zhang Z-P, Fu L-A, Cao X-L, Zhang Y-Z, et al. miR-342-5p Regulates Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation Downstream to Notch Signaling in Mice. *Stem Cell Reports* 2017;8:1032–45.
- [46] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008656.
- [47] Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 2017;8:23996–4008.
- [48] Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* 2019;26:605–16.
- [49] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 2008;132:27–42.
- [50] Levine B. Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* 2007;446:745–7.
- [51] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4:600–6.
- [52] Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007;26:2527–39.
- [53] Legendre F, Ollitrault D, Hervieu M, Baugé C, Maneix L, Goux D, et al. Enhanced Hyaline Cartilage Matrix Synthesis in Collagen Sponge Scaffolds by Using siRNA to Stabilize Chondrocytes Phenotype Cultured with Bone Morphogenetic Protein-2 Under Hypoxia. *Tissue Eng Part C Methods* 2013;19:550–7.
- [54] Ollitrault D, Legendre F, Drougard C, Briand M, Benateau H, Goux D, et al. BMP-2, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs favor neo-cartilage hyaline matrix formation in chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods* 2015;21:133–47.
- [55] Legendre F, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Gruchy N, et al. Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- $\beta$ 1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs. *Sci Rep* 2017;7:3406.
- [56] Hamdi DH, Barbieri S, Chevalier F, Groetz J-E, Legendre F, Demoor M, et al. In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact. *BMC Cancer* 2015;15:579.

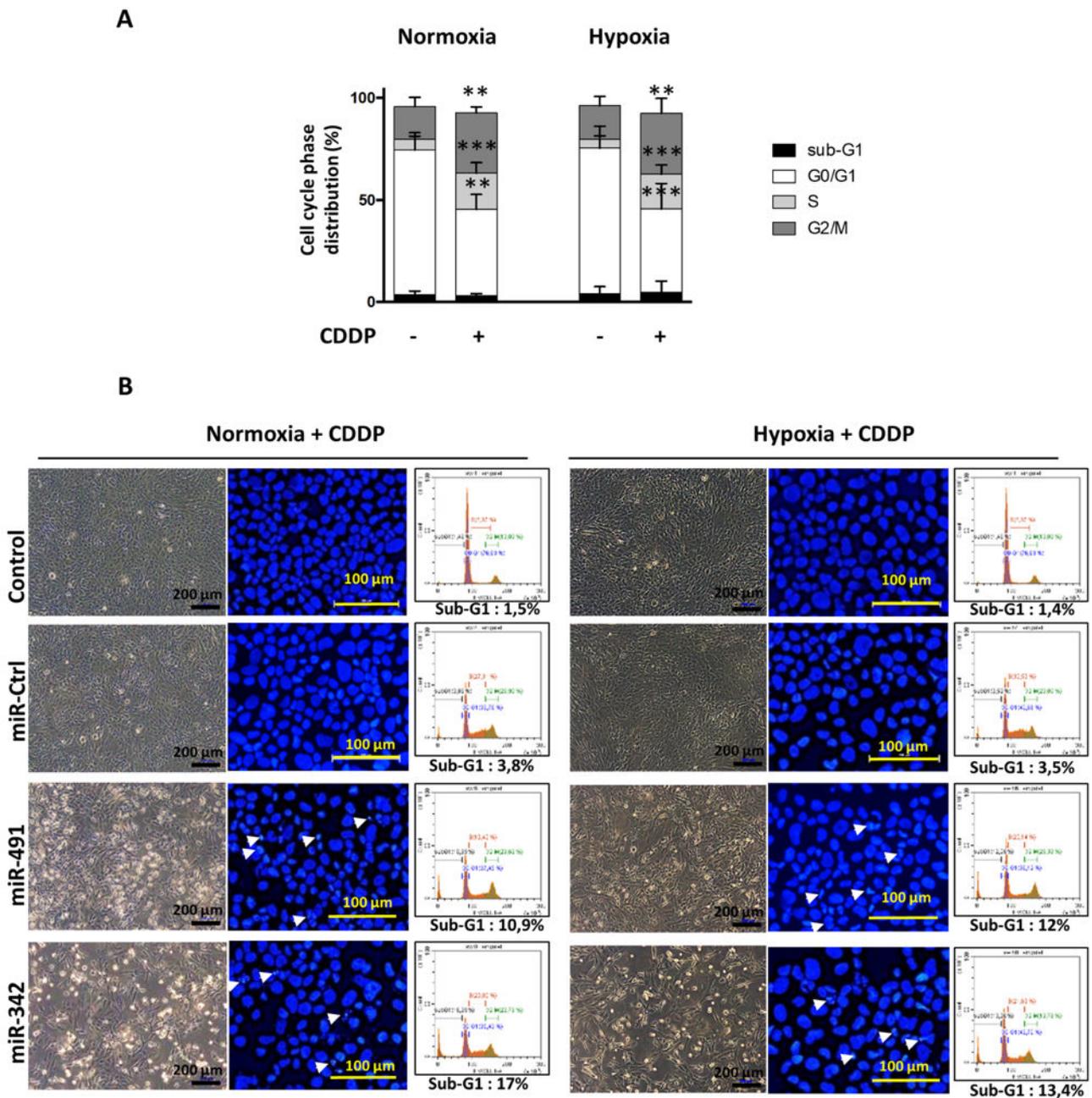
- [57] Legendre F, Heuze A, Boukerrouche K, Leclercq S, Boumediene K, Galera P, et al. Rhein, the metabolite of diacerhein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis. *Scand J Rheumatol* 2009;38:104–11.
- [58] Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011;740:33–43.
- [59] Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem* 2003;278:2903–12.



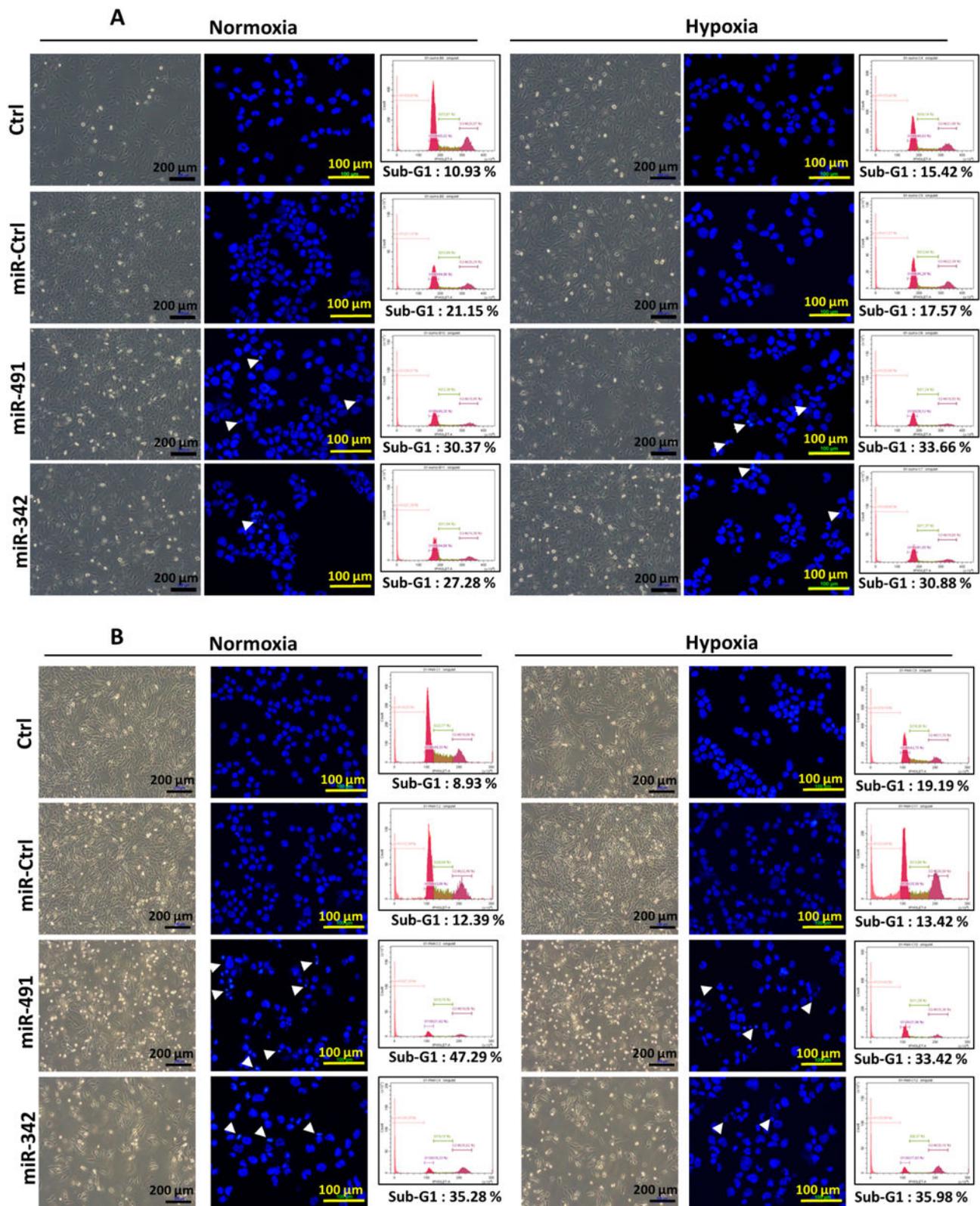
**Figure S1: Identification of miRNAs with cytotoxic and chemosensitizing effects by high-throughput cell imaging system.** SW1353 cells were seeded onto 96-well E-plates VIEW, and treated with miRNA and CDDP as described in figure 1. Endpoint morphological analysis of the cells was done 120 h after seeding with the Cellavista Imaging system. MiR-491-5p was used as a positive control of cytotoxicity.



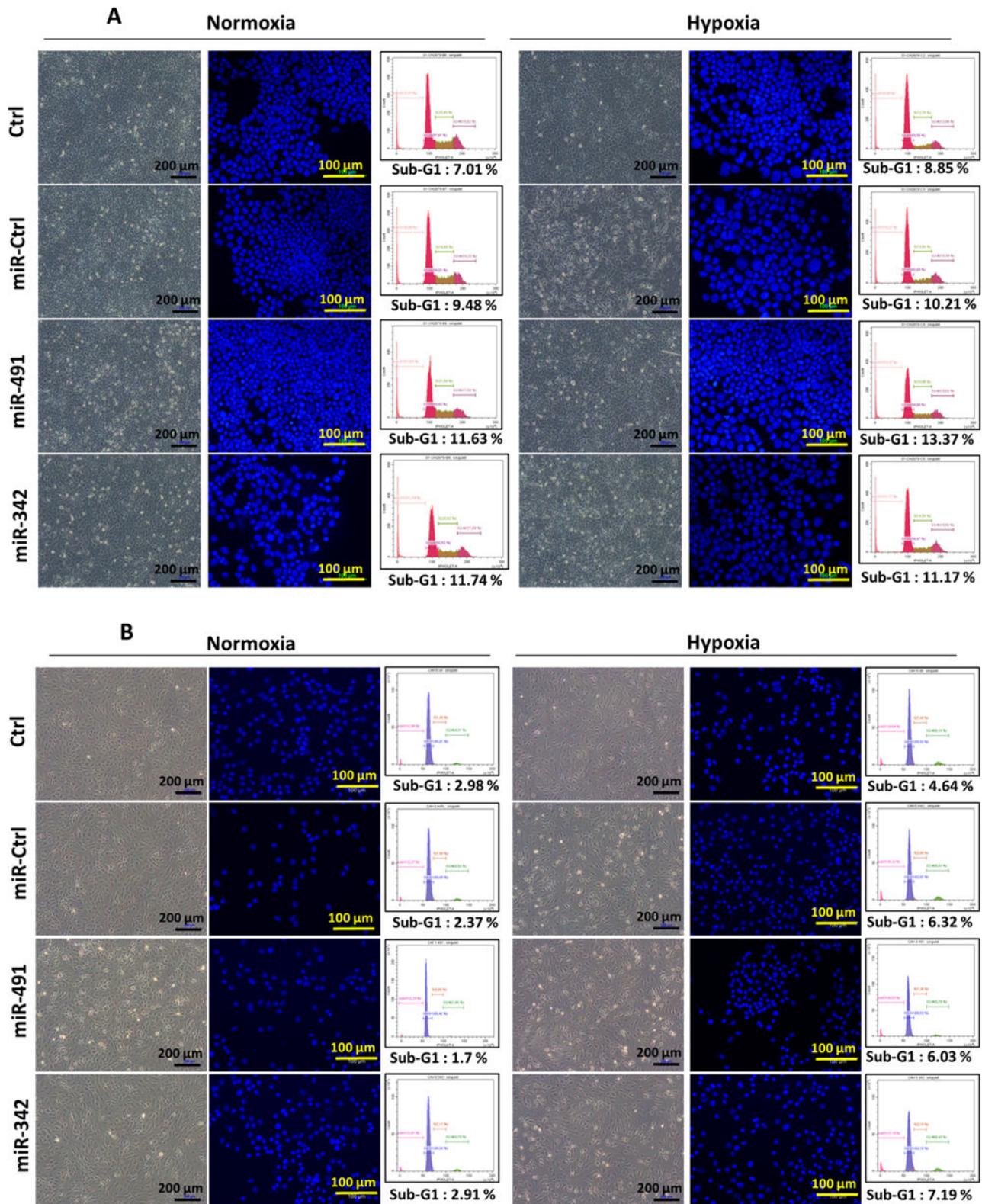
**Figure S2: Determination of miRNA transfection efficiency in SW1353 cells.** SW1353 cells were cultured and transfected with miRNA, under normoxia (N) or hypoxia (H), as described in figure 3. Total RNA was extracted 72 h post-transfection as described in the “Materials and Methods” section. Relative expressions of *miR-491-5p*, *miR-342-5p*, *miR-541-5p*, *miR-625-5p* and *miR-149-5p* were determined by RT-quantitative PCR and normalized to both *RNU-6B* and *miR-15a* levels. The results are representative of three independent experiments. Data are expressed as mean of triplicate samples  $\pm$  SD in arbitrary units (AU) in log scale. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using the student’s t-test (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).



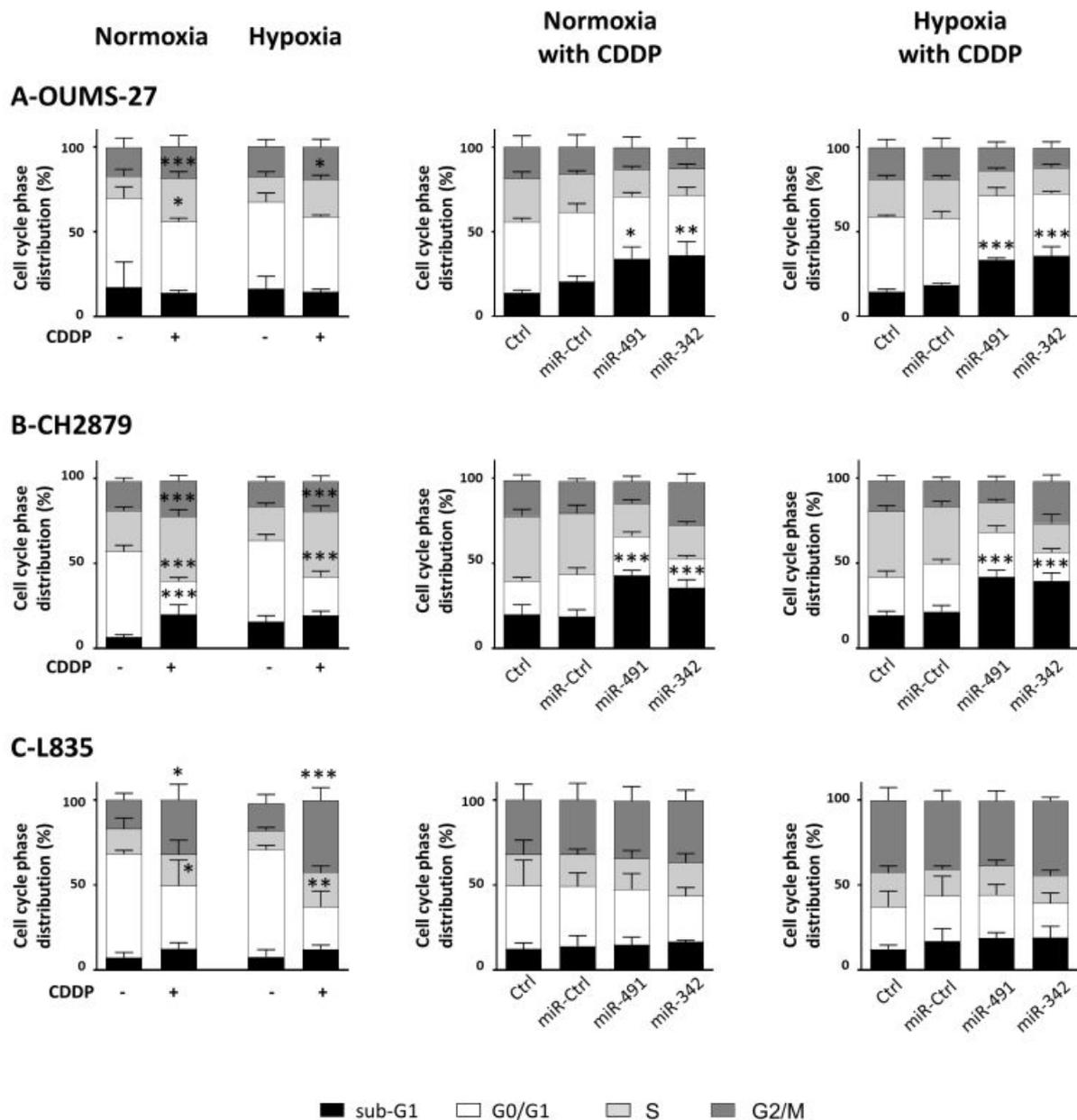
**Figure S3: Analysis of chemosensitizing effects of miRNA-491 and miRNA-342 on SW1353 cells.** SW1353 cells were cultured and transfected with miRNA as described in figure 3. Analyses were carried-out 72 h post-transfection. (A) Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. The histogram represent the analysis of 5 independent experiments (mean  $\pm$  SD) with the different phases of the cycle for non-transfected cells (Ctrl). Statistically significant differences in the percentage of events in the sub-G1, G0/G1, S and G2/M phases, between Ctrl and CDDP-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). (B) In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment performed in normoxia or hypoxia. In the middle part of the panels, nuclear morphology was obtained after DAPI staining as described in the “Materials and Methods” section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 5 independent experiments.



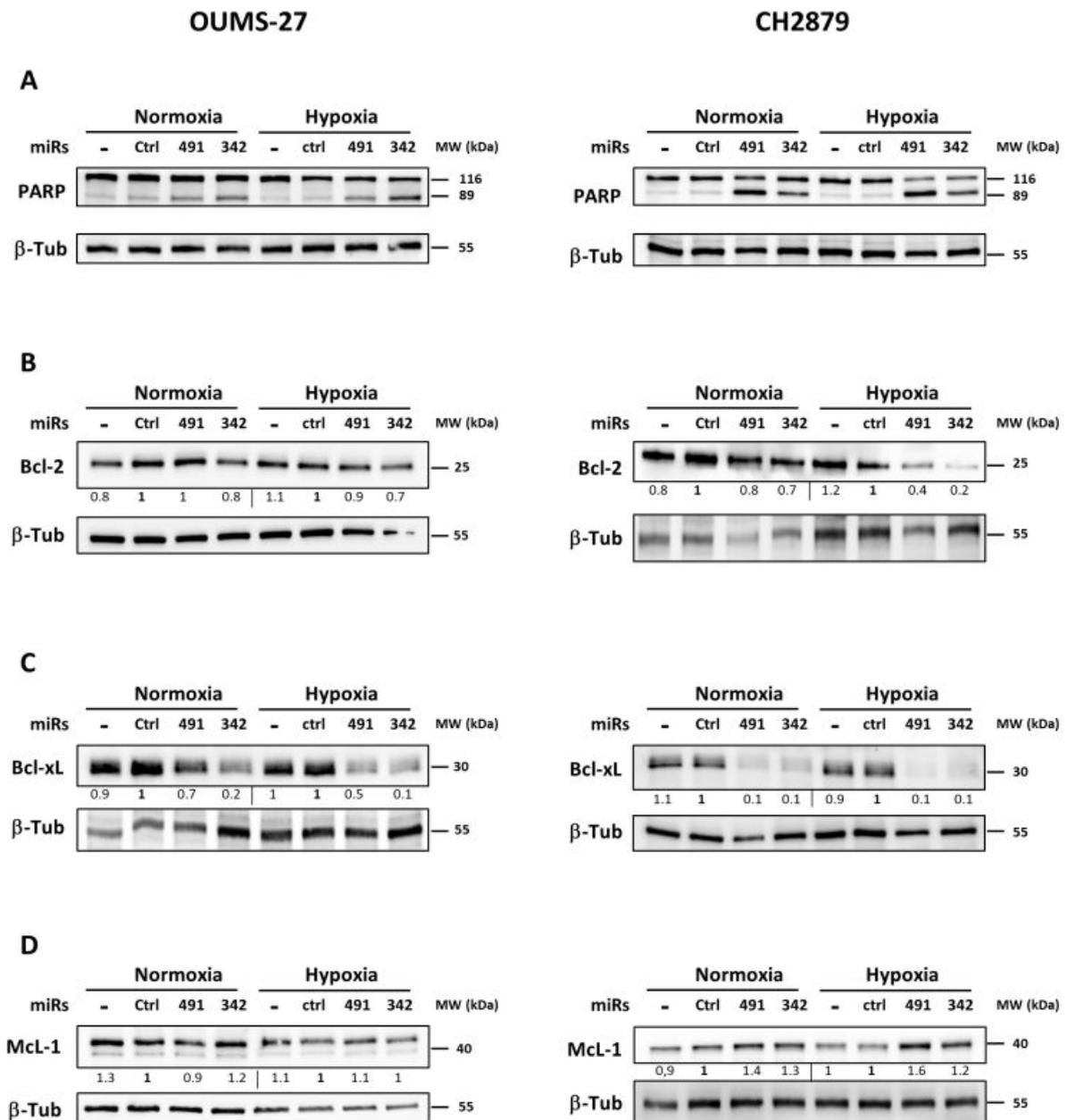
**Figure S4: Characterization of the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on OUMS-27 and CH2879 cells.** OUMS-27 cells (A) and CH2879 cells (B) were cultured and transfected with miRNA under normoxia or hypoxia as described in figure 4. Analyses were carried-out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was obtained after DAPI staining. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of at least 4 independent experiments.



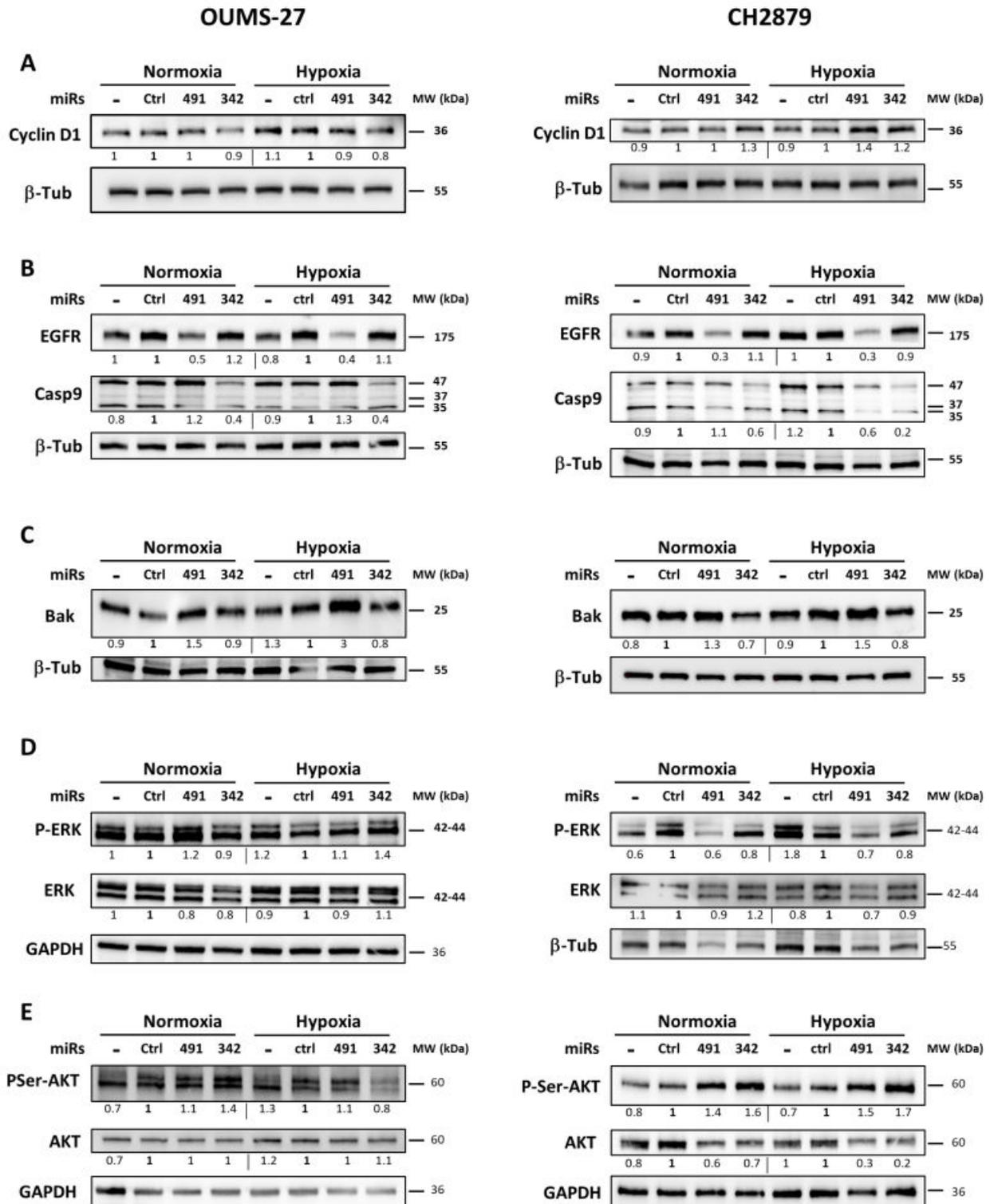
**Figure S5: Characterization of the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on L835 chondrosarcoma cells and on HAC.** L835 cells (A) and HAC (B) were cultured and transfected with miRNA in normoxia or hypoxia as described in figure 4. Analyses were carried-out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. No condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris were detected. In the middle part of each panel, nuclear morphology was obtained after DAPI staining. In the right part of the panels, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of at least 4 independent experiments.



**Figure S6: Analysis of the chemosensitizing effects of miR-491-5p and miR-342-5p on several chondrosarcoma cell lines.** OUMS-27 cells (A), CH2879 cells (B) and L835 cells (C) were cultured and transfected with miRNA as described in figure 4. For each chondrosarcoma cell line, treatments with CDDP were performed 48 h post-transfection. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry 72 h post-transfection. The histograms represent the analysis of the different phases of the cell cycle of at least 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD). Left panels: Statistically significant differences in the percentage of events in the sub-G1, G0/G1, S and G2/M phases, between Ctrl and CDDP-treated cells were determined using one-way ANOVA. Middle and right panels: Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events, between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).



**Figure S7: Analysis of the potential apoptotic/antiapoptotic proteins affected by miR-491-5p and miR-342-5p in OUMS-27 and CH2879 cells.** OUMS-27 cells (left panels) and CH2879 cells (right panels) were cultured and transfected as described in figure 4. Analysis were carried-out 72 h post-transfection. Protein extracts were analyzed by western blotting to evaluate the levels of PARP (A), Bcl-2 (B), Bcl-xL (C), and Mcl-1 (D), versus β-tubulin (β-Tub). Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to b-tubulin, and to the corresponding miR-Ctrl for each oxic condition.



**Figure S8: Study of some survival/death proteins and mitogenic signaling pathways affected by miR-491-5p and miR-342-5p in OUMS-27 and CH2879 cells.** OUMS-27 cells (left panels) and CH2879 cells (right panels) were cultured and transfected as described in figure 4. Analysis were carried-out 72 h post-transfection. Protein extracts were analyzed by western blotting to evaluate the levels of Cyclin D1 (A), EGFR and Caspase-9 (B), Bak (C), P-Thr202/Tyr204-ERK, and ERK (D), P-Ser473-AKT, and AKT (E), versus b-tubulin (b-Tub) or GAPDH used as loading controls. Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to b-tubulin or GAPDH, and to the corresponding miR-Ctrl for each oxidic condition.

**Table S1.** Predicted and direct targets of miR-491-5p. MiRabel (<http://bioinfo.univ-rouen.fr/mirabel/>) uses data from Pita, MiRanda, SVMicro and TargetScan prediction tools.

Protein	Gene	miRabel score	Rank in PITA	Rank in miRanda	Rank in SVMicro	Rank in TargetScan	Direct target	Citation
Bcl-xL	<i>BCL2L1</i>	0.0018096199491993	1289	939	840	506	Validated	19-21
EGFR	<i>EGFR</i>	0.0078076198697090	582	1090	2932	2081	Validated	19, 22
ERK2 ou P42MAPK	<i>MAPK1</i>	0.0385214015841484	1291	2653	3725	3035	-	-
ERK1 ou P44MAPK	<i>MAPK3</i>	0.0440779998898506	4768	3214	393	2301	-	-
Mcl-1	<i>MCL1</i>	0.1036410033702850	1582	3940	4642	3957	-	-
Bak	<i>BAK1</i>	0.7485740184783936	5920	4397	10404	2779	-	-
Cyclin D1	<i>CCND1</i>	0.8208479881286621	7350	7322	2156	-	-	-
Caspase 9	<i>CASP9</i>	0.8376489877700806	-	2329	12290	3899	-	-
AKT	<i>AKT1</i>	0.9833989739418030	2502	-	9557	-	-	-

**Table S2.** Predicted and direct targets of miR-342-5p. MiRabel (<http://bioinfo.univ-rouen.fr/mirabel/>) uses data from Pita, MiRanda, SVMicro and TargetScan prediction tools.

Protein	Gene	miRabel score	Rank in PITA	Rank in miRanda	Rank in SVMicro	Rank in TargetScan	Direct target	Citation
Bcl-xL	<i>BCL2L1</i>	0.0015979099553078	274	333	694	1627	Validated	30
EGFR	<i>EGFR</i>	0.0031764199957252	266	1284	666	1933	-	-
Cyclin D1	<i>CCND1</i>	0.0166469998657703	2077	1721	1662	2148	Validated	30
ERK1 ou P44MAPK	<i>MAPK3</i>	0.0485971011221409	4858	3451	1078	1144	-	-
Bak	<i>BAK1</i>	0.0651884004473686	4660	4923	211	1649	-	-
Bcl-2	<i>BCL2</i>	0.1019570007920265	273	1676	5022	728	-	-
Caspase 9	<i>CASP9</i>	0.1040249988436699	5524	7	3686	3210	Validated	23
Mcl-1	<i>MCL1</i>	0.1049569994211197	2851	5648	754	3589	-	-
ERK2 ou P42MAPK	<i>MAPK1</i>	0.3654370009899139	692	-	3345	3785	-	-
AKT	<i>AKT1</i>	0.6705200076103210	6222	-	2309	3718	Validated	44

### III. Principaux résultats et conclusions de l'étude

L'identification de miRNAs cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs par mesure de l'activité cellulaire en temps réel par impédancemétrie a été réalisée sur des plaques de culture en verre. Or, le comportement des cellules cultivées sur un support en verre, diffère des conditions de culture sur un support plastique. Par conséquent, l'effet de certains miRNAs observé *via* la technologie xCELLigence peut être biaisé. C'est pourquoi nous avons voulu valider la cytotoxicité des miRNAs sélectionnés par criblage haut débit en menant des approches fonctionnelles individuelles sur des supports de culture plastiques. De plus, l'analyse par le criblage haut débit a été réalisée en normoxie, alors que le CS est une tumeur hypoxique. L'hypoxie influence de nombreuses voies de signalisation cellulaires et pourrait donc altérer l'efficacité des miRNAs. Aussi, nous avons évalué l'effet cytotoxique des miRNAs à la fois en normoxie et en hypoxie dans plusieurs lignées de CS. Dans cette étude, **nous avons validé l'effet cytotoxique de deux miRNAs, le miR-491-5p et le miR-342-5p sur 3 des 4 lignées cellulaires étudiées (SW1353, OUMS27 et CH2879).** Ces miRNAs n'ont pas eu d'effet cytotoxique sur la lignée de CS L835 et sur des chondrocytes sains. **Ils n'ont pas eu non plus d'effet chimiosensibilisateur dans nos conditions expérimentales.**

Concernant le miR-491-5p, il a été sélectionné tout d'abord pour son effet potentiellement cytotoxique observé lors du criblage haut débit. Son analyse *in silico* a ensuite révélée qu'il pouvait potentiellement inhiber la transcription de diverses protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et dans les voies de signalisation liées à l'apoptose. De plus, ce miRNA avait déjà été étudié sur des lignées cellulaires de cancer ovarien où il avait été identifié comme suppresseur de tumeur *via* la régulation post-transcriptionnelle du facteur anti-apoptotique Bcl-xL et de l'EGFR, deux protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire (Denoyelle et al., 2014). Sur les 3 lignées de CS, SW1353, OUMS27 et CH2879, nous avons confirmé que le miR-491-5p était cytotoxique en normoxie et en hypoxie, et qu'il induisait la mort des cellules par apoptose. Nous avons aussi mis en évidence qu'il ciblait directement la région 3'UTR de l'ARNm de Bcl-xL diminuant de ce fait son expression protéique. Il a également diminué l'expression de l'EGFR (ARNm et protéine). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de diminution de l'expression de la protéine Mcl-1 ou d'augmentation de celle de BIM, sous-jacente à l'inhibition de l'expression de l'EGFR (données non fournies). L'EGFR est également impliqué dans l'induction de voies de signalisation induisant la prolifération et la survie, comme les voies AKT et MAPK/ERK. Nous avons donc étudié si l'inhibition de l'EGFR avait un impact sur l'activation de ces voies.

L'analyse *in silico* des cibles du miR-491-5p a identifié ERK1 et ERK2 comme des cibles potentielles. Sur la lignée cellulaire SW1353, nous avons observé une diminution de l'expression des ERKs (formes totales et phosphorylées) uniquement en normoxie. Par contre, il diminue leur expression à la fois en normoxie et en hypoxie dans la lignée CH2879, alors que cette diminution n'a pas été retrouvée sur la lignée OUMS27. La protéine AKT a aussi été identifiée comme étant une cible potentielle du miR-491-5p. Le miR-491-5p diminue l'expression de la forme totale d'AKT uniquement sur les lignées cellulaires SW1353 (normoxie) et CH2879 (normoxie et hypoxie), sans toutefois diminuer son activation, puisqu'il tend à augmenter sa phosphorylation dans la lignée CH2879. L'effet du miR-491-5p sur les voies MAPK/ERK et AKT est donc variable d'une lignée à une autre et dépendante de la condition oxique. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak sur toutes les lignées de CS. Donc d'après ces résultats, nous avons conclu que **le miR-491-5p favorise l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules de CS en normoxie et en hypoxie, via l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et de l'EGFR, et en favorisant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak.**

Concernant le miR-342-5p, nous avons confirmé son effet cytotoxique sur les 3 lignées de CS SW1353, OUMS-27 et CH2879 en normoxie et en hypoxie. Nous avons mis en évidence que le miR-342-5p active l'apoptose. Il existait quelques études sur l'implication de ce miRNA dans les cancers (Soriano et al., 2019; Yang et al., 2016; Liu et al., 2019), mais aucune sur le CS. L'analyse *in silico* avait prédit pour ce miRNA plusieurs cibles moléculaires impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire. Ainsi, nous avons mis en évidence pour la première fois que le miR-342-5p cible directement la séquence 3'UTR de l'ARNm de deux facteurs anti-apoptotiques, Bcl-xL et Bcl-2. A l'aide de différentes mutations des séquences cibles de ce miR dans les régions 3'UTR, nous avons mis en évidence qu'il exerce une inhibition de la traduction *via* les séquences 679-686 de l'UTR de *BCL2L1* et 818-824 de l'UTR de *BCL2*. En revanche, comme dans le cancer du sein (Leivonen et al., 2014), nous n'avons pas démontré d'effet significatif du miR-342-5p sur les voies de signalisation AKT et ERK. De manière surprenante, nous avons également observé une inhibition de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak et une inhibition de l'expression de la caspase-9, une protéine initiatrice de l'apoptose (l'analyse *in silico* avait révélé la caspase-9 comme une cible potentielle du miR-342-5p). Or, ces deux protéines jouent un rôle important dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Pourtant, l'activation de la caspase 3/7 et le clivage de la PARP témoignent d'une

activation de l'apoptose par le miR-342-5p. L'analyse morphologique des noyaux a aussi montré que le miR-342-5p induit la présence de corps apoptotiques. Du fait que Bcl-2 joue un rôle inhibiteur de l'autophagie, son inhibition par le miR-342-5p serait en faveur de l'activation de l'autophagie. Nous avons donc étudié cette voie et mis en évidence que le miR-342-5p augmente l'activité autophagique au sein des cellules de CS. Plusieurs études ont montré qu'une activation critique de l'autophagie induit la mort de la cellule (Denton & Kumar, 2019; Levine & Kroemer, 2008). Nous avons donc mis en évidence pour la première fois, que **le miR-342-5p est cytotoxique sur des lignées cellulaires de CS en ciblant directement les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL favorisant ainsi l'activation de l'apoptose et qu'il active aussi l'autophagie.**

Le contexte 3D/2D peut influencer la physiologie des cellules (Duval et al., 2017a). Afin de s'approcher au mieux du contexte physiopathologique des cellules *in vivo*, nous avons donc évalué l'efficacité des miRs-491-5p et -342-5p dans un modèle de culture d'organoïde conférant un environnement en 3D. Par cette approche, seul le miR-342-5p a engendré des effets significativement cytotoxiques sur les cellules SW1353 de CS et cela uniquement en hypoxie. **Le miR-342-5p serait donc le miR cytotoxique le plus adapté au contexte physiopathologique des CS.** De plus, les miRs-491-5p et -342-5p n'ont pas induit de cytotoxicité chez des chondrocytes non tumoraux. Cela présente un avantage pour leur utilisation en thérapie car, si ces miRNAs sont vectorisés au sein de la tumeur, ils n'auront pas d'effet délétère sur les tissus adjacents à la tumeur. Nous avons par ailleurs au travers de cet article confirmé le potentiel thérapeutique ciblant les membres de la famille Bcl-2 chez le CS.

## **B. Rôle suppresseur de tumeur du miR-342-5p et du miR-491-5p dans les cellules d'ostéosarcome humain**

Cet article sera soumis pour publication après l'acceptation du premier article dans la revue BMC Cancer (IF : 3,1).

### **I. Contexte de la publication**

Les OS sont les premiers types de tumeurs malignes osseuses. Ces tumeurs se caractérisent par la synthèse d'une matrice ostéoïde. Le traitement actuel comprenant une chimiothérapie combinatoire associée à la chirurgie présente d'excellents résultats. Toutefois, pour les tumeurs présentant des métastases ou une récurrence, le traitement par chimiothérapie se révèle inefficace. Ainsi, les miRNAs représentent une alternative thérapeutique intéressante. De plus, les miRNAs exercent des effets différents selon le tissu étudié. Par exemple, dans la littérature, le miR-149-5p est parfois décrit comme un miRNA oncogène alors que dans d'autres types de tumeurs, il était décrit comme un miRNA suppresseur de tumeur (He et al., 2018). L'objectif ici, était d'effectuer une analyse fonctionnelle individuelle afin de vérifier la spécificité des miRNAs sélectionnées par criblage haut débit chez le CS (miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p et miR-149-5p). Pour cela, nous avons testé les 5 miRNAs sur 3 lignées cellulaires d'OS (HOS, MG-63 et SaOS-2). Leur effet chimiosensibilisateur a également été évalué. Ensuite, pour les miRNAs-491-5p et 342-5p qui ont eu un effet cytotoxique sur ces lignées, nous avons tenté d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu. Pour cela, nous nous sommes centrés sur les cibles prédites par l'analyse *in silico*, plus particulièrement sur les membres de la famille Bcl-2, jouant un rôle central dans l'activation de l'apoptose.

## II. Publication n°2

### **Tumor suppressive role of miR-342-5p and miR-491-5p in human osteosarcoma cells**

**Clément Veys<sup>1</sup>, Manon Jammes<sup>1</sup>, Françoise Rédini<sup>2</sup>, Laurent Poulain<sup>3,4</sup>, Christophe Denoyelle<sup>3,4,5</sup>, Florence Legendre<sup>1\*</sup> and Philippe Galéra<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Normandie University, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000, Caen, France. clement.veys@unicaen.fr; manon.jammes@unicaen.fr; florence.legendre@unicaen.fr; philippe.galera@unicaen.fr

<sup>2</sup> INSERM UMR 1238 Phy-Os "Bone sarcomas and remodeling of calcified tissues", Nantes University, F-44035 Nantes, France. francoise.redini@univ-nantes.fr

<sup>3</sup> Normandie University, UNICAEN, Inserm U1086 ANTICIPE, Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancer (BioTICLA), 14000, Caen, France. l.poulain@baclesse.unicancer.fr; cdenoyelle@baclesse.unicancer.fr

<sup>4</sup> UNICANCER, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, 14000, Caen, France.

<sup>5</sup> Normandie University, UNICAEN, ImpedanCELL Platform, Federative Structure 4206 ICORE, 14000, Caen, France.

\* These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Philippe Galéra ; philippe.galera@unicaen.fr. Florence Legendre ; florence.legendre@unicaen.fr

## **Abstract**

**Background:** Osteosarcomas are the first type of malignant tumors of the bone. These tumors are characterised by the synthesis of an osteoid matrix. Current treatments are based on both surgery and combination with chemotherapy. However, for tumors with metastases or recurrences, chemotherapy treatment is mostly ineffective and the tumors are sometimes unresectable. Thus, the use of miRNAs may represent an interesting therapeutic alternative to develop new therapeutic options.

**Methods:** Using high throughput functional screening by impedancemetry, we identified 5 miRNAs with potential antiproliferative or chemosensitive effects on chondrosarcoma cells. The tumor suppressive activity of miR-342-5p and miR-491-5p was validated on 3 chondrosarcoma cell lines by individual functional validation. In this strategy, we performed in parallel an individual functional validation of these 5 miRNAs on 3 osteosarcoma cell lines, used as controls to evaluate their specificity of action on another type of bone sarcoma. First, we evaluated their metabolic and cytotoxic effects. Then, cell cycle phase distribution, western-blot and reporter luciferase assays were carried out to evaluate the mechanisms of action of these cytotoxic miRNAs.

**Results:** The cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p were confirmed on osteosarcoma cells. Both miRNAs induced apoptosis. They increased Bak protein expression and directly targeted Bcl-xL. MiR-342-5p also decreased Bcl-2 protein expression and miR-491-5p decreased that of EGFR.

**Conclusion:** These results revealed the tumor suppressive activity of miR-342-5p and miR-491-5p on osteosarcoma. Through this work, we also confirmed the potential of BCL-xL as a therapeutic target in osteosarcomas.

**Keywords:** osteosarcoma, miR-342-5p, miR-491-5p, Bcl-2/Bcl-xL, Bak, apoptosis.

## Introduction

Osteosarcomas are the most common type of bone tumors (Longhi *et al.*, 2006; Evola *et al.*, 2017; Mirabello *et al.*, 2009). They affect primarily children and adolescents. These tumors mainly develop in the metaphyseal region of long bones, such as the distal femur, the proximal tibia, and the proximal humerus (Kansara *et al.*, 2014; Misaghi *et al.*, 2018). Osteosarcomas are bone-forming malignant tumors. They are classified into several histological subtypes: central, intramedullary and surface tumors, with subtypes in each group (Misaghi *et al.*, 2018). Conventional osteosarcomas represent 80% of all primary osteosarcomas. Conventional treatment of osteosarcomas consists of surgery and combination with chemotherapy, leading to approximately 70% of success for the patients remission after 5 years (Collins *et al.*, 2013). Nevertheless, the survival of patients with metastatic or recurrent tumors remained unchanged over the past 40 years, with an overall survival rate of approximately 20% at 5 years (Meyers *et al.*, 2011). At the point of diagnosis, 20% of patients have pulmonary metastases, but it is estimated that undetectable metastases are present in 80% of the cases (Dela Cruz, 2013). New therapeutic strategies are therefore needed for the treatment of OS.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of about 20-25 nucleotides, that act at the post-transcriptional level. They bind to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of their target mRNA to suppress their translation or to stimulate their degradation (Bartel, 2018). Unlike short interfering RNA (siRNAs), a single miRNA can silence the expression of multiple mRNAs and a same RNA can be targeted by several miRNAs. Thus, miRNAs are key regulators of complex networks of targets (Bartel, 2009; Gebert & MacRae, 2019). MiRNAs play critical roles in a wide variety of cellular processes including proliferation, differentiation, apoptosis and metastasis. They can act either as oncogenes or tumor suppressors, and could serve as diagnostic or prognostic biomarkers. Various studies have reported the aberrant expression of miRNAs in osteosarcomas (Wang *et al.*, 2019; Palmmini *et al.*, 2017; Botti *et al.*, 2019). Among them, miR-34a, already identified as a tumor suppressor in many cancers, was down-regulated in several cancers, including osteosarcomas (Qi-Cai Li *et al.*, 2017). In this study, the authors showed that miR-34a enhanced the sensitivity to cisplatin by upregulating the expression of c-Myc and Bim, and by inducing apoptosis in osteosarcoma cells (Qi-Cai Li *et al.*, 2017). MiRNAs may also allow the discovery of novel therapeutic targets in osteosarcomas (Palmmini *et al.*, 2017).

In a previous study, using a functional high-throughput miRNA screening and miRNA target prediction, we have identified 5 miRNAs which could induce apoptosis in a chondrosarcoma cell line by targeting *BCL2*, *BCL2L1* or *MCL1* mRNAs (Veys *et al.*, submitted). Next, individual functional studies have been performed with these miRs, miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p. We have validated the apoptotic effects of miR-491-5p and miR-342-5p in 3 chondrosarcoma cell lines and identified the key signalling pathways involved in their tumor suppressor activity. Thus, we have demonstrated a direct post-transcriptional inhibition of both anti-apoptotic *BCL2L1* and *BCL2* mRNAs by miR-342-5p, and a direct post-transcriptional inhibition of *BCL2L1* mRNA by miR-491-5p in SW1353 chondrosarcoma cells. As others (Denoyelle *et al.*, 2014), we also demonstrated that miR-491-5p inhibited the expression of EGFR, whose constitutive activation is associated with cell proliferation, survival and migration. Additionally, miR-491-5p also increased the expression of the Bak pro-apoptotic protein. Despite obvious pro-apoptotic effects, we have also previously shown that miR-342-5p had an anti-apoptotic potential through the decrease of pro-caspase 9 protein expression in chondrosarcoma cells (Veys *et al.*, submitted).

In view of these results, in the present study, we evaluated the effect of these 5 potential cytotoxic miRNAs on osteosarcoma cell lines to test their efficacy on another types of bone sarcoma cells, used to determine the action specificity of the miRs effects. We evaluated the cytotoxic and chemosensitizing effects of miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p on three osteosarcoma cell lines. We only showed the cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p and performed, thereafter, individual functional validation studies with these two miRNAs. We validated their apoptotic effects and identified the key signalling pathways involved in their activity. In particular, using a luciferase reporter assay, we demonstrated direct post-transcriptional inhibition of the anti-apoptotic *BCL2L1* mRNAs by miR-491-5p and miR-342-5p.

## Results

### **Mir-491-5p and miR-342-5p have antimetabolic effects on osteosarcoma cell lines.**

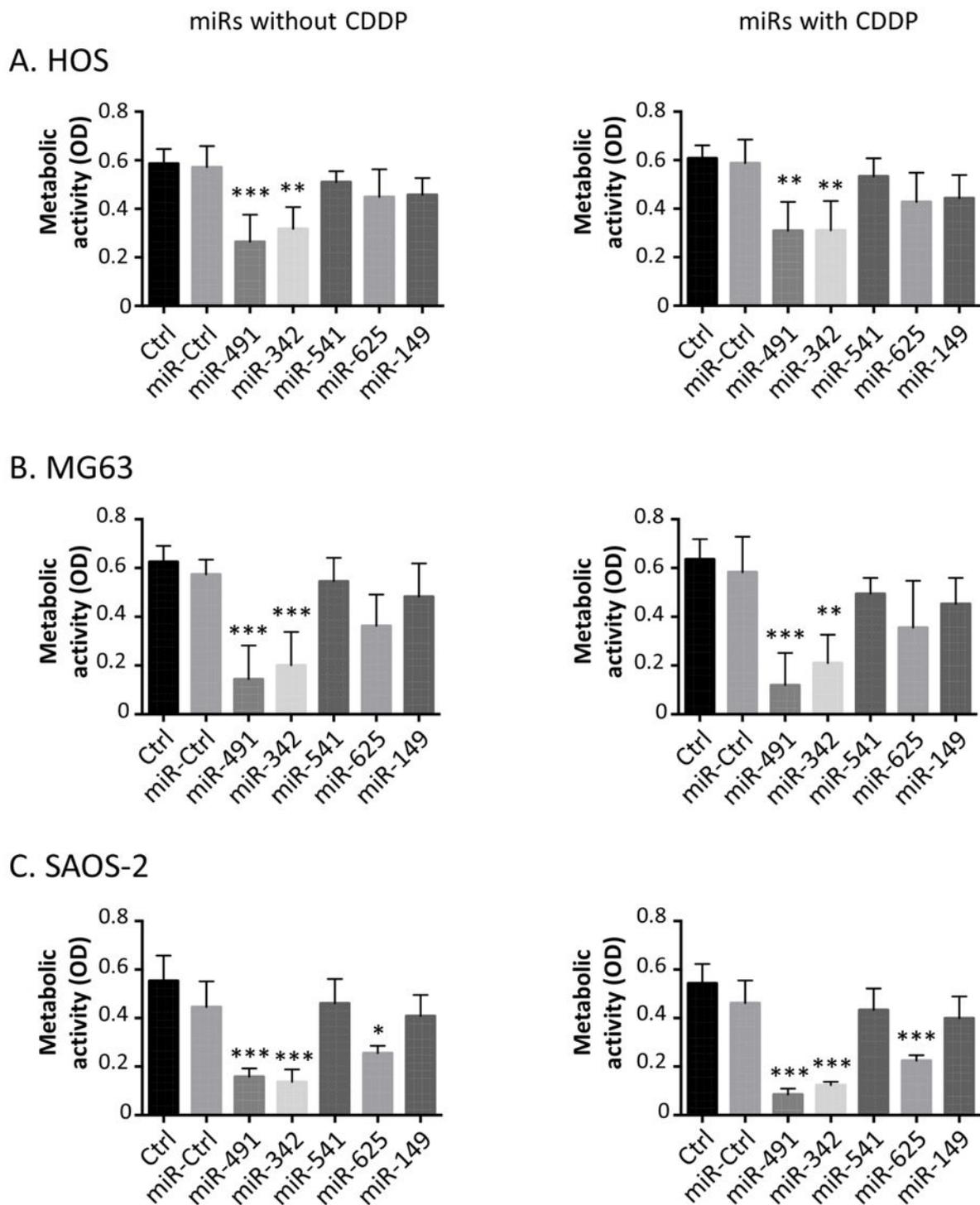
We first evaluated the antimetabolic effects of miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p alone, or in the presence of a sublethal dose of CDDP in order to test their chemosensitizing potential. An XTT assay measuring the metabolic activity of the cells was carried out on 3 osteosarcoma cell lines: HOS, MG-63 and SaOS-2 (Figure 1).

In the HOS cell line, miR-491-5p significantly decreased the metabolic activity compared to miR-Ctrl without CDDP (2.2-fold decrease,  $p < 0.001$ ), or with CDDP (1.9-fold decrease,  $p < 0.01$ ) (Figure 1A). MiR-342-5p also induced a significant decrease in the metabolic activity for both conditions (1.9-fold,  $p < 0.01$ ). Others miRNAs did not significantly modulate the metabolic activity of HOS cells.

In the MG-63 cell line, only miR-491-5p and miR-342-5p significantly lowered the metabolic activity of the cells (Figure 1B). Indeed, miR-491-5p induced a 4-fold and 4.9-fold decrease ( $p < 0.001$ ) in the metabolic activity compared to miR-Ctrl- and miR-Ctrl/CDDP-treated cells respectively, with no significant difference between the 2 attenuations. MiR-342-5p diminished by 2.9-fold the metabolic activity in both conditions ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively).

Three miRNAs significantly impaired the metabolic activity of the SaOS-2 cell line (Figure 1C). MiR-625-5p decreased the metabolic activity by 1.7-fold ( $p < 0.05$ ) relative to miR-Ctrl-treated cells, and by 2-fold ( $p < 0.001$ ) relative to miR-Ctrl/CDDP-treated cells. However, miR-491-5p and miR-342-5p had a more potent effect. MiR-491-5p downregulated the metabolic activity by 2.8-fold ( $p < 0.001$ ) and by 5.4-fold ( $p < 0.001$ ), compared to miR-Ctrl and miR-Ctrl/CDDP-treated cells respectively. There was no significant difference in the metabolic activity of miR-491-5p- and miR-491-5p/CDDP-treated cells. Likewise, miR-342-5p decreased the metabolic activity by 3.2-fold without CDDP ( $p < 0.001$ ) and by 3.5-fold with CDDP ( $p < 0.001$ ).

Overall, these data only revealed the anti-metabolic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on the 3 osteosarcoma cell lines, and of miR-625-5p only on the SaOS-2 cell line. Moreover, there was no significant chemosensitizing effect of these miRNAs to CDDP on the metabolism of osteosarcoma cell lines.



**Figure 1: Effects of miRNAs on the metabolic activity of osteosarcoma cell lines.** (A) HOS, (B) MG-63 and (C) SaOS-2 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p, miR-342-5p, miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p. The treatment with CDDP (0.5  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. The metabolic activity of cells was evaluated 72 h post-transfection and expressed as mean of OD  $\pm$  SD of 4 independent experiments. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### **MiR-491-5p and miR-342-5p have cytotoxic effects on osteosarcoma cell lines.**

Next, we studied the potential cytotoxic effect of these 5 miRNAs on the 3 osteosarcoma cell lines (Figure 2).

In the HOS cell line, miR-491-5p and miR-342-5p induced only significant cytotoxic effects when used alone: 2.2-fold ( $p < 0.01$ ) and 1.8-fold increase ( $p < 0.05$ ) respectively, compared to miR-ctrl without CDDP (Figure 2A). In combination with CDDP, miR-491-5p and miR-342-5p did not significantly further induced cytotoxicity (1.9-fold increase and 2-fold increase respectively). MiR-625-5p tended to increase cytotoxicity (1.3-fold relative to miR-Ctrl and 1.6-fold relative to miR-Ctrl/CDDP-treated cells).

Only miR-491-5p and miR-342-5p induced significant cytotoxic effects in the MG-63 cells (approximately 3-fold with or without CDDP compared to miR-Ctrl) (Figure 2B). The effect of miR-625-5p was not statistically significant in the presence or absence of CDDP (1.6-fold and 2.3-fold increase respectively).

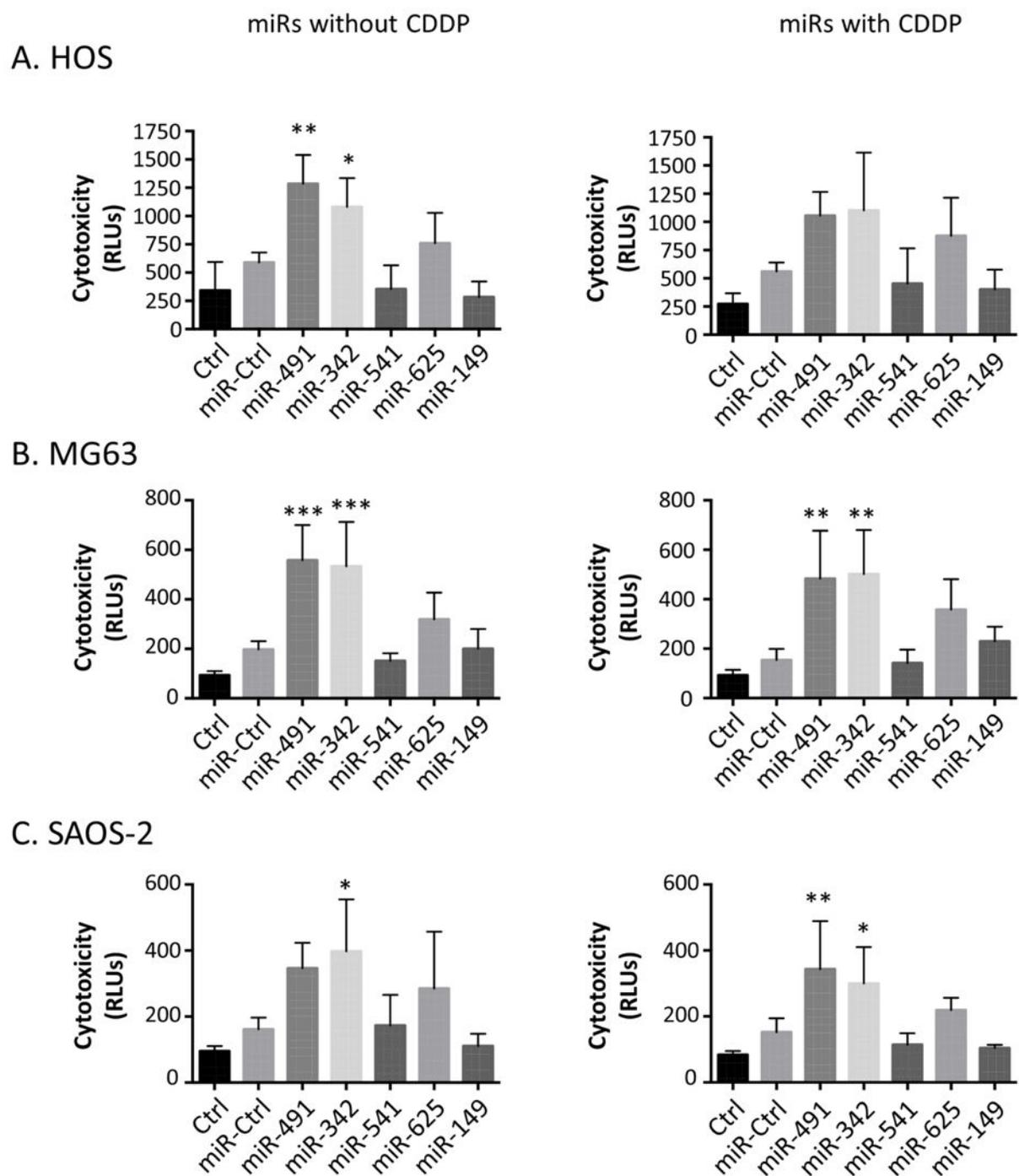
In the SaOS-2 cell line, only miR-342-5p significantly provoked cytotoxic effects with or without CDDP (2.5-fold and 2-fold relative to the respective miR-Ctrl,  $p < 0.05$ ), with no significant difference between both conditions (Figure 2C). MiR-491-5p enhanced cytotoxicity by approximately 2-fold for both conditions, but this effect was only significant ( $p < 0.01$ ) in combination with CDDP.

Only miR-491-5p and miR-342-5p showed significant cytotoxic effects on the 3 osteosarcoma cell lines. The combination of CDDP and miRNAs did not seem to improve the effects of miRNAs.

### **MiR-491-5p and miR-342-5p induce cell death in osteosarcoma cell lines.**

We then analyzed cell cycle progression using flow cytometry in the 3 osteosarcoma cell lines (Figure 3). Cells were treated with miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p in the presence or absence of a sublethal dose of CDDP.

CDDP increased the percentage of events in the S and G2/M phases at the expense of the G0/G1 phase in HOS cells (Figure 3A). CDDP only enhanced the percentage of events in the S phase in both MG63 and SaOS-2 cells (Figure 3B and 3C). MiR-491-5p and miR-342-5p alone did not induce cell cycle blockade (no stalling in S or G2/M phases), but they induced a significant accumulation of the cells in the sub-G1 phase associated to cell death induction.



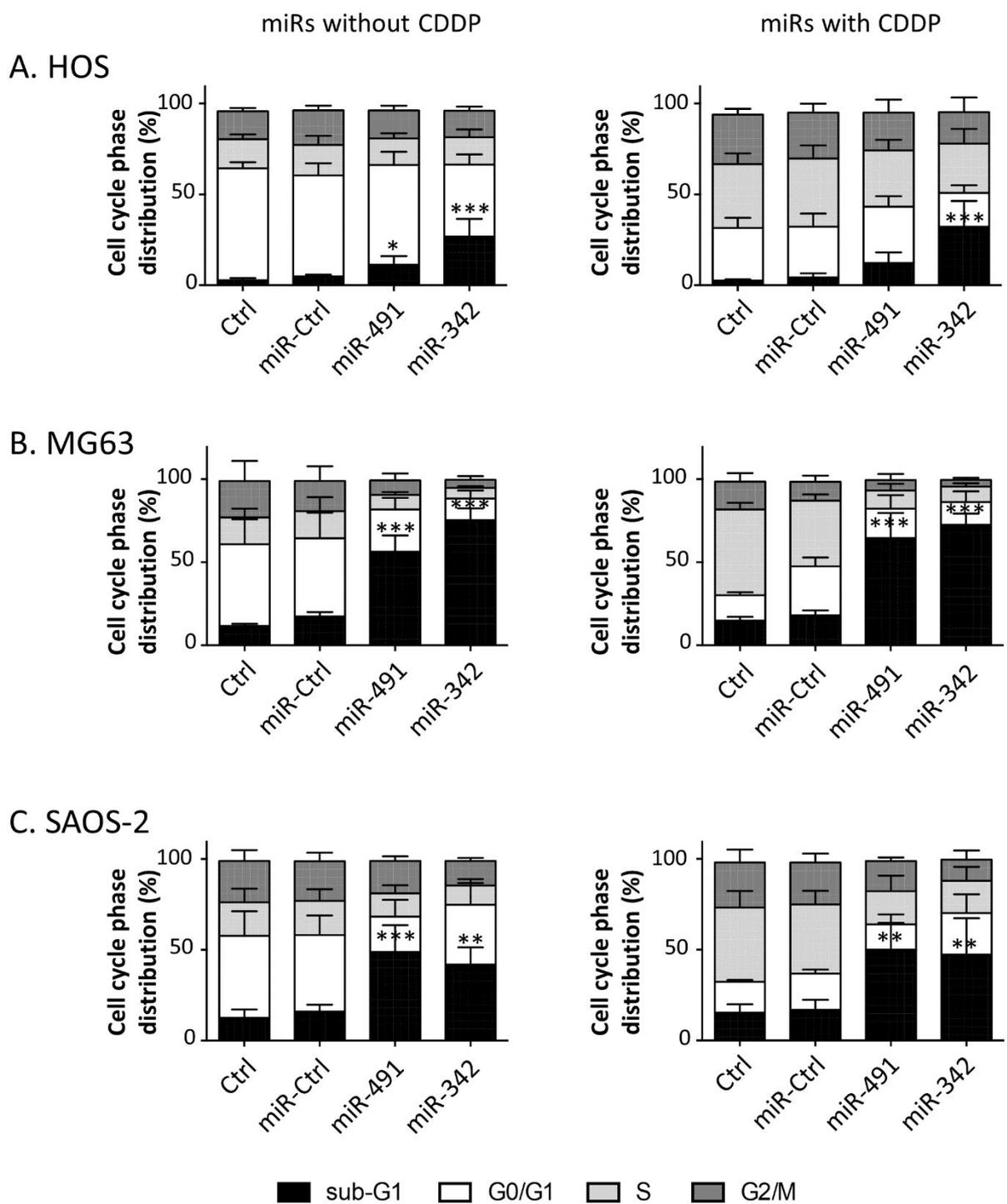
**Figure 2: Analysis of miRNA-induced cytotoxicity on osteosarcoma cell lines.** (A) HOS, (B) MG-63 and (C) SaOS-2 cells were cultured and transfected with miRNAs as described in figure 1. The cytotoxicity of miRNAs was evaluated 72 h post-transfection and expressed as mean of RLU  $\pm$  SD of 4 independent experiments. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

In the HOS cell line, miR-491-5p increased the percentage of sub-G1 events with or without CDDP (by 2.4-fold and 2.9-fold relative to the respective miR-Ctrl (Figure 3A). This effect was significant only with miR-491-5p used alone ( $p < 0.05$ ). MiR-342-5p induced a more significant increase of cell death, by 5.6-fold and 7.5-fold with or without CDDP respectively ( $p < 0.001$ ). The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 4.8%, 11.3% and 26.7% without CDDP, 4.3%, 12.3%, and 32.2% with CDDP, for miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p respectively. Both miRNAs decreased cellular density 72 h post-transfection (Figure S1). Moreover, more cellular debris and condensed and/or fragmented chromatin, typical of apoptotic cells, were observed through fluorescence microscopy on DAPI-stained slides after their transfection.

In MG-63 cells, miR-491-5p and 342-5p induced a significant increase ( $p < 0.001$ ) of the number of sub-G1 events (Figure 3B). For miR-491-5p, we observed a 3.2-fold increase without CDDP and a 3.6-fold increase with CDDP. MiR-342-5p increased cell death by 4.3-fold alone; and by 4-fold in the presence of CDDP. The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 17.4%, 56.4% and 75.3% without CDDP, 18%, 64.6%, and 72.5% with CDDP, for miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p respectively. A decrease in confluency, a high number of cellular debris and apoptotic bodies were observed after the transfection of both miRNAs (Figure S2).

In the SAOS-2 cell line, miR-491-5p enhanced the percentage of sub-G1 events by 3-fold with or without ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  compared to the respective miR-Ctrl) (Figure 3C). MiR-342-5p also increased the number of sub-G1 events for both conditions (by 2.6-fold alone; by 2.8-fold with CDDP;  $p < 0.01$ ). The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 16%, 48.8% and 41.8% without CDDP, 16.9%, 50%, and 47.4% with CDDP, for miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p respectively. This induction of cell death by both miRNAs was supported by microscopic observations at 72 h post-transfection (Figure S3).

Overall, miR-491-5p and miR-342-5p functioned as apoptomiRs in HOS, MG-63 and SaOS-2 osteosarcoma cell lines. These miRNAs provoked cell death of the same magnitude with or without CDDP, suggesting that they were not chemosensitizers to the activity of CDDP.



**Figure 3: Analysis of cytotoxic or chemosensitizing effects of miR-491-5p and miR-342-5p on osteosarcoma cell lines.** (A) HOS, (B) MG-63 and (C) SaOS-2 cells were cultured and transfected with miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p as described in figure 1. Analyses were carried out 72 h post-transfection. Cell cycle phase distribution was analysed by flow cytometry. The histograms represent the analysis of 5 independent experiments for HOS cells and 4 independent experiments for MG-63 and SaOS-2 cells (mean  $\pm$  SD with the different phases of the cycle). Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events, between miR-Ctrl and miRNA-treated cells, were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### **MiR-491-5p and miR-342-5p activate the apoptosis pathway in osteosarcoma cells.**

We next investigated the induction of apoptosis by the 2 miRNAs used alone in the 3 osteosarcoma cell lines. MiR-491-5p and miR-342-5p led to the PARP cleavage in the 3 cell lines, with a better cleavage detected with miR-491-5p compared to miR-342-5p in SaOS-2 cells (Figure 4A). In addition, both miRNAs also enhanced the cleavage of caspase 3 (Figure 4B) and induced the caspase 3/7 activities (Figure 4C), at different levels, depending of the concerned cell line.

In the HOS cell line, western-blot showed that caspase-3 seemed to be more cleaved with miR-342-5p than with miR-491-5p. Real time analysis of caspase 3/7 activity revealed that only miR-342-5p significantly increased caspase 3/7 activity at 72 h post-transfection (by 1.4-fold,  $p < 0.001$ ).

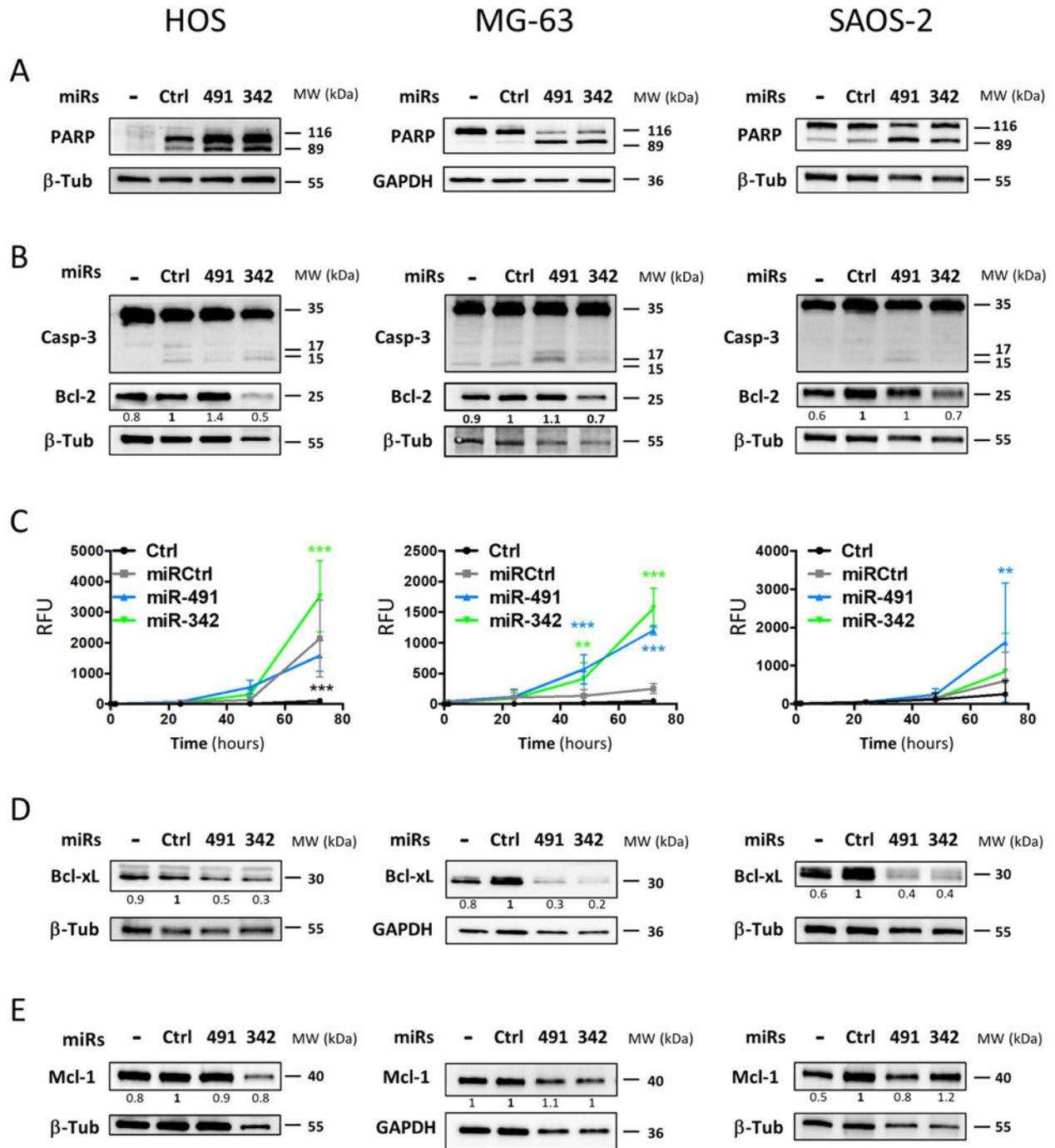
In the MG-63 cell line, we observed a more pronounced cleavage of caspase 3 with miR-491-5p than with miR-342-5p. Both miRNAs induced a significant increase of caspase 3/7 activity, as early as 48 h post-transfection. At 72 h post-transfection, miR-342-5p enhanced caspase 3/7 activity by 6.2-fold ( $p < 0.001$ ) and miR-491-5p by 4.8-fold ( $p < 0.001$ ).

Cleavage of caspase 3 was only weakly detectable by western-blot with miR-491-5p in SAOS-2 cell line. In the same sense, only miR-491-5p significantly increased caspase 3/7 activity at 72 h post-transfection (by 2.7-fold,  $p < 0.01$ ).

Since PARP cleavage by activated caspases and cleavage or activation of caspases 3/7 are characteristics of apoptosis, these results demonstrated that miR-491-5p and miR-342-5p induce apoptosis in osteosarcoma cells. MiR-342-5p would be the best apoptomiR in the HOS cell line, whereas miR-491-5p would be the best one in the SaOS-2 cell line. Both miRNAs were efficient in the MG63 cell line, with a better effect of miR-342-5p. These results are consistent with our previous results on cell death (Figure 3).

Members of the anti-apoptotic Bcl-2 family are predicted targets for both miRNAs. Bcl-XL was validated as their direct target in SW1353 chondrosarcoma cell line in our previous study (Veys *et al.*, submitted). Bcl-2 was also validated as a direct target of miR-342-5p in SW1353 cells. Mcl-1 was also a predicted target for both miRNAs (Veys *et al.*, submitted). We therefore studied their expression to evaluate their involvement in the induction of apoptosis by both miRNAs (Figure 4B, D and E).

Bcl-2 protein expression was only decreased upon miR-342-5p transfection (Figure 4B). The greatest inhibition was observed in the HOS cell line with a 2-fold decrease compared to



**Figure 4: Analysis of the apoptotic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on osteosarcoma cell lines.** In panel A, B, D, and E, HOS, MG63 and SaOS-2 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-491-5p and miR-342-5p. Analyses were carried out 72 h post-transfection. Protein extracts were analysed by western-blotting to evaluate (A) PARP, (B) caspase-3 and Bcl-2, (D) Bcl-xL and (E) Mcl-1 levels versus  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -Tub) or GAPDH loading control. Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to  $\beta$ -tubulin or GAPDH and to the miR-Ctrl. (C) HOS, MG-63 and SaOS-2 cell lines were transfected 24 h after seeding as before. The caspase-3/7 activity was then assessed in real time for 72 h as described in the "Material and Methods" section. The graphs provide the analysis of fluorescence of 4 independent experiments (mean of RFU  $\pm$  SD). The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using two-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

miR-Ctrl. MiR-342-5p downregulated Bcl-2 protein expression in the other two cell lines, but to a lower extent (by 1.4-fold). We did not observe such an inhibition with the miR-491-5p overexpression in the three cell lines, suggesting that Bcl-2 is not a target for this miR.

MiR-491-5p and miR-342-5p decreased Bcl-xL protein expression in the 3 osteosarcoma cell lines (Figure 4D). For miR-491-5p, we observed a 2-fold, 3.3-fold and 2.5-fold decrease compared to miR-Ctrl in HOS, MG-63 and SaOS-2 cells respectively. For miR-342-5p, we observed a 3.3-fold, 5-fold and 2.5-fold decrease in HOS, MG-63 and SaOS-2 cells respectively.

Although Mcl-1 was a predicted target of miR-491-5p and miR-342-5p, both miRNAs did not significantly modulate its protein expression in osteosarcoma cells, with a maximum decrease of 1.2-fold for miR-342-5p in HOS cells and for miR-491-5p in SaOS-2 cells (Figure 4E).

In summary, the inhibition of the expression of Bcl-xL and Bcl-2 could be responsible of the pro-apoptotic effect of miR-342-5p on osteosarcoma cells, and that of Bcl-XL in the pro-apoptotic effect of miR-491-5p.

### **MiR-491-5p and miR-342-5p target *BCL2L1* mRNAs in the HOS osteosarcoma cell line.**

We next checked that miR-491-5p and miR-342-5p effects on Bcl-2 (*BCL2* gene) or Bcl-xL (*BCL2L1*) were induced by direct binding to their respective mRNAs. Thus, we co-transfected, in HOS cells, luciferase reporter vectors containing the 3'UTR sequence of these mRNAs, miR-491-5p or miR-342-5p mimics or their corresponding hairpin inhibitors.

*In silico* analysis identified a potential binding site for miR-342-5p between nucleotides 818 and 824 on BCL2-3'UTR (Figure 5A). Transfection of miR-342-5p decreased the luciferase activity of the reporter vector containing the WT-BCL2-3'UTR by 17% compared to miR-Ctrl (Figure 5B). By contrast, the co-transfection with anti-miR-342-5p increased RLU (by 20%). A mutation in the BCL2-3'UTR binding site prevented the inhibitory effect of miR-342-5p. Nevertheless, the inhibitory effect of miR-342-5p on BCL2-3'UTR was not statistically significant. Therefore, we cannot unambiguously confirm that *BCL2* mRNA is a direct target of miR-342-5p in HOS cells.



We identified 2 putative binding sites for miR-342-5p in *BCL2L1*-3'UTR at positions 679-686 and 1407-1413. Several constructs were generated where these sites were mutated separately (MUT1 and MUT2 respectively) and a construct with both mutations (MUT1/MUT2) (Figure 5C). Transfection of miR-342-5p resulted in a strong decrease in luciferase activity only when co-transfected with WT-*BCL2L1*-3'UTR or MUT2-*BCL2L1*-3'UTR (-76% and -74%,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively; Figure 5D). By contrast, miR-342-5p did not significantly reduce the reporter activity for the MUT1-*BCL2L1*-3'UTR construct and for the double mutant MUT1/MUT2-*BCL2L1*-3'UTR construct. Co-transfection of anti-miR-342-5p led to an increase of the luciferase activity for the WT-*BCL2L1*-3'UTR construct (+17%,  $p < 0.05$ ), and only diminished by 14% ( $p < 0.05$ ) the luciferase activity for the MUT2-*BCL2L1*-3'UTR construct. In conclusion, in HOS cells, miR-342-5p down-regulates Bcl-xL protein expression through preferential and direct binding to the 679-686 region in the 3'UTR of *BCL2L1* mRNA.

Functional binding sites for miR-491-5p have already been identified in the 3'UTR of *BCL2L1* mRNA in other cancer cells (Denoyelle *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2010). As a consequence, in HOS cells, we co-transfected miR-491-5p with WT-*BCL2L1*-3'UTR bearing 3 binding sites for miR-491-5p (Figure 5D). This co-transfection led to a strong decrease in the luciferase activity of the reporter vector (-82% compared to miR-Ctrl,  $p < 0.01$ ). This repression was not obtained with anti-miR-491-5p. Therefore, *BCL2L1* mRNA is also a direct target of miR-491-5p in HOS osteosarcoma cell line.

### **MiR-491-5p and miR-342-5p modulate the expression of numerous proteins related to proliferation or apoptosis.**

In order to further understand the mechanisms underlying the activity of these two miRNAs, we studied the expression of some of their predicted or validated targets. In particular, we investigated some potential targets involved in cell survival or cell death.

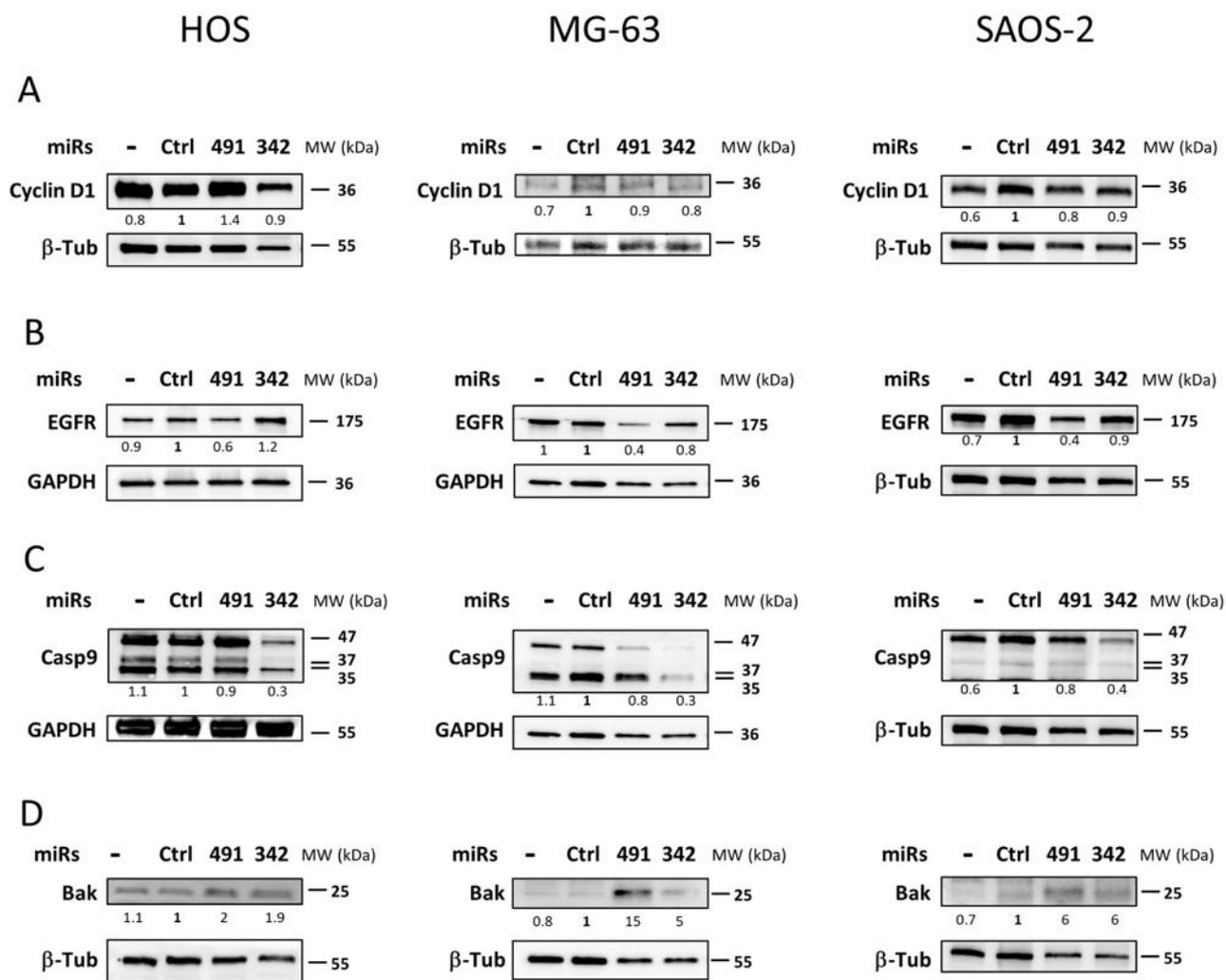
Another study previously validated *CCND1* mRNA as a direct target of miR-342-5p in neuroblastoma (Soriano *et al.*, 2019). Here, transfection of miR-342-5p did not significantly downregulate the expression of Cyclin D1 protein in the three osteosarcoma cell lines (Figure 6A). The inhibition did not exceed 1.2-fold in MG-63 cells. *CCND1* mRNA is also a predicted target of miR-491-5p (Veys *et al.*, submitted), but we failed to demonstrate any inhibition of its expression by this miR in the three osteosarcoma cell lines.

*EGFR* mRNA was identified as a direct target of miR-491-5p in ovarian cancer and glioblastoma cells (Denoyelle *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) and also as a predicted target of miR-342-5p (Veys *et al.*, submitted). MiR-491-5p inhibited EGFR protein expression by 1.6-fold in HOS cells and by 2.5-fold in MG-63 and SaOS-2 cells (Figure 6B). By contrast, miR-342-5p had no significant inhibitory effect on EGFR protein expression in any of the three osteosarcoma cell lines.

Caspase-9 was already characterized as a direct target of miR-342-5p in cardiomyocytes (Hou *et al.*, 2019). In the three osteosarcoma cell lines, miR-342-5p induced a strong decrease in pro-caspase-9 protein expression (47kDa; by 3.3-fold in HOS and MG-63 cells and by 2.5-fold in SaOS-2 cells) (Figure 6C). This decrease was not due to the induction of large cleaved caspase-9 fragments (37 and 35 kDa). MiR-491-5p had no effect on pro-caspase-9 protein expression and also did not induce protein cleavage.

The pro-apoptotic protein Bak participates to mitochondrial outer membrane permeabilization and subsequent induction of apoptosis. *BAK1* mRNA was shown to be a predicted target of miR-491-5p and miR-342-5p (Veys *et al.*, submitted). Surprisingly, Bak protein was positively regulated by both miRNAs in all the three osteosarcoma cell lines (Figure 6D). For miR-491-5p, we observed a 2-fold, 15-fold and 6-fold increase compared to miR-Ctrl in HOS, MG-63 and SaOS-2 cells respectively. For miR-342-5p, we detected a 1.9-fold, 5-fold and 6-fold upregulation in HOS, MG-63 and SaOS-2 cells respectively.

In summary, miR-491-5p inhibited the EGFR expression, a protein involved in cell survival, and it enhanced the expression of Bak pro-apoptotic protein in osteosarcoma cells. Mir-342-5p also increased Bak protein expression, but at the same time it decreased pro-caspase 9 protein expression, a caspase involved in the apoptosis pathway.



**Figure 6: Analysis of some survival/death proteins affected by miR-491-5p and miR-342-5p in osteosarcoma cell lines.** HOS, MG-63 and SaOS-2 were cultured and transfected as described in figure 4. Analyses were carried out 72 h post-transfection. Protein extracts were analysed by western-blotting to evaluate the levels of (A) Cyclin D1, (B) EGFR, (C) Caspase-9, (D) Bak versus β-tubulin (β-Tub) or GAPDH loading control. Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to β-tubulin or GAPDH, and to miR-Ctrl.

## Discussion

Osteosarcomas represent the most frequent forms of bone sarcomas with an annual prevalence of 1/100000. Nowadays, osteosarcomas are generally well-treated tumors due to the effectiveness of combination chemotherapy associated with surgery. However, for patients with metastases or recurrence, the survival rate is much lower. As a consequence, the treatment seems to have a low successful rate and remained unchanged for many years. It is therefore becoming essential to develop new tools for the diagnosis and therapy of this type of tumor.

The use of therapeutic miRNAs offers the perspective of a multi-target approach and can help to discover new therapeutic targets for clinical applications (Palmini *et al.*, 2017; Botti *et al.*, 2019; Qi-Cai Li *et al.*, 2017). Using a high-throughput screening of a 1200 miRNAs library, we have found 5 miRNAs capable of decreasing cell proliferation in the SW1353 chondrosarcoma cell line (Veys *et al.*, submitted). We have validated the cytotoxic and apoptotic effects of miR-491-5p and miR-342-5p, but not of miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p, on 3 chondrosarcoma cell lines. Nevertheless, except miR-541-5p, these miRNAs have already been studied in other types of cancer. MiR-625-5p and miR-149-5p have been previously reported to have tumor suppressive roles in various cancers, alone or combined with different chemotherapeutic agents (Gong *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2018; He *et al.*, 2018). We have therefore tested these 5 miRNAs on three osteosarcoma cell lines.

For miR-541-5p, miR-625-5p and miR-149-5p, we did not observe any significant cytotoxic effect after 72 h incubation. However, for the miR-625-5p, we detected a slight increase in the cytotoxic effect on the 3 cell lines, as well as a significant downregulation in the metabolic activity of the SaOS-2 cell line. It is possible that a longer incubation period may be required to observe cell death effects for these miRNAs. In our previous study performed on chondrosarcoma cell lines (Veys *et al.*, submitted), only miR-491-5p and miR-342-5p clearly proved to have significant antimetabolic and cytotoxic effects, like in this present study on osteosarcoma. We then studied the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on the cell cycle. Both miRNAs enhanced the number of sub-G1 events, reflected by the presence of cellular debris in the three cell lines, a hallmark of apoptosis in the 3 cell lines. MiR-342-5p was the most effective inducer of cell death on the HOS cell line. In MG-63 cells, both miRNAs induced an equivalent increase in the number of sub-G1 events, with a slightly better effect of miR-342-5p, whereas it was the opposite in SaOS-2 cells.

Eventhough we did not previously demonstrate chemosensitizing effects of miR-491-5p and miR-342-5p on chondrosarcoma cells, we evaluated their chemosensitizing effect to

CDDP on the 3 osteosarcoma cell lines. Neither of two miRNAs was able to increase CDDP sensitivity. However, one study demonstrated that the overexpression of miR-491-5p was able to sensitize osteosarcoma cell lines (U2OS and MG-63) to cisplatin (Wang *et al.*, 2017). In our study, we used a sublethal dose of CDDP (1.65  $\mu$ M) compared to 10  $\mu$ M in the study of Wang *et al.* (2017). In addition, we incubated the cells only for 24 h with CDDP versus 48 h (Wang *et al.*, 2017). We used the same sublethal dose of CDDP to induce a cell cycle arrest in the S and/or G2/M phases for the three cell lines. In the literature, the IC<sub>50</sub> values for the 3 cell lines are very variable, depending on the incubation time and the viability tests used (from 1.65 to 26  $\mu$ M for MG63 cells, 4.9  $\mu$ M to 46  $\mu$ M for SaOS2 cells, and 3.5  $\mu$ M to 78  $\mu$ M for HOS cells) (Wang *et al.*, 2019; Rimann *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2019). MG63 seemed to be the least resistant.

The analysis of the expression of proteins such as PARP and Caspase-3 allowed us to confirm that apoptosis was implied in the miRNA-induced cell death. MiR-491-5p and miR-342-5p induced PARP cleavage in the 3 osteosarcoma cell lines. We also revealed an enhancement of caspase-3/7 activity, although at different levels, with both miRNAs. Since miR-Ctrl also increased caspase 3/7 activity in HOS and SaOS-2 cells, the results appeared to be less significant than in MG63 cells. We also found a cleavage of PARP for the miR-Ctrl condition in western-blot with HOS and SaOS-2 cells. However, we clearly demonstrated that miR-342-5p would be the best apoptosis inducer in the HOS cell line, whereas miR-491-5p would be the best inducer in the SaOS-2 cell line. Both miRNAs significantly induced caspase-3/7 activity in the MG63 cell line, with a better effect of miR-342-5p. These results correlated with the data obtained by flow cytometry.

MiR-491-5p has already been studied in osteosarcoma. This miRNA was downregulated in osteosarcoma tissues and cell lines (Yin *et al.*, 2017). The level of miR491-5p was decreased in the serum of osteosarcoma patients and correlated with increased metastasis, chemoresistance and thus lower survival rate (Wang *et al.*, 2017). The overexpression of miR-491-5p has been shown to restore the chemosensitivity of osteosarcoma cells to CDDP and to directly target *CRYAB* encoding Crystallin alpha B, a protein that inhibits apoptosis and contributes to intracellular architecture (Wang *et al.*, 2017). This study showed that miR-491-5p exerted its tumor-suppressing activity by directly targeting *CRYAB*. Other direct targets of miR-491-5p have been identified in osteosarcoma cells, such as *FOXP4* and *PKM2* (Pyruvate Kinase Muscle 2) (Yin *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Their inhibition increased apoptosis or suppressed cell proliferation of osteosarcoma cells. Nevertheless, the

mechanisms involved in the expression of miR-491-5p and its biological role in osteosarcomas still need to be explored.

In cancer, constitutive activation of EGFR is associated with the cell proliferation, survival and migration. Expression of EGFR was frequently observed in high-grade osteosarcomas. EGFR would not be a major driver for osteosarcomas cell growth, but would contribute to starvation and chemotherapy resistance (Sevelda *et al.*, 2015). *EGFR* mRNA is a validated target of miR-491-5p in other types of cancers, such as glioblastoma and ovarian carcinoma (Li *et al.*, 2015; Denoyelle *et al.*, 2014). As in chondrosarcoma cell lines (Veys *et al.*, submitted), miR-491-5p decreased the level of EGFR expression in osteosarcoma cell lines, which could contribute to decrease cell proliferation rate.

Several studies have shown that overexpression of miR-491-5p directly inhibits the expression of Bcl-xL protein in various cancers (Nakano *et al.*, 2010; Denoyelle *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2012). We also demonstrated this direct inhibition in SW1353 chondrosarcoma cells (Veys *et al.*, submitted). In the present study, we confirmed that miR-491-5p induced cell death in the HOS cell line by directly targeting *BCL2L1* mRNA and consequently decreased Bcl-xL protein expression. By contrast, although the anti-apoptotic member Mcl-1 could be a potential target of miR-491-5p, this latter did not influence its protein expression in the 3 osteosarcoma cell lines investigated. On the other hand, overexpression of miR-491-5p increased the expression level of the pro-apoptotic protein Bak. Inhibition of Bcl-xL expression, and overexpression of Bak, could therefore contribute to its apoptotic activity in osteosarcoma cells.

Only one study investigated the effect of miR-342-5p in osteosarcomas. It directly targeted the *Wnt7b* oncogene and inhibited tumor growth, migration, invasion and restored cell sensitivity to doxorubicin (Liu *et al.*, 2019). However, in other studies, including ours, miR-342-5p has been shown to be a tumor suppressor in neuroblastoma, colon cancers and chondrosarcoma (Soriano *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2016; Veys *et al.*, submitted). Although *EGFR* and *MCL1* mRNA could be potential targets of miR-342-5p, our data did not show significant inhibition of their protein expression in the three osteosarcoma cell lines analyzed. *CCND1* mRNA is a validated target of miR-342-5p in neuroblastoma (Soriano *et al.*, 2019) but, as in chondrosarcoma cell lines (Veys *et al.*, submitted), we did not observe a downregulation in its expression in any of the 3 osteosarcoma cell lines.

Bcl-2 protein expression was decreased (from 1.4 to 2-fold) by miR-342-5p in the 3 osteosarcoma cell lines. In our previous study on chondrosarcoma, we validated *BCL2* mRNA as a direct target of miR-342-5p (Veys *et al.*, submitted) but, here, we did not validate *BCL2* as

a real direct target of miR-342-5p. Transfection of miR-342-5p decreased by 1.2-fold the luciferase activity of the WT-BCL2-3'UTR vector in HOS cells, but it was not statistically significant. We hypothesised that pro-apoptotic effects of miR-342-5p would rather be linked to Bcl-XL inhibition rather than Bcl2 inhibition in osteosarcoma cells. Indeed, miR-342-5p downregulated Bcl-XL protein expression from 2.5- to 5-fold in osteosarcoma cell lines and significantly decreased the activity of the WT-BCL2L1-3'UTR vector by 4.2-fold in HOS cells. Like on neuroblastoma (Soriano *et al.*, 2019), we validated *BCL-XL* as a direct target of miR-342-5p. Moreover, as in our previous study on chondrosarcoma (Veys *et al.*, submitted), we clearly also identified its binding site at position 679-686 of BCL2L1-3'UTR. Overexpression of Bak could also participate to the apoptotic effects of miR-342-5p.

We showed that miR-342-5p also had anti-apoptotic effects on the 3 osteosarcoma cell lines, by reducing pro-caspase 9 protein expression (approximately by-3-fold). We did not observe an induction of caspase-9 cleavage by both miRNAs but, unlike other caspases, caspase-9 showed complete activity in its uncleaved form (Ping Li *et al.*, 2017). These results are consistent with our previous study on chondrosarcoma cells (Veys *et al.*, submitted) and with another study on cardiomyocytes. Despite some anti-apoptotic potential, miR-342-5p clearly induced apoptosis in osteosarcoma cells demonstrated by the induction of cleaved PARP and caspase-3/-7 activity.

In osteosarcomas, overexpression of Bcl-2 and Bcl-xL has been reported to be associated with poor prognosis (Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Metastatic or recurrent osteosarcomas have a high expression of Bcl-xL correlated with a low probability of survival, mainly due to resistance to chemotherapy (Wang *et al.*, 2010). This correlation between Bcl-xL expression and chemoresistance in cancers is very common and has been demonstrated in a panel of 60 cell lines (Amundson *et al.*, 2000). Additionally, a study showed that pharmacological inhibition of Bcl-xL improves the sensitivity of osteosarcomas to doxorubicin (Baranski *et al.*, 2015). In our present study, miR-491-5p and miR-342-5p targeted *BCL2L1* mRNA and induced apoptosis. We thus confirmed the potential of Bcl-xL as a relevant therapeutic target in osteosarcomas.

## **Conclusion**

Our study demonstrated the antiproliferative, antimetabolic and cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p on three osteosarcoma cell lines, and also their pro-apoptotic effects. Unfortunately, they failed to induce chemosensitivity to cisplatin in our experimental conditions, as observed in impedancemetry experiments. We identified Bcl-xL as a direct target of miR-491-5p and miR-342-5p. Moreover, miR-491-5p inhibited the protein expression of EGFR and increased that of Bak. MiR-342-5p also increased the protein expression of Bak, decreased that of Bcl-2, but at the same time decreased pro-caspase 9 expression. Overall, this study highlighted the functional and essential role of Bcl-xL in osteosarcoma cells and confirmed the therapeutic potential to target Bcl-xL in osteosarcomas.

## Material and methods

### Cell culture

The osteosarcoma cell lines HOS, MG-63 and SaOS-2 were kindly provided by Dr F. Rédini (INSERM UMR 1238 Phy-Os, Nantes, France). The osteosarcoma cell line HOS (ATCC® CRL-1543<sup>TM</sup>) was grown in high glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM, Biowest) supplemented with 10 % Fetal Calf Serum (FCS) (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin (0.25 µg/ml) (Eurobio).

The osteosarcoma cell line MG-63 (ATCC® CRL-1427<sup>TM</sup>) was cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Biowest) supplemented with 10 % FCS (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/ml) (Eurobio).

The osteosarcoma cell line SaOS-2 (ATCC® HTB-85<sup>TM</sup>) was grown in DMEM/ Nutrient Mixture F-12 ham (DMEM: HAM's F12, Biowest) supplemented with 5 % FCS (Eurobio), 2 mM L-Glutamine (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/ml) (Eurobio).

All cells were certified mycoplasma-free after PCR analysis. They were maintained in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### Drugs and miRNAs

Cisplatin (CDDP) was purchased from Mylan (Merk, France). A Sublethal dose of CDDP (0.5 µg/ml or 1.65 µM) was used during the transfection of miRNA for HOS, MG-63 and SaOS-2 cells. All miRNA mimics were purchased from Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). MiRNA-Control (miR-Ctrl, MIMAT0000039), was based on *C. elegans* miRNA sequence that has been confirmed to have minimal sequence identify with human miRNAs. Human miRNA hsa-miR-491-5p (MIMAT0002807, noted miR-491), hsa-miR-342-5p (miR-342, MIMAT0004694), hsa-miR-541-5p (miR-541, MIMAT0004919), hsa-miR-625-5p (miR-625, MIMAT0003294), hsa-miR-149-5p (miR-149, MIMAT0000450) were also used in this study. MiRNA hairpin inhibitors were purchased from Dharmacon: hsa-miRNA-491-5p-hairpin inhibitor (anti-miR-491, IH-300751-06), hsa-miRNA-342-5p-hairpin inhibitor (anti-

miR-342, IH-301083-02) and miRNA hairpin inhibitor Negative Control (anti-miR-ctrl, IN-001005-01).

### **Transfection of miRNA and CDDP treatment**

Exponentially growing HOS, MG-63 and SaOS-2 cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cell lines were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miRNA mimics using INTERFERin™ (Polyplus-Transfection) according to the manufacturer's instructions. An additional CDDP treatment was realized 48 h post-transfection with sublethal doses of CDDP.

### **Metabolic activity analysis**

HOS, MG-63 and SaOS-2 cells were seeded onto 96-well microplates at a density of  $3.2 \times 10^3$  cells/well in triplicates. Transfection of 20 nM miRNA was performed 24 h later with or without an additional CDDP treatment 48 h post-transfection, as described above. Cellular metabolic activity was estimated 72 h post-transfection using the XTT assay (Roche) as previously described (Veys *et al.*, submitted). Optical density (OD) was measured at 450 nm and 600 nm with an absorbance microplate reader (Spark 10M, Tecan) after 1 h of incubation.

### **Cytotoxicity assay**

In parallel with metabolic activity analysis, a bioluminescence cytotoxicity assay kit (Interchim) was used to evaluate miRNA-induced cytotoxicity 72 h post-transfection. This kit is based on the measurement of adenylate kinase (AK) rapidly released into the culture medium upon damage to the plasma membrane. AK detection was carried out in the supernatant, as previously described (Veys *et al.*, submitted). The emitted light was measured with a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan) and expressed as relative luciferase units (RLU), reflecting the number of dead cells.

### **Cell cycle analysis**

Adherent cells were harvested by trypsinization. The supernatant, containing the detached cells, and the trypsinized cells were pooled, centrifuged (1400 rpm, 10 min), rinsed with PBS, fixed in 70% ethanol, and stored at -20°C until analysis. Fixed cells were then centrifuged (3000

rpm, 10 min) and rinsed with PBS to remove all traces of ethanol. After centrifugation (2000 rpm, 5 min), the cells were resuspended and incubated for 30 min in a PBS solution containing 20 µg/ml propidium iodide (Sigma Aldrich) and 100 µg/ml RNase (Fisher Scientifics). Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry using the Cytoflex S Flow Cytometer (Beckman Coulter). Data were computed with the Cytexpert® acquisition software (Beckman Coulter).

### **Analysis of nuclear morphology**

Both detached and adherent cells were pooled and applied to a poly-L-lysine-coated glass slide by cyto-centrifugation at 850 rpm for 5 min (Cytospin, Thermo Scientific). They were fixed with a solution of ethanol/chloroform/acetic acid (6: 3: 1) before DNA staining. Slides were then treated with the UltraCruz™ Mounting Medium with DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The observations were made on a fluorescence microscope (Nikon eclipse Ti).

### **Western-blotting**

Both detached and adherent cells were centrifuged at 1400 rpm for 5 min, washed with PBS and stored at -20°C until analysis. Total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer as previously described (Legendre *et al.*, 2003). Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (BioRad). Then, 15 µg of total proteins were separated in 10% or 12% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, BioRad) using the Trans Blot®Turbo™ Transfer system (BioRad). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween (TBST) for 1 h. Then, protein level were analyzed by immunoblotting with antibodies from Cell Signaling Technology (Ozyme), according to the manufacturer's instructions: EGFR (4267), PARP (9542), Caspase-9 (9502), Bcl-xL (2764), Cyclin D1 (2878), and Bak (3814). We also used Mcl-1 (S-19), GAPDH (FL-335) and β-Tubulin (D-10) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, and the Bcl-2 (M0887) antibody from DAKO. After the incubation period, membranes were washed in TBST, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson Immunoresearch). Signals were visualized with a chemiluminescence imaging system (ChemiDoc™ Touch imaging system, BioRad). Each immunoblot is representative of at least

three distinct experiments. Protein expression was estimated by quantifying the density of immunoblots bands adjusted to  $\beta$ -Tubulin or GAPDH signals (ImageLab® software).

### **Luciferase miRNA target reporter assay**

Targetscan 7.2 (<http://www.targetscan.org>) was used for miRNA target prediction. Wild type (WT) and mutant (MUT) vectors of BCL2L1-3'UTR and BCL2-3'UTR were purchased from GeneCopoeia (USA). The full length BCL2L1-3'UTR (217HmiT108616-MT05; 1489 bp) and of the proximal part of BCL2-3'UTR (217HmiT016211a; 2761 bp) were inserted downstream of a Gaussia luciferase (GLUC) reporter gene in the pEZMX-MT05 vector. This vector also carries the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene for normalization of GLUC luciferase activity, as a function of transfection efficiency. HOS cells were seeded at  $4 \times 10^4$  cells/well (triplicates) in a 24-well plate the day before transfection. The cells were co-transfected with 20 nM miRNA mimic or miRNA hairpin inhibitor and with BCL2-3'UTR vector (1 ng/ $\mu$ L) using jetOPTIMUS™ DNA transfection reagent (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). BCL2L1-3'UTR vector (2 ng/ $\mu$ l) and miRNAs were co-transfected with Endofectin transfection reagent (Genecopoeia, USA). Culture medium was collected 48 h later to measure luciferase activities with the secrete-pair dual luminescence assay kit (Genecopoeia) and a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan). Luciferase activities were expressed as relative luciferase units (RLU) corresponding to GLUC/SEAP ratio.

### **Real-time detection of caspase-3/7 mediated apoptosis**

Caspase-3/7 activity was assessed using the Incucyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (Essen BioScience). This reagent couples the activated caspase-3/7 recognition motif (DEVD) to NucView™488, a DNA intercalating dye. Thus, caspase-3/7 activity correlates with an increase of the green fluorescence in the nuclei. Briefly, HOS, MG63 and SaOS-2 cells seeded at  $3.2 \times 10^3$  cells/well were grown in 96-well plates. They were monitored after transfection of 20 nM miRNA during 72 h in the Incucyte® S3 acquiring images (objective x 10) every 3 hours in 2 separate regions per well. Each experiment was done in triplicate and analyzed with the Incucyte® software.

## **Statistical analysis**

All experiments were repeated at least three times. Values are reported as means  $\pm$  SD. Statistical significances of the mean of at least three independent experiments were assessed by one-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Dunnett's test, or two-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Sidak's test. Alternatively, two-tailed unpaired student's t test with Welch's correction was used to analyse statistical differences within representative experiments performed in triplicate. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 7 software. P-values of less than 0.05 were considered significant: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , and \* $p < 0.05$ .

## **List of abbreviations**

Bak: Bcl-2 homologous antagonist-killer; Bcl-2: B-cell Lymphoma-2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; CDDP: Cisplatin; EGFR: Epidermal growth factor receptor; MiRNA: microRNA; FCS: Fetal calf serum; Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1; OD: Optical density; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; RLU: Relative luciferase unit.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

The data sets used and analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding**

This work was supported by the “Regional Council of Normandy” through an “Emergence” program (to C.D., L.P. and P.G.) and a “RIN Recherche OncoThera” program (to L.P. and P.G.), by 2 grants to F.L. from the “Ligue Contre le Cancer” of Normandy confederation (Orne and Seine Maritime committees), by the French Government and the European Community (ERDF (European Regional Development Funds)) to P.G. These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

## **Authors’ Contributions**

Conceptualization: P.G., C.D., L.P., C.V., F.L.; Methodology: C.V., F.R., P.G., F.L.; Formal analysis: C.V., M.J., F.L.; Validation: C.V., F.L., P.G.; Investigation: C.V., M.J., F.L.; Resources: P.G., C.D., L.P., F.R. ; Writing - Original Draft Preparation: C.V., F.L.; Writing - Review & Editing: F.L., P.G.; Visualization: C.V., M.J., F.L., C.D., P.G.; Supervision: F.L., P.G.; Project Administration: F.L., P.G.; Funding Acquisition: P.G., C.D., L.P., F.L.

All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments**

C.V. is a recipient of a PhD scholarship from the French Ministry for Higher Education and Research. M.J. was supported by a PhD fellowship co-financed by the GIS CENTAURE (Consortium for Equine Research) and the Regional Council of Normandy.

## **References**

Amundson S.A., Myers T.G., Scudiero D., Kitada S., Reed J.C., Fornace A.J., 2000. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 60(21):6101–10.

Baranski Z., de Jong Y., Ilkova T., Peterse E.F.P., Cleton-Jansen A.-M., van de Water B., Hogendoorn P.C.W., Bovée J.V.M.G., Danen E.H.J., 2015. Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget* 6(34):36113–36125.

Bartel D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173(1):20–51.

Bartel D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–33.

Botti G., Giordano A., Feroce F., Chiara A.R., Cantile M., 2019. Noncoding RNAs as circulating biomarkers in osteosarcoma patients. *J. Cell. Physiol.* 234(11):19249–19255.

Chen T., Li Y., Cao W., Liu Y., 2018. miR-491-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting PKM2. *Oncol. Lett.* 16(5):6472–6478.

Collins M., Wilhelm M., Conyers R., Herschtal A., Whelan J., Bielack S., Kager L., Kühne T., Sydes M., Gelderblom H., Ferrari S., Picci P., Smeland S., Eriksson M., Petrilli A.S., Bleyer A., Thomas D.M., 2013. Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 31(18):2303–12.

Dela Cruz F.S., 2013. Cancer Stem Cells in Pediatric Sarcomas. *Front. Oncol.* 3.

Denoyelle C., Lambert B., Meryet-Figuière M., Vigneron N., Brotin E., Lecerf C., Abeilard E., Giffard F., Louis M.-H., Gauduchon P., Juin P., Poulain L., 2014. miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis.* 5(10):e1445.

Evola F.R., Costarella L., Pavone V., Caff G., Cannavò L., Sessa A., Avondo S., Sessa G., 2017. Biomarkers of Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Ewing Sarcoma. *Front. Pharmacol.* 8.

Gebert L.F.R., MacRae I.J., 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20(1):21–37.

Gong X., Xu B., Zi L., Chen X., 2019. miR-625 reverses multidrug resistance in gastric cancer cells by directly targeting ALDH1A1. *Cancer Manag. Res.* 11:6615–6624.

Guo R., Wang Y., Shi W.-Y., Liu B., Hou S.-Q., Liu L., 2012. MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. *Molecules* 17(12):14733–47.

He Y., Yu D., Zhu L., Zhong S., Zhao J., Tang J., 2018. miR-149 in Human Cancer: A Systemic Review. *J. Cancer* 9(2):375–388.

Hou Z., Qin X., Hu Y., Zhang X., Li G., Wu J., Li J., Sha J., Chen J., Xia J., Wang L., Gao F., 2019. Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection. *Circ. Res.* 124(9):1386–1400.

Kansara M., Teng M.W., Smyth M.J., Thomas D.M., 2014. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* 14(11):722–35.

Legendre F., Dudhia J., Pujol J.-P., Bogdanowicz P., 2003. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J. Biol. Chem.* 278(5):2903–12.

Li P., Zhou L., Zhao T., Liu X., Zhang P., Liu Y., Zheng X., Li Q., 2017. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 8(14):23996–24008.

Li Q.-C., Xu H., Wang X., Wang T., Wu J., 2017. miR-34a increases cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells in vitro through up-regulation of c-Myc and Bim signal. *Cancer Biomarkers* 21(1):135–144.

Li X., Liu Y., Granberg K.J., Wang Q., Moore L.M., Ji P., Gumin J., Sulman E.P., Calin G.A., Haapasalo H., Nykter M., Shmulevich I., Fuller G.N., Lang F.F., Zhang W., 2015. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene* 34(13):1619–1628.

Liu Q., Wang Z., Zhou X., Tang M., Tan W., Sun T., Deng Y., 2019. miR-342-5p inhibits osteosarcoma cell growth, migration, invasion, and sensitivity to Doxorubicin through targeting Wnt7b. *Cell Cycle* 18(23):3325–3336.

Longhi A., Errani C., De Paolis M., Mercuri M., Bacci G., 2006. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat. Rev.* 32(6):423–36.

Meyers P.A., Healey J.H., Chou A.J., Wexler L.H., Merola P.R., Morris C.D., Laquaglia M.P., Kellick M.G., Abramson S.J., Gorlick R., 2011. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* 117(8):1736–1744.

Mirabello L., Troisi R.J., Savage S.A., 2009. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* 115(7):1531–1543.

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

Nakano H., Miyazawa T., Kinoshita K., Yamada Y., Yoshida T., 2010. Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int. J. cancer* 127(5):1072–80.

Palmini G., Marini F., Brandi M.L., 2017. What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma? *Molecules* 22(3).

Qi X, Yu XJ, Wang XM, Song TN, Zhang J, Guo XZ, Li GJ, Shao M. Knockdown of KCNQ1OT1 Suppresses Cell Invasion and Sensitizes Osteosarcoma Cells to CDDP by Upregulating DNMT1-Mediated Kcnq1 Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Sep 6;17:804-818.

Rimann M, Laternser S, Gvozdenovic A, Muff R, Fuchs B, Kelm JM, Graf-Hausner U. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *J Biotechnol*. 2014 Nov 10;189:129-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.005. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25234575.

Sevelde F., Mayr L., Kubista B., Lötsch D., van Schoonhoven S., Windhager R., Pirker C., Micksche M., Berger W., 2015. EGFR is not a major driver for osteosarcoma cell growth in vitro but contributes to starvation and chemotherapy resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 34:134.

Soriano A., Masanas M., Boloix A., Masiá N., París-Coderch L., Piskareva O., Jiménez C., Henrich K.-O., Roma J., Westermann F., Stallings R.L., Sábado C., de Toledo J.S., Santamaria A., Gallego S., Segura M.F., 2019. Functional high-throughput screening reveals miR-323a-5p and miR-342-5p as new tumor-suppressive microRNA for neuroblastoma. *Cell. Mol. Life Sci*. 76(11):2231–2243.

Sun L., Zhai R., Zhang L., Zhao S., 2018. MicroRNA-149 suppresses the proliferation and increases the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting X-linked inhibitor of apoptosis. *Oncol. Lett*. 15(5):7328–7334.

Veys C., Benmoussa A., Contentin R., Duchemin A, Brotin E., Lafont J., Saintigny Y., Poulain L., Denoyelle C., Demoor M., Legendre F. and Galéra P. Tumor suppressive role of miR-342-5p in human chondrosarcoma cells and 3D organoids. Submitted to *Cell&Bioscience*.

Wang J., Liu S., Shi J., Li J., Wang S., Liu H., Zhao S., Duan K., Pan X., Yi Z., 2019. The Role of miRNA in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Osteosarcoma. *Cancer Biother*.

Radiopharm. 34(10):605–613.

Wang S.-N., Luo S., Liu C., Piao Z., Gou W., Wang Y., Guan W., Li Q., Zou H., Yang Z.-Z., Wang D., Wang Y., Xu M., Jin H., Xu C.-X., 2017. miR-491 Inhibits Osteosarcoma Lung Metastasis and Chemoresistance by Targeting  $\alpha$ B-crystallin. *Mol. Ther.* 25(9):2140–2149.

Wang Z.-X., Yang J.-S., Pan X., Wang J.-R., Li J., Yin Y.-M., De W., 2010. Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone* 47(2):445–54.

Wang D, Qian G, Wang J, Wang T, Zhang L, Yang P, Lin F. Visfatin is involved in the cisplatin resistance of osteosarcoma cells via upregulation of Snail and Zeb1. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(7):999-1006.

Wu X., Cai Z., Lou L., Zhu Y., 2012. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* 36(2):212–6.

Yang H., Li Q., Niu J., Li B., Jiang D., Wan Z., Yang Q., Jiang F., Wei P., Bai S., 2016. microRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget* 7(3):2709–20.

Yin Z., Ding H., He E., Chen J., Li M., 2017. Up-regulation of microRNA-491-5p suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP4 in human osteosarcoma. *Cell Prolif.* 50(1):e12308.

**Additional figure legends:**

**Supplementary figure S1: Characterisation of the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on HOS cells.** HOS cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 3. The treatment with CDDP (0.5 µg/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was obtained after DAPI staining. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 5 independent experiments.

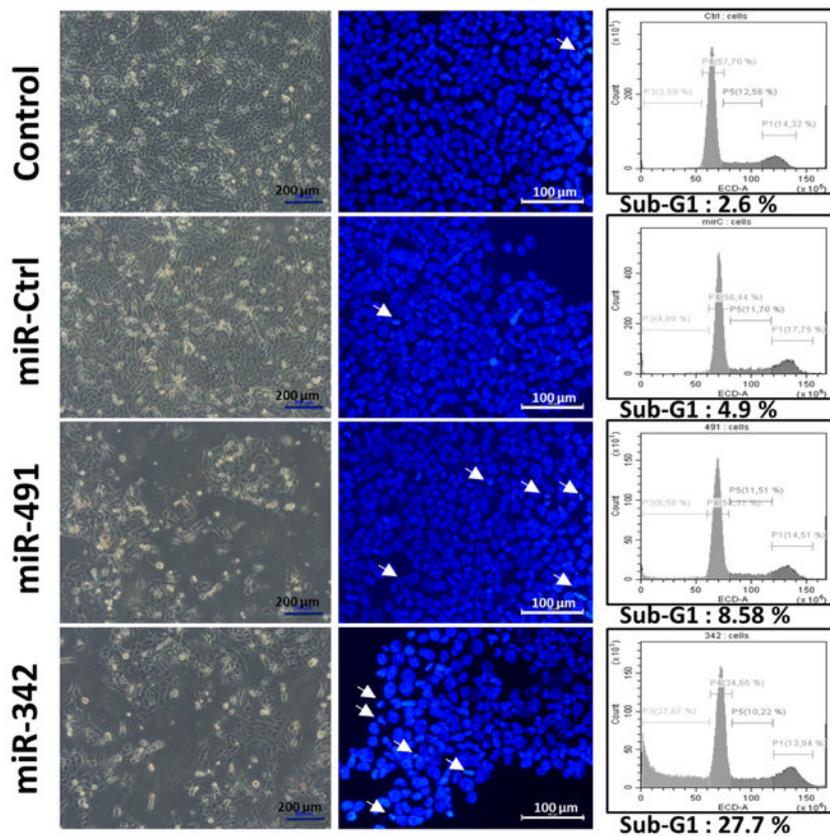
**Supplementary figure S2: Characterisation of the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on MG-63 cells.** MG-63 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 3. The treatment with CDDP (0.5 µg/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was obtained after DAPI staining. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 4 independent experiments.

**Supplementary figure S3: Characterisation of the effects of miR-491-5p and miR-342-5p on SaOS-2 cells.** SaOS-2 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 3. The treatment with CDDP (0.5 µg/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was obtained after DAPI staining. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 4 independent experiments.

Figure S1

miRs without CDDP

A



miRs with CDDP

B

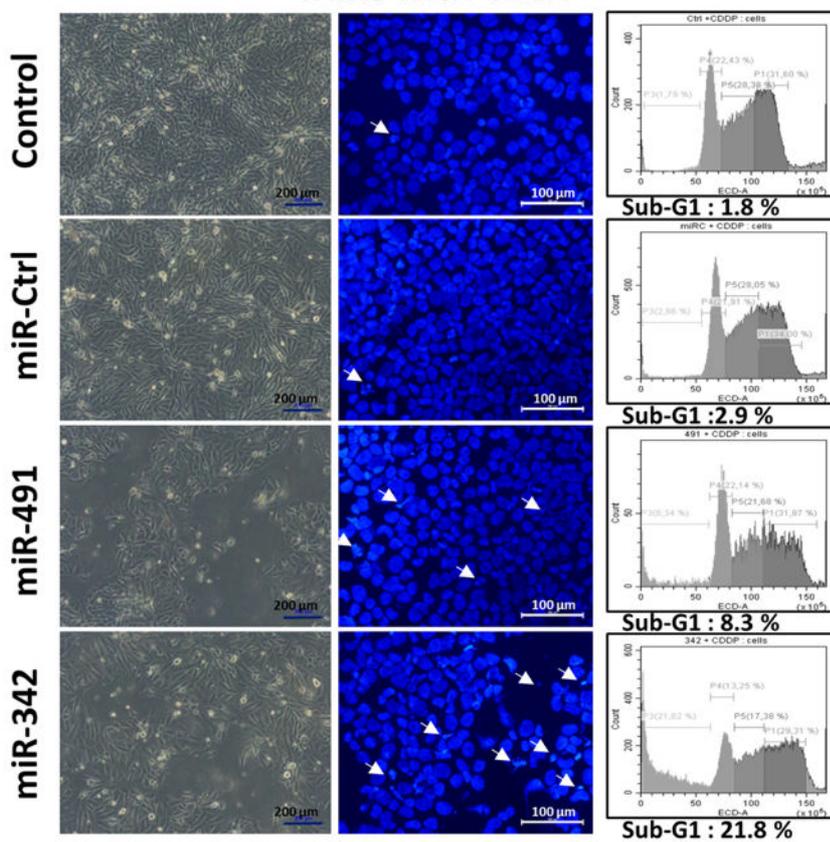
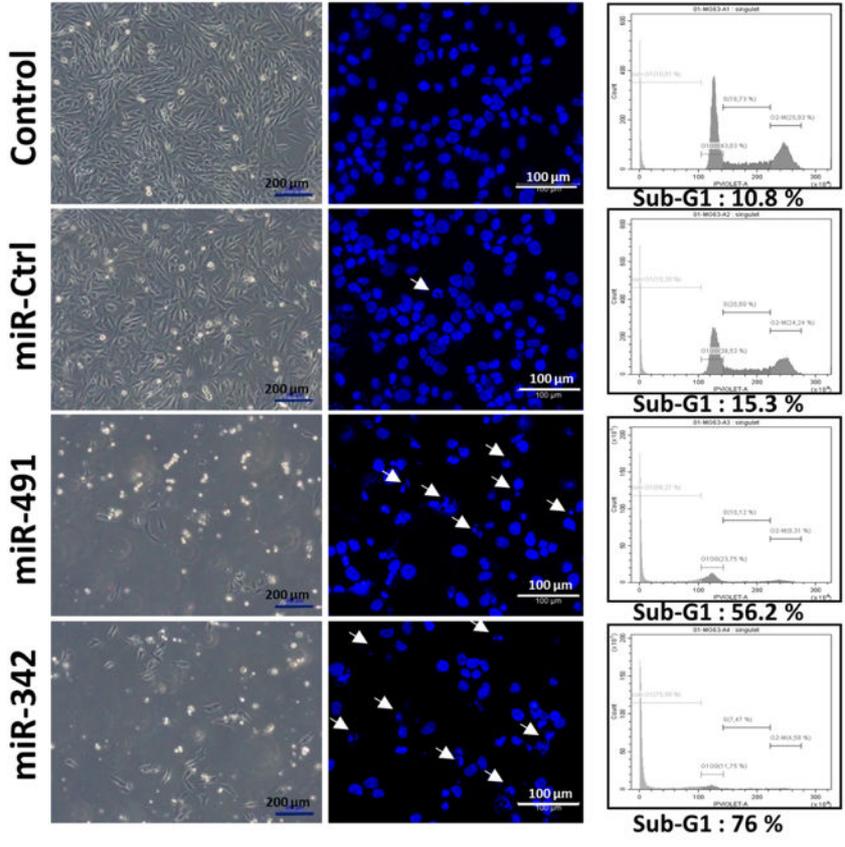


Figure S2

miRs without CDDP

A



miRs with CDDP

B

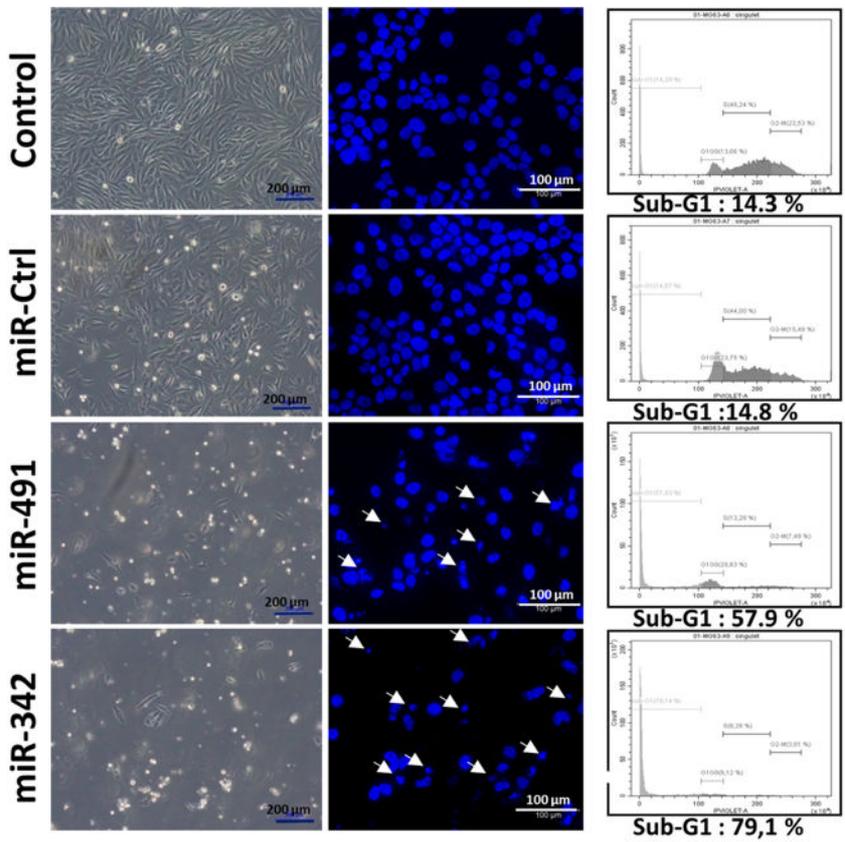
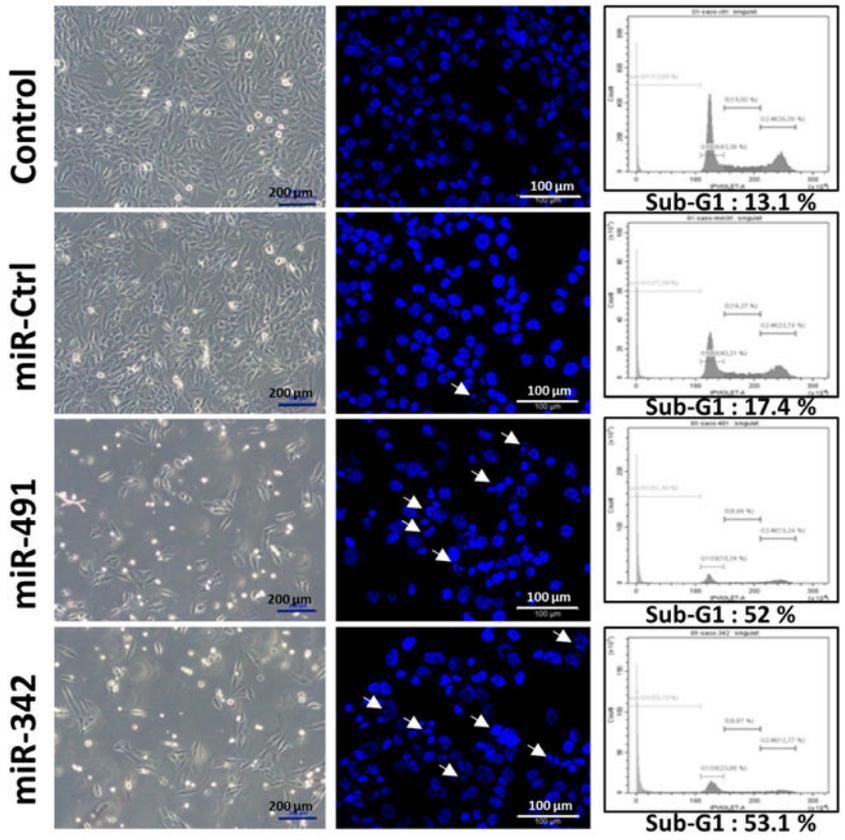


Figure S3

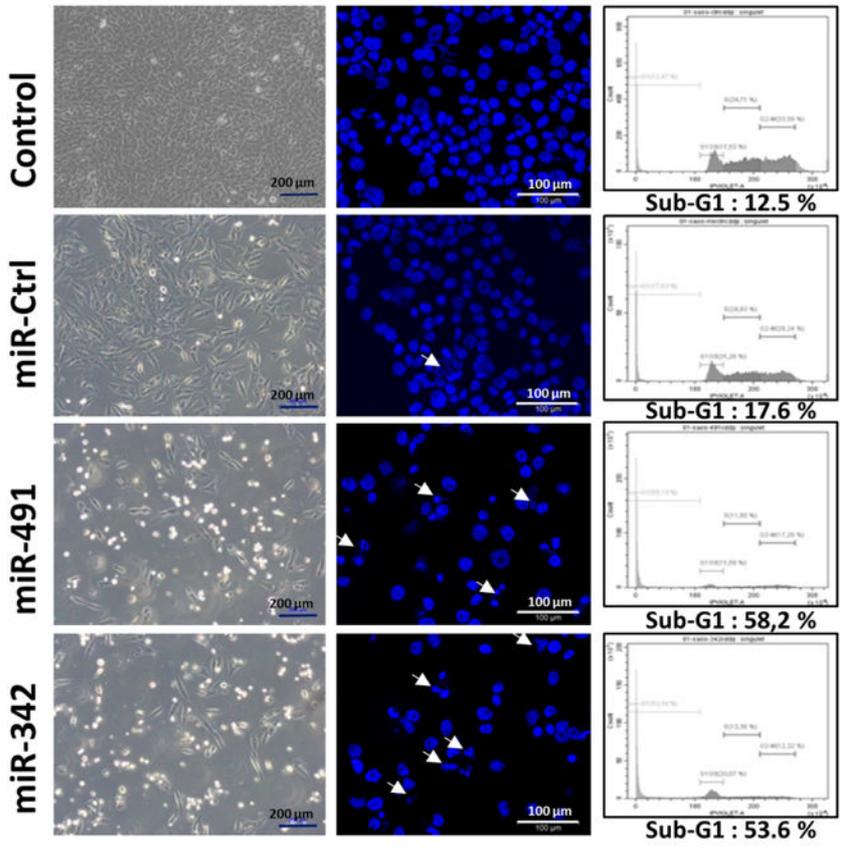
miRs without CDDP

A



miRs with CDDP

B



### III. Principaux résultats et conclusions de l'étude

Dans cette étude, nous avons utilisé les mêmes miRNAs que dans notre première étude : le miR-491-5p, le miR-342-5p, le miR-541-5p, le miR-625-5p et le miR-149-5p. Comme pour le CS, nous avons confirmé uniquement **les effets cytotoxiques du miR-491-5p et du miR-342-5p, et ceci sur les 3 lignées d'OS. Ces 2 miRNAs n'ont pas eu non plus d'effet chimiosensibilisateur vis-à-vis du CDDP dans nos conditions expérimentales chez l'OS.**

L'étude par western-blot du niveau d'expression de certaines protéines nous a permis de mettre en évidence que ces miRNAs induisaient la mort des cellules par apoptose. En effet, le miR-491-5p a induit un clivage de la PARP et de la caspase-3 sur les 3 lignées cellulaires. Le miR-342-5p a également induit un clivage de la PARP sur les 3 lignées, mais n'a pas engendré de clivage de la caspase-3 sur la lignée SaOS-2. Néanmoins, son effet cytotoxique a été validé sur les 3 lignées. Ensuite, tout comme dans notre étude sur le CS, **le miR-491-5p a entraîné une diminution de l'expression des protéines Bcl-xL et EGFR, avec une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak dans les 3 lignées cellulaires d'OS.** Nous avons également confirmé que Bcl-xL était une cible directe du miR-491-5p dans l'OS.

Pour le miR-342-5p, nous avons également observé dans nos 3 lignées d'OS, comme dans les lignées de CS, une inhibition de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et de la Caspase-9. Nous avons confirmé que Bcl-xL était une cible directe du miR-342-5p. Le site de fixation du miR-342-5p a été le même que dans le CS : il se fixe préférentiellement sur la séquence 679-686 de la région 3'UTR de l'ARNm de *Bcl-xL*. En revanche, Bcl-2 n'a pas été validé comme cible directe du miR-342-5p dans l'OS, malgré l'inhibition de l'expression de la protéine Bcl-2 et la validation antérieure de cette cible chez le CS. Ce résultat va donc à l'encontre de celui obtenu sur les cellules de CS. Par ailleurs, l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak a été augmentée par la transfection du miR-342-5p, ce qui n'avait pas non plus été observé sur les lignées de CS. Nous avons donc conclu que **le ciblage de l'ARNm de Bcl-2 par le miR-342-5p ne semble pas essentiel à l'effet apoptotique du miR-342-5p dans l'OS. Le miR-342-5p inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et favorise l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak, pour induire la mort des cellules par apoptose sur les lignées cellulaires d'OS.** Nous avons donc démontré qu'une cible validée dans un type tumoral ne signifiait pas forcément que celle-ci le soit dans un autre type tumoral, démontrant une spécificité d'action du miR-342-5p en fonction de la tumeur.

## C. Rôle suppresseur de tumeur du miR-4270 dans les cellules d'ostéosarcome humain

Cet article sera soumis pour publication après l'acceptation du premier et deuxième article dans International Journal of Molecular Science (IF : 4,556). La liste des auteurs est susceptible d'être modifiée après l'ajout d'une expérience complémentaire et n'est donc pas indiquée.

### I. Contexte de la publication

Un des volets de ma thèse visait à identifier de nouveaux miRNAs potentiellement cytotoxiques à partir du criblage haut débit effectué sur la lignée SW1353 de CS. Nous avons donc identifié, à partir du criblage haut débit (technologie xCELLigence), d'autres miRNAs potentiellement cytotoxiques chez les cellules SW1353, avec les mêmes critères de sélection que dans notre première étude. Les miRs-16-1-3p, -646, -3667-3p et -4270 ont ainsi été sélectionnés. Ils ciblaient potentiellement des ARNm de gènes impliqués dans l'apoptose et la prolifération d'après l'analyse *in silico*. L'objectif était donc de valider leur effet cytotoxique sur nos lignées de CS et d'OS, pour ensuite étudier les voies de signalisation cellulaire régulées par ces miRNAs, puis enfin de valider leurs cibles. Cependant, nous n'avons pas validé l'effet cytotoxique potentiel de ces miRNAs observé sur la lignée SW1353 lors du criblage haut débit. Nous n'avons pas non plus observé d'effet chimiosensibilisateur vis-à-vis du CDDP, utilisé à une dose sub-léthale, sur la lignée SW1353. De ce fait, nous avons testé ces miRNAs sur la lignée d'OS HOS. Ayant mis en évidence des effets anti-prolifératifs (test XTT) ou cytotoxiques (test de cytotoxicité) de certains miRNAs sur la lignée d'OS HOS, nous avons étendu leur étude à 2 autres lignées d'OS MG63 et SaOS-2. Cet article présente une analyse fonctionnelle individuelle de ces miRNAs sur les lignées SW1353, HOS, MG63 et SAOS-2, avec un focus sur le miR-4270 qui s'est révélé le plus cytotoxique sur 2 lignées d'OS. Le miR-342-5p a été utilisé tout au long de l'étude comme contrôle positif, puisque nous avons précédemment validé ses effets suppresseurs de tumeurs pour l'ensemble de ces lignées. En parallèle, les effets chimiosensibilisateurs des miRNAs ont également été évalués. Enfin, nous avons analysé les mécanismes d'apoptose induits par le miR-4270, en ciblant notre étude sur les membres de la famille Bcl-2.

## II. Publication n°3

### **MiR-4270 acts as a tumor suppressor through direct targeting Bcl-xL in human osteosarcoma cell**

**Clément Veys, et al.**

Normandie University, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000, Caen, France.

Departement of Genetics, Normandy Center for Genomic and Personalized Medicine, Caen University Hospital, 14000, Caen France

Research Center of the UHC Sainte-Justine and Departement of Nutrition, Université de Montréal, Montréal Quebec, Canada, H3T 1C54

Normandie University, UNICAEN, ImpedenCELL Platform, Federative Structure 4206 ICORE, 14000, Caen, France

INSERM UMR 1238 Phy-Os "Bone sarcomas and remodeling of calcified tissues", Nantes University, F-44035 Nantes, France.

Normandie University, UNICAEN, Inserm U1086 ANTICIPE, Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancer (BioTICLA), 14000, Caen, France.

UNICANCER, Comprehensive Cancer Center F. Baclesse, 14000, Caen, France.

## Abstract

**Background:** Chondrosarcomas and osteosarcomas are malignant bone tumors. These tumors have a poor prognosis when unresectable or metastasized. Moreover, radiotherapy and chemotherapy are sometimes ineffective. MiRNAs represent an interesting therapeutic approach.

**Methods:** High throughput functional screening by impedancemetry performed in SW1353 chondrosarcoma cell line, identified at least 4 miRNAs with a potential antiproliferative effect. Individual functional validations were then performed in SW1353 cells under normoxia and hypoxia, and in 3 osteosarcoma cell lines under normoxia to evaluate tumor-specific miRNA effect in the physiopathological *in vivo* microenvironnement. First, the metabolic and cytotoxic effects of miRNAs were evaluated in comparison with miR-342-5p, an apoptomiR already identified on osteosarcoma and chondrosarcoma cells. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. Western-blot and luciferase reporter assays were carried out in order to delineate the underlying mechanisms of action of the cytotoxic miRNAs.

**Results:** The cytotoxic effect of 4 selected miRNAs was not confirmed on SW1353 cells, but we unambiguously revealed that miR-4270 had a potent cytotoxic effect on two osteosarcoma cell lines. In addition, like miR-342-5p, miR-4270 induced apoptosis. We have identified, for the first time, Bcl-xL as a direct target of miR-4270. MiR-4270 also decreased the expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1, and increased the expression of the proapoptotic protein Bak.

**Conclusion:** The present results demonstrated the tumor suppressive activity of miR-4270 in osteosarcoma cells, by regulating the expression of Bcl-2 family proteins.

**Keywords:** Osteosarcoma, chondrosarcoma, miR-4270, miR-342-5p, apoptosis, Bcl-xL.

## Introduction

Bone sarcomas are relatively rare tumors. Among the various bone sarcomas listed by the World Health Organization (WHO), the two main ones are osteosarcomas and chondrosarcomas. Osteosarcoma is the most common type of bone sarcoma (Longhi *et al.*, 2006; Mirabello *et al.*, 2009). It develops in the great majority of cases on the long bones of the limbs: the lower end of the femur, the upper end of the tibia or the upper end of the humerus (Kansara *et al.*, 2014). This is an aggressive cancer that mainly affects children and young adults. These tumor cells are characterized by the synthesis of an osteoid matrix. Chondrosarcoma is the second most common bone sarcoma. It develops preferentially on flat bones (pelvis, scapula, rib, spine) and long bones (femur, tibia, humerus) (Gelderblom *et al.*, 2008; Nazeri *et al.*, 2018). This sarcoma affects adults after the age of 40 years. This tumor is characterized by the formation of an extracellular cartilage matrix in a hypoxic environment (Bové *et al.*, 2010).

In current treatments, osteosarcomas are the most curable sarcomas with a good prognosis for long-term survival. Neoadjuvant chemotherapy including cisplatin, doxorubicin and methotrexate coupled with surgery is the preferred therapy for this type of tumor (Collins *et al.*, 2013; Meyers *et al.*, 2011). However, for people with unresectable metastases or older people, the results present a poor prognosis (Dela Cruz, 2013). For chondrosarcomas, only surgery is efficient. Indeed, chondrosarcomas are resistant to chemotherapy and radiotherapy (Onishi *et al.*, 2011). Overall, new therapeutic strategies are absolutely needed for the treatment of these tumors.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of about 20-25 nucleotides. They are post-transcriptional regulators of mRNAs. They function as inhibitors of the translation or they favor the degradation of the mRNAs when they anneal to mRNAs through complementary base pairing (Bartel, 2018). A miRNA can regulate the expression of several hundred different genes, and a gene can be targeted by several hundred of different miRNAs. In the recent years, miRNAs have emerged as key regulators within complex networks of targets that we have not yet fully elucidated (Bartel, 2009; Gebert & MacRae, 2019). MiRNAs play an essential role in many physiological processes, but also in many pathological conditions, particularly in the progression of cancers, including bone sarcomas (Palmini *et al.*, 2017; Yoshitaka *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). Different miRNAs could be used as diagnostics or prognostics biomarkers, but could also allow the discovery of new therapeutic targets in bone sarcoma (Palmini *et al.*, 2017; Botti *et al.*, 2019; Pu *et al.*, 2019; Jeong & Kim, 2018). Many metabolic pathways

regulated by miRNAs, such as survival, growth, angiogenesis or chemosensitivity have been identified in bone sarcomas. However, few studies have focused on the effects of miRNAs directly targeting anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in bone sarcomas. However, several studies have reported the interesting therapeutic potential to target these proteins for the treatment of bone sarcomas. The overexpression of Bcl-2 and Bcl-xL is often associated with a poor prognosis and are partly responsible for the chemoresistance of the cells (Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; van Oosterwijk *et al.*, 2012; de Jong *et al.*, 2016; de Jong *et al.*, 2018). A study has shown that pharmacological inhibition of Bcl-xL improves the sensitivity of osteosarcoma to doxorubicin (Baranski *et al.*, 2015). Furthermore, we previously showed that the direct inhibition of Bcl-xL by miR-491-5p and miR-342-5p induced apoptosis on osteosarcoma and chondrosarcoma cell lines (Veys *et al.*, submitted; Veys *et al.*, submitted). MiR-342-5p also directly inhibited the expression of Bcl-2 according to the cell line evaluated. In this study, using a high-throughput miRNA screening and miRNA target prediction, we selected 4 miRNAs that could induce apoptosis in SW1553 chondrosarcoma cells by targeting *BCL2*, *BCL2L1* or *MCL1* mRNAs. We subsequently performed an individual and functional study with miR-16-1-3p, miR-646, miR-3667-3p and miR-4270. MiR-342-5p was used as a positive control as its tumor suppressive effects have already been validated in chondrosarcoma and osteosarcoma cells (Veys *et al.*, submitted; Veys *et al.*, submitted). For SW1353 chondrosarcoma cell line, the potential cytotoxic and chemosensitizing effects of miRNAs were studied in normoxia and hypoxia, since hypoxia is more representative of the *in situ* physiopathological microenvironment of the tumor (Kubo *et al.*, 2008). None of the newly selected miRNAs caused cytotoxic effects on SW1353 cells. By contrast, miR-4270 had cytotoxic effects and induced cell death by apoptosis on two of the three osteosarcoma cell lines, suggesting a specific effect depending of the cell type. Using western-blot and luciferase reporter assays, we demonstrated that miR-4270 directly targeted *BCL2L1* mRNA. Moreover, miR-4270 decreased the expression of Mcl-1 at the protein level, whereas it increased that of Bak.

## Results

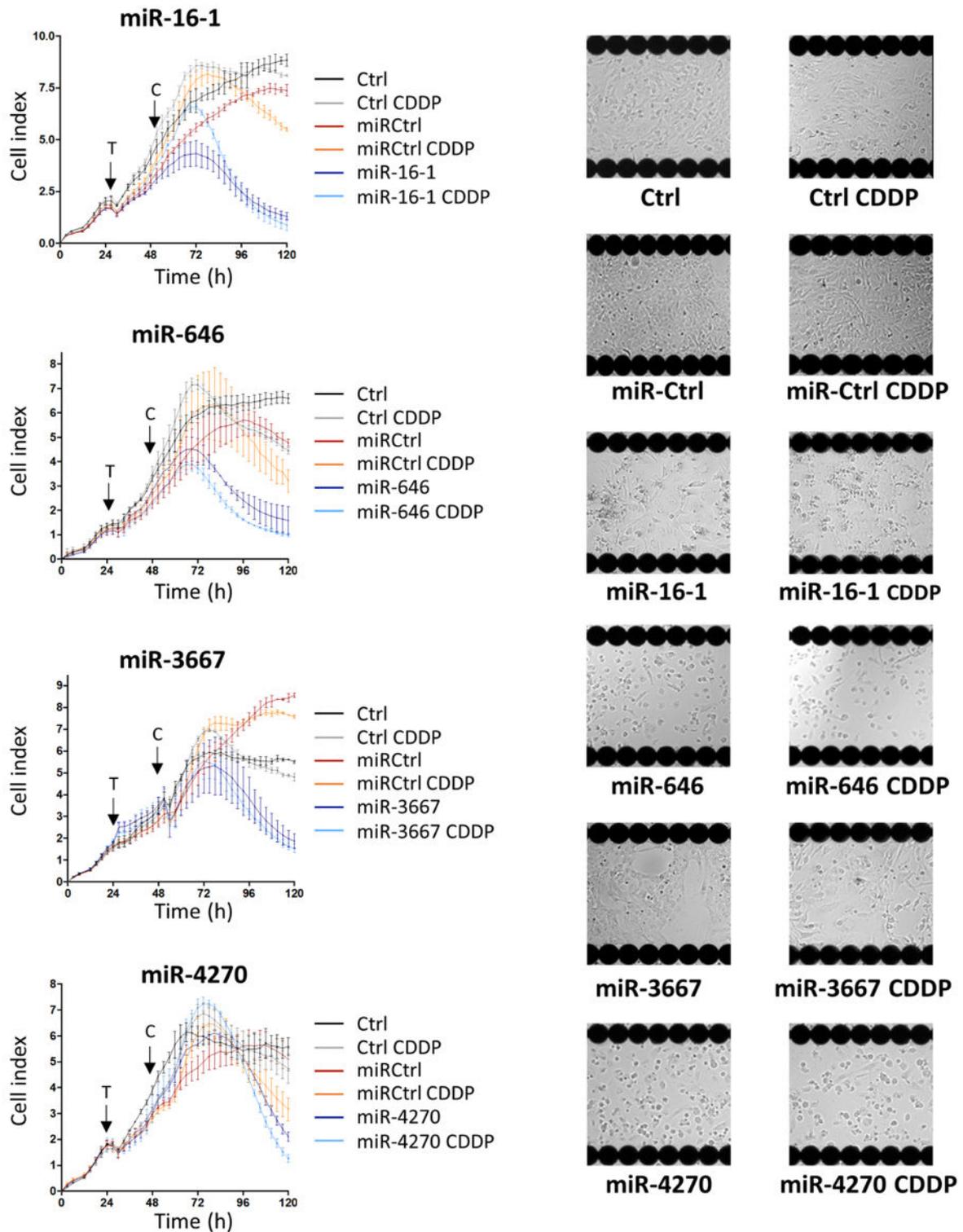
### **Identification of antiproliferative miRNAs by a high-throughput screening on SW1353 chondrosarcoma cell line.**

We performed a functional high-throughput screening using a human library of 1200 miRNAs mimics on the SW1353 chondrosarcoma cell line. The continuous measurement of impedance allowed to analyze the dynamic behavior of the cells transfected with miRNAs in the presence or absence of cisplatin (CDDP) treatment. The effect of each miRNA was compared with that of the miR-ctrl. Three criteria were used to select the most effective cytotoxic miRNAs (the shape of the curve, the area under the curve and the cell index at the end of the experiment). In addition, morphological observation of the cells provided additional information for the final selection of miRNAs. Finally, among all these miRNAs, we selected 4 miRNAs with potential efficient effects on cell proliferation/attachment (Figure 1).

MiR-16-1-3p decreased the cell index from approximately 60 h post-transfection until the end of the experiment (5.7-fold decrease compared to miR-Ctrl, 120 h after seeding, i.e. 96 h after transfection,  $p < 0.001$  by unpaired Student's t test). In the presence of a sublethal dose of CDDP, the decrease of cell index with the miR-16-1-3p was delayed at the same level than without CDDP 120 h after plating the cells ( $p < 0.001$ ). Microscopic observations of the cells 120 h after seeding confirmed a decrease of the proliferation with miR-16-1-3p, combined or not with CDDP. MiR-16-1-3p had antiproliferative effects on SW1353 cells without chemosensitizing effects.

MiR-646 also decreased the cell index from 48 h post-transfection until the end of the experiment (3-fold relative to miR-Ctrl, 120 h after seeding,  $p < 0.05$ ). When miR-646 was combined with CDDP, the decrease was by 3.2-fold (relative to miR-Ctrl + CDDP, 120 h after seeding,  $p < 0.05$ ), suggesting no significant sensitization to CDDP. Moreover, miR-646- and miR-646/CDDP-treated cells showed a similar great reduction of confluence compared to their respective miR-Ctrl. Therefore, miR-646 had only anti-proliferative effects on SW1353 cells.

In the same way, the transfection of miR-3667-3p resulted in a decrease of the cell index by 4.7-fold at the end of the experiment with or without CDDP ( $p < 0.001$ , relative to respective miR-Ctrl). The cell attachment and the cellular density were also decreased compared to respective miR-Ctrl. MiR-3667-3p also appeared to have only antiproliferative effects on SW1353 cells.



**Figure 1: Identification of miRNAs with potential antiproliferative and chemosensitizing effects by high-throughput screening.** SW1533 cells were seeded in triplicate onto 96-well E-plates VIEW. They were grown for 24 h before transfection (arrow surmounted by a T) with 20 nM of miR-Ctrl, miR-16-1-3p, miR-646, miR-3667-3p and miR-4270. The cells were additionally treated or not with 1  $\mu$ g/ml of CDDP 24 h post-transfection (arrow surmounted by a C). Each condition was performed in triplicate. In the left part: Real time growth curves were monitored with the xCELLigence System. Impedance was recorded every 3 h during 120 h. Cell index profiles of one experiment per miRNA, with mean  $\pm$  SD, are shown. In the right part: Endpoint morphological analysis of the cells was done 120 h after seeding with the Cellvista Imaging system. CDDP: cisplatin, Ctrl: control.

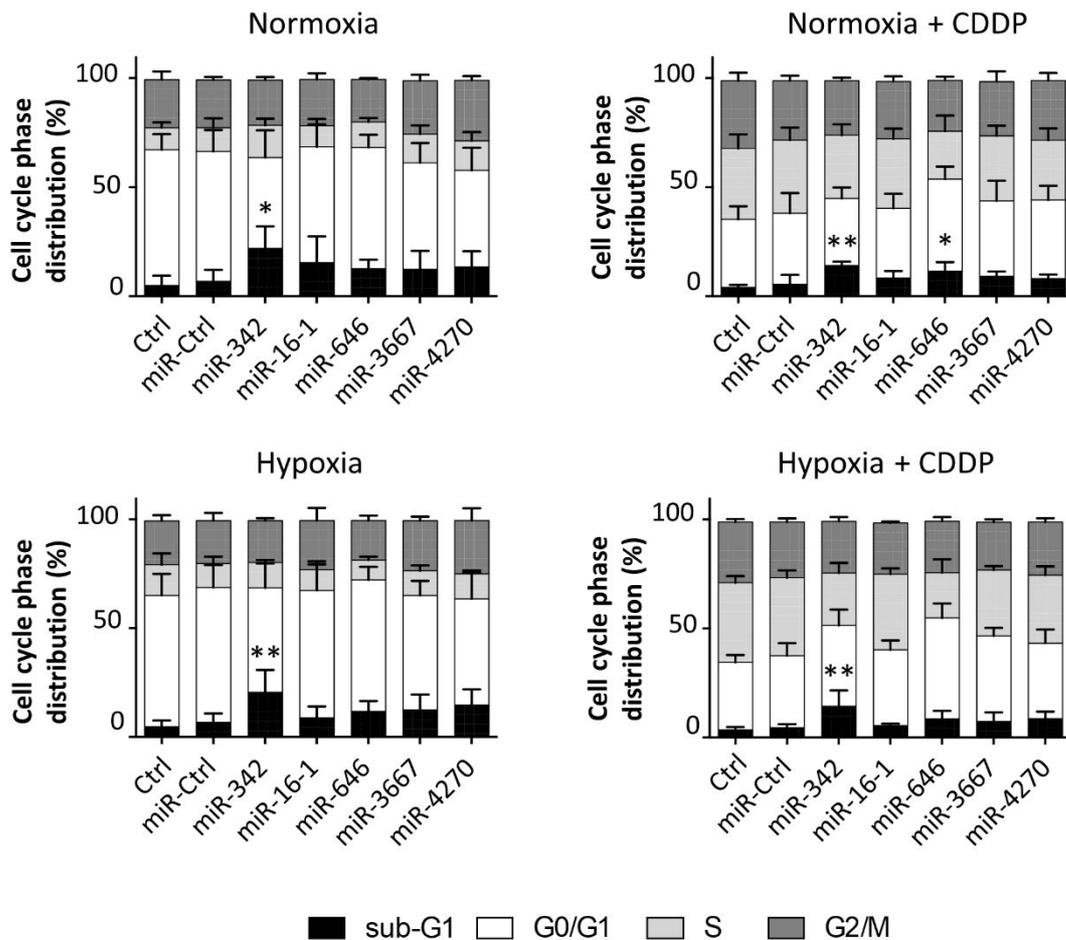
Finally, miR-4270 also diminished the cell index, but its effects were delayed compared to others miRNAs, with an effect observed only from approximately 72 h post-transfection. At the end of the experiment, miR-4270 decreased the cell index by 2.5-fold with or without CDDP ( $p < 0.01$  compared to miR-Ctrl and  $p < 0.05$  compared to miR-Ctrl/CDDP, at 120 h after seeding). Cell confluency was also decreased by at least 50% with or without CDDP suggesting no chemosensitizing effect of this miRNA. Therefore, miR-4270 had only antiproliferative effects on SW1353 chondrosarcoma cells.

**Individual functional analysis of miRNAs did not confirm induction of cell death in SW1353 chondrosarcoma cell line.**

Next, we realized a functional analysis with these 4 miRNAs and with miR-342-5p, used as a positive control, at 72 h post-transfection on SW1353 cells cultured under normoxia and hypoxia. We also investigated the potential chemosensitizing effects of the miRNAs with a sublethal exposure to CDDP 48 h after their transfection in the same manner as in figure 1.

The studies of metabolic activity of SW1353 cells and of the cytotoxicity of miRNAs showed the best anti-metabolic and cytotoxic effects for miR-342-5p and no relevant effect of others miRNAs, except with the miR-16-1-3p and the miR-646 under hypoxia with CDDP revealing possibly a chemosensitizing action (Figure S1). Nevertheless, such an effect was not further confirmed, since both these latter miRs failed to induce cytotoxicity on SW1353 cells in hypoxia with or without CDDP (Figure S1 B).

We also analyzed cell cycle progression using flow cytometry (Figure 2). None of miRNAs induced cell cycle blockade of SW1353 cells. The treatment with a sublethal dose of CDDP increased the percentage of events in the S and G2/M phases at the expense of the G0/G1 phase. Only miR-342-5p increased the number of cells in the sub-G1 phase, in the 4 conditions of culture (approximately of 3-fold,  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$  relative to respective miR-Ctrl). The proportions of the cells in the sub-G1 phase for miR-Ctrl and miR-342-5p respectively were: 6.8% and 21.9% without CDDP under normoxia; 5.5% and 14% with CDDP under normoxia; 6.6% and 20.5% without CDDP under hypoxia; 4.4% and 14.4% with CDDP under hypoxia. Microscopic observations at 72 h post-transfection supported the induction of cell death only by miR-342-5p, with a decrease in confluency and an increase of cellular debris or apoptotic bodies observed through fluorescence microscopy on DAPI-stained slides (Figure S2 and data not shown). MiR-646 significantly increased the percentage of sub-G1 events by 2-fold ( $p < 0.05$  relative to miR-Ctrl/CDDP treated cells) only under normoxia in the presence of CDDP (Figure 2). For all miRNAs, the miRNAs-induced increases in the sub-G1 peaks were comparable with or without CDDP, suggesting no chemosensitizing effect.



**Figure 2: Analysis of cytotoxic or chemosensitizing effects of miRNAs on SW1353 chondrosarcoma cell line.** SW1353 cells were cultured under normoxia or hypoxia. They were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-342-5p, miR-16-1-3p, miR-646, miR-3667-3p and miR-4270. The treatment with CDDP (1  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry 72 h post-transfection. The histograms represent the analysis of at least 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD) with the different phases of the cycle. Statistically significant differences in the percentage of sub-G1 events, between miR-Ctrl and miRNA-treated cells, were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

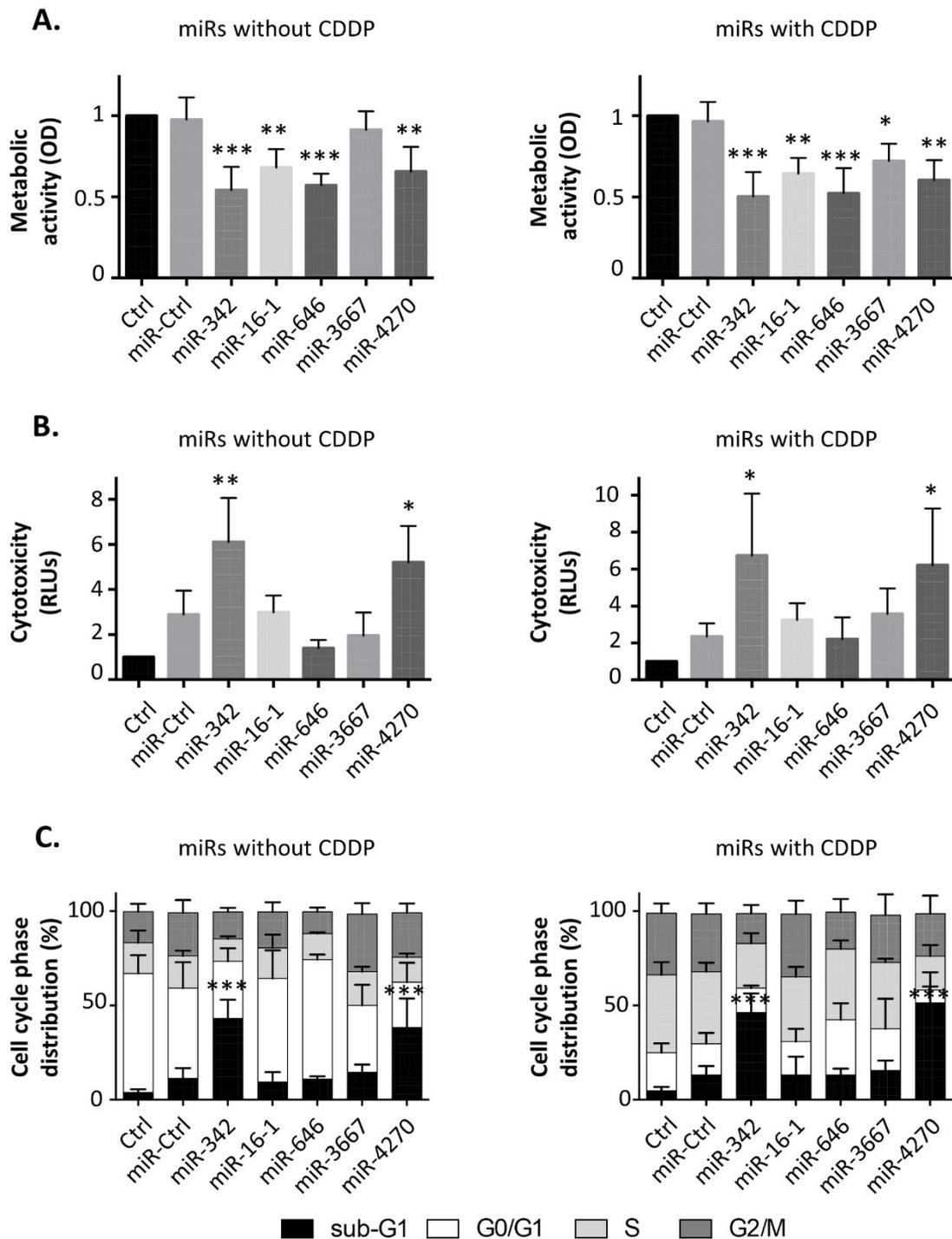
Overall, we concluded that antiproliferative effects of these 4 selected miRNAs, observed in the high-throughput screening, were not due to an induction of cell death in SW1353 cells.

#### **Functional analysis of miRNAs revealed anti-metabolic and cytotoxic effects of miR-4270 on HOS osteosarcoma cell line.**

In parallel, we performed a functional analysis on the HOS osteosarcoma cell line at 72 h post-transfection. HOS cells were treated under normoxia in the presence or absence of a sublethal dose of CDDP 48 h after the transfection of miRNAs (Figure 3). In a first step, the metabolic activity of the cells was evaluated by an XTT assay (Figure 3A). All miRNAs (except miR-3667) significantly decreased the metabolic activity compared to miR-ctrl (by about 1.8-fold for miR-342-5p and miR-646,  $p < 0.001$ ; by about 1.5-fold for miR-16-1-3p and miR-4270,  $p < 0.01$ ). In the presence of CDDP, all miRNAs decreased the metabolic activity of HOS cells. MiR-342-5p and miR-646 were the most effective with the same decrease with or without CDDP (by about 1.8-fold ( $p < 0.001$ )). MiR-3667-3p was the least effective with a weak decrease by 1.3-fold only in the presence of CDDP ( $p < 0.05$ ).

We then analyzed the cytotoxic effects of these miRNAs (Figure 3B). In addition to miR-342-5p, only miR-4270 significantly induced an important cytotoxicity: by 1.4-fold relative to miR-Ctrl treated cells ( $p < 0.05$ ), and by 2.4-fold relative to miR-Ctrl/CDDP treated cells ( $p < 0.05$ ).

The analysis of cell cycle cell progression using flow cytometry showed a significant enhancement in the number of sub-G1 events only with miR-342-5p and with miR-4270 (Figure 3C). Without CDDP, miR-342-5p significantly increased the number of sub-G1 events by 3.8-fold ( $p < 0.001$ ; 11.2% of sub-G1 events with miR-Ctrl and 43.1% with miR-342-5p) and miR-4270 augmented it by 3.4-fold ( $p < 0.001$ ; 38.4% of sub-G1 events with miR-4270). CDDP increased the percentage of events in the S and G2/M phases at the expense of the G0/G1 phase. In the presence of CDDP, miR-342 induced cell death by 3.5-fold ( $p < 0.001$ ; 13% of sub-G1 events with miR-Ctrl and 46.2% with miR-342-5p) and miR-4270 by 3.9-fold ( $p < 0.01$ ; 51.4% of sub-G1 events with miR-4270). There was no significant difference in the induction of cell death between cells transfected with miRNAs alone or with miRNAs combined with CDDP



**Figure 3: Functional analysis of cytotoxic or chemosensitizing effects of miRNAs on HOS osteosarcoma cell line.** HOS cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-342-5p, miR-16-1-3p, miR-646, miR-3667-3p and miR-4270. The treatment with CDDP (0.5  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were then carried out 72 h post-transfection. (A) The metabolic activity was evaluated and expressed as mean of OD  $\pm$  SD of 4 independent experiments. (B) The cytotoxicity of the miRNAs was evaluated and expressed as mean of RLU  $\pm$  SD of 4 independent experiments. (C) Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. The histograms represent the analysis of 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD) with the different phases of the cycle. Statistically significant differences between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

treatment. The analysis of cell morphology at 72 h post-transfection showed a decrease in cell confluence and an increase of the number of cellular debris as well fragmented chromatin, typical of apoptotic cells, for both miRNAs with or without CDDP (Figure S3).

These results suggested that, like miR-342-5p, miR-4270 could be an apoptomiR in HOS osteosarcoma cell line. MiR-4270 induced cell death by the same magnitude with or without CDDP, suggesting that it is not a CDDP chemosensitizer.

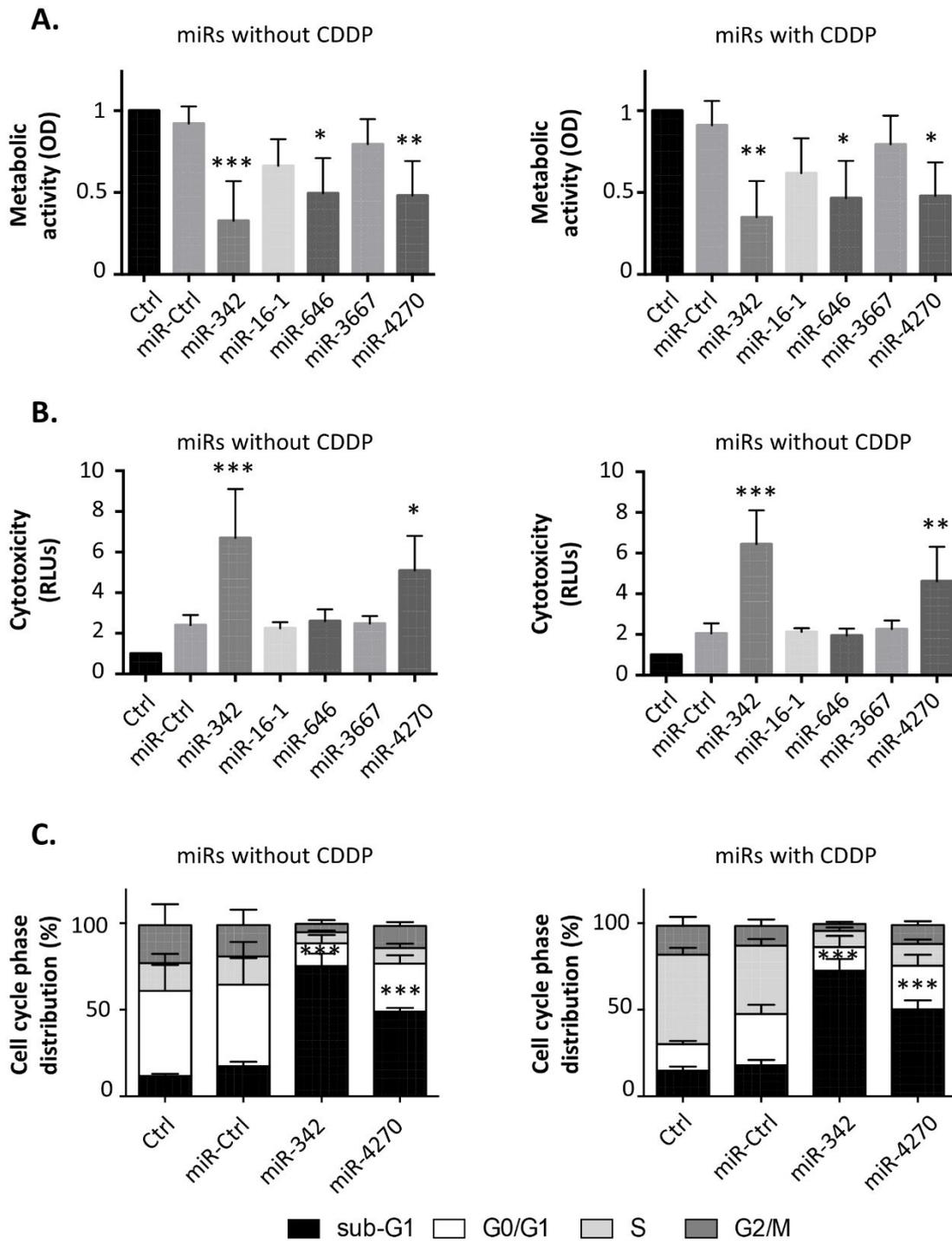
**Functional analysis of miRNAs revealed anti-metabolic and cytotoxic effects of miR-4270 on MG63 osteosarcoma cell line, whereas miR-4270 had only anti-metabolic effects on SaoS-2 osteosarcoma cell line.**

We then focused our investigations on two other osteosarcoma cell lines (MG63 and SaOS-2) transfected in the same manner with or without a sublethal dose of CDDP.

Regarding MG63 cells, miR-342-5p, miR-646 and miR-4270 significantly decreased their metabolic activity at 72 h post-transfection (Figure 4A). MiR-342-5p decreased the metabolic activity by approximately 3-fold for both conditions of culture ( $p < 0.001$  relative to miR-Ctrl, and  $p < 0.01$  relative to miR-Ctrl/CDDP), whereas miR-646 and miR-4270 had effects of lower magnitude with a decrease of approximately 2- fold ( $p < 0.05$  relative to respective miR-Ctrl).

Moreover, only miR-4270, in addition to miR-342-5p, induced an important cytotoxicity by approximately 2-fold (with and without CDDP) *versus* approximately by 3-fold with miR-342-5p (Figure 4B).

The analysis of the cell cycle distribution by flow cytometry revealed that the treatment with a sublethal dose of CDDP only induced a blockage of MG63 cells in the S phase (Figure 4C). MiR-4270 significantly increased the number of sub-G1 events by 2.8-fold with miR-4270 for both conditions of culture ( $p < 0.001$  relative to miR-Ctrl with or without CDDP) (Figure 4C). In comparison, miR-342-5p increased cell death by about 4-fold for both conditions ( $p < 0.001$ ) (Figure 4C). The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 17.4%, 75.3% and 48.9% without CDDP, 18%, 72.5%, and 50.3% with CDDP, for miR-Ctrl, miR-342-5p and miR-4270 respectively. Morphological analysis of the cells at 72 h post-transfection showed, for both miRNAs, a great increase in the number of cellular debris and the presence of apoptotic bodies compared to miR-Ctrl condition with or without CDDP (Figure S4).



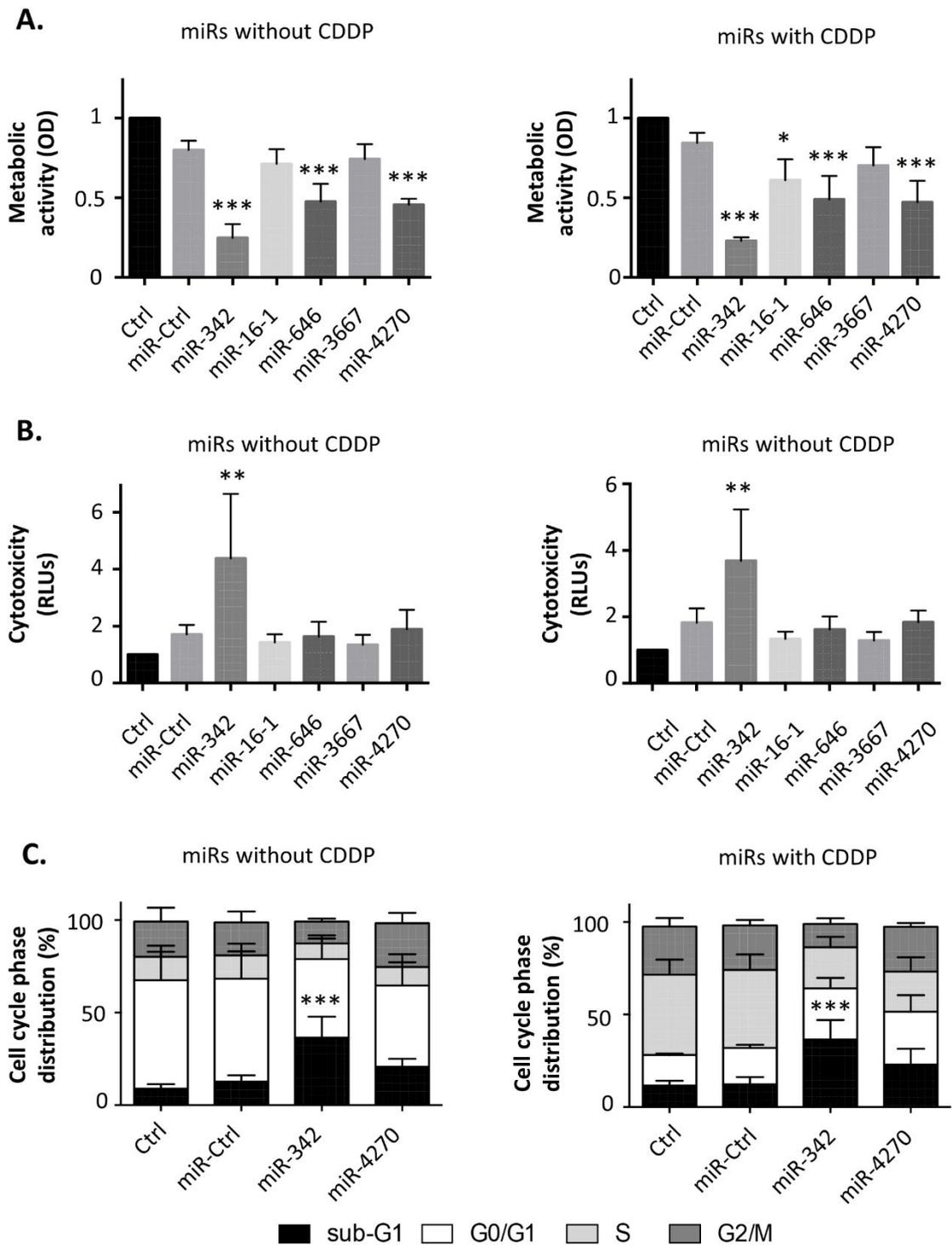
**Figure 4: Functional analysis of cytotoxic or chemosensitizing effects of miRNAs on MG63 osteosarcoma cell line.** MG-63 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miRNAs as described in figure 3. The treatment with CDDP (0.5  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. (A) The metabolic activity of the cells ( $OD \pm SD$  of 4 independent experiments), (B) the cytotoxicity of the miRNAs ( $RLU \pm SD$  of 4 independent experiments), and the cell cycle phase distribution (mean  $\pm SD$  of 4 independent experiments) were evaluated 72 h post-transfection, as described in figure 3. Statistically significant differences between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

These results suggested that miR-4270 could also be an apoptomiR in MG63 osteosarcoma cell line, but it would be less efficient than miR-342-5p. MiR-4270 induced cell death of the same magnitude with or without CDDP, suggesting no chemosensitizing effect. With SaOS-2 cells, miR-342-5p, miR-646 and miR-4270 significantly decreased their metabolic activity when used without CDDP (3.2-fold for miR-342-5p and 1.7-fold for the 2 other miRNAs,  $p < 0.001$  relative to miR-Ctrl) (Figure 5A). When miRs were associated with a sublethal dose of CDDP, all miRNAs decreased the metabolic activity of SaOS-2 cells (3.7-fold for miR-342-5p,  $p < 0.001$ ; about 1.8-fold for miR-646 and miR-4270,  $p < 0.001$ ; 1.4-fold for miR-16-1-3p,  $p < 0.05$ ; and 1.2-fold for miR-3667-3p,  $p < 0.05$ ).

None of the 4 studied miRNAs induced cytotoxicity on SaOS-2 cells. Only the positive control miR-342-5p increased cytotoxicity by about 2-fold in the presence or absence of a sublethal dose of CDDP (Figure 5B).

Concerning the study of the cell death by flow cytometry, we observed that CDDP increased the percentage of events in the S phase at the expense of the G0/G1 phase in SaOS-2 cells. Only miR-342-5p was able to significantly increase the number of sub-G1 events by 2.9-fold in the presence or absence of a sublethal dose of CDDP ( $p < 0.001$ ). The proportions of the cells in the sub-G1 phase were: 12.7% and 36.6% without CDDP, 12.3% and 36.6% with CDDP, for miR-Ctrl and miR-342-5p respectively (Figure 5C). MiR-4270 did not significantly modulated cell death in both culture conditions: 1.6-fold relative to miR-Ctrl (20.7% of sub-G1 events) and 1.9-fold relative to miR-Ctrl/CDDP (23.1% of sub-G1 events). Morphological analysis of the cells showed a reduction of confluency for both miRNAs, but less apoptic bodies with miR-4270 compared to miR-342-5p (Figure S5).

MiR-4270 had only a significant anti-metabolic effect on SaOS-2 cells. It did not significantly induced cell death on this osteosarcoma cell line. These effects were comparable with or without CDDP, suggesting that it has no chemosensitizing effect.



**Figure 5: Functional analysis of cytotoxic or chemosensitizing effects of miRNAs on SaOS-2 osteosarcoma cell line.** SaOS-2 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miRNAs as described in figure 3. The treatment with CDDP (0.5  $\mu$ g/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. (A) The metabolic activity of the cells (OD  $\pm$  SD of 4 independent experiments), (B) the cytotoxicity of the miRNAs (RLU  $\pm$  SD of 4 independent experiments), and the cell cycle phase distribution (mean  $\pm$  SD of 5 independent experiments) were evaluated 72 h post-transfection, as described in figure 3. Statistically significant differences between miR-Ctrl and miRNA-treated cells were determined using one-way ANOVA (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

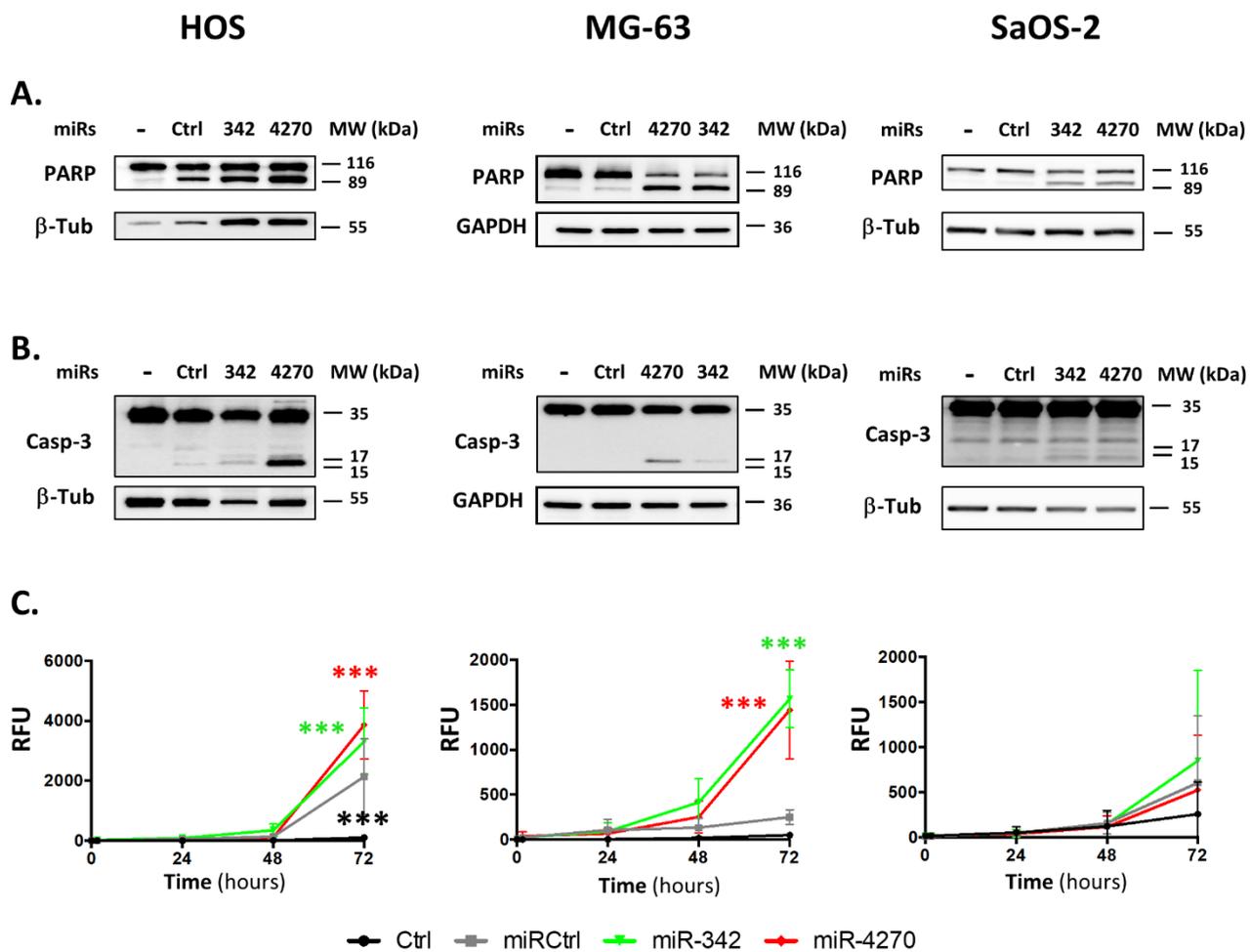
### **MiR-4270 activates the apoptosis pathway in HOS and MG63 osteosarcoma cell lines.**

We next investigated the induction of apoptosis by miR-4270 alone in the 3 osteosarcoma cell lines 72 h post-transfection (Figure 6). As miR-342-5p, miR-4270 induced PARP cleavage in the 3 osteosarcoma cell lines (Figure 6A). The effects were more significant in the HOS and MG-63 cell lines than in the SaOS-2 cell line. Caspase-3 cleavage was the highest with miR-4270, particularly in the HOS cell line, while this cleavage was almost absent in the SaOS-2 cell line for both miRNAs (Figure 6B). In addition, miR-4270 only significantly increased caspase-3/7 activity in HOS and MG-63 cells (by 1.7-fold and by 5.7-fold respectively,  $p < 0.001$ ) (Figure 6C). MiR-342-5p also only significantly induced caspase-3/7 activity in HOS and MG-63 cells (by 1.5-fold and by 6.2-fold respectively,  $p < 0.001$ ). Because the activation of caspases and the cleavage of PARP are characteristic hallmarks of apoptosis, these results suggested that miR-4270 unambiguously induces apoptosis in HOS and MG63 osteosarcoma cell lines, like miR-342-5p. This is in accordance with our previous results on cell death (Figures 3, 4 and 5).

### **MiR-4270 modulates the expression of proteins of the Bcl-2 family in osteosarcoma cell lines.**

Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 are all members of the anti-apoptotic Bcl-2 family and are among the predicted targets of miR-4270 and miR-342-5p. We therefore evaluated their protein expression to determine their involvement in the induction of apoptosis by this miRNA in the three osteosarcoma cell lines.

Bcl-2 protein expression was not decreased, but increased (by 1.4-fold relative to miR-Ctrl) by miR-4270 in HOS cells (Figure 7A). By contrast, miR-342-5p decreased Bcl-2 protein expression by 2-fold in HOS cell line. MiR-4270 decreased Bcl-2 protein expression by 1.7-fold and 1.2-fold respectively in MG-63 and SaOS-2 cells. The effects of miR-342-5p were comparable on both these two cell lines (decrease by 1.4-fold in MG-63 cells and by 1.7-fold in SaOS-2 cells).



**Figure 6: Analysis of the apoptotic effects of miR-342-5p and miR-4270 on osteosarcoma cell lines.** HOS, MG63 and SaOS-2 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-342-5p and miR-4270. In panels (A) and (B), protein extracts were analyzed by western-blotting 72 h post-transfection, to evaluate PARP and caspase-3 levels versus  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -Tub) or GAPDH loading controls. Representative blots of 3 independent experiments are shown. (C) The caspase-3/7 activity was assessed in real time for 72 h as described in the "Material and Methods" section. The graphs provide the analysis of fluorescence of 4 independent experiments (mean of RFU  $\pm$  SD). The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using two-way ANOVA (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Bcl-xL protein expression was significantly decreased by miR-4270 in all the 3 osteosarcoma cell lines (by 2.5-fold in HOS cells, 5-fold in MG-63 cells, and 1.4-fold in SaOS-2 cells) (Figure 7B). We previously validated Bcl-xL as a direct target of miR-342-5p in HOS cell line (Veys *et al.*, submitted). Here, we confirmed its inhibitory effect on Bcl-xL protein expression in the three osteosarcoma cell lines with at least a 1.7-fold decrease.

*MCL-1* mRNA is a putative target for both miRNAs. MiR-342-5p had no relevant effect on the level of Mcl-1 protein expression (Figure 7C). In all 3 osteosarcoma cell lines, miR-4270 decreased Mcl-1 protein expression at different levels: by 1.4-fold in HOS cells and by 1.7-fold in MG-63 and SaOS-2 cells.

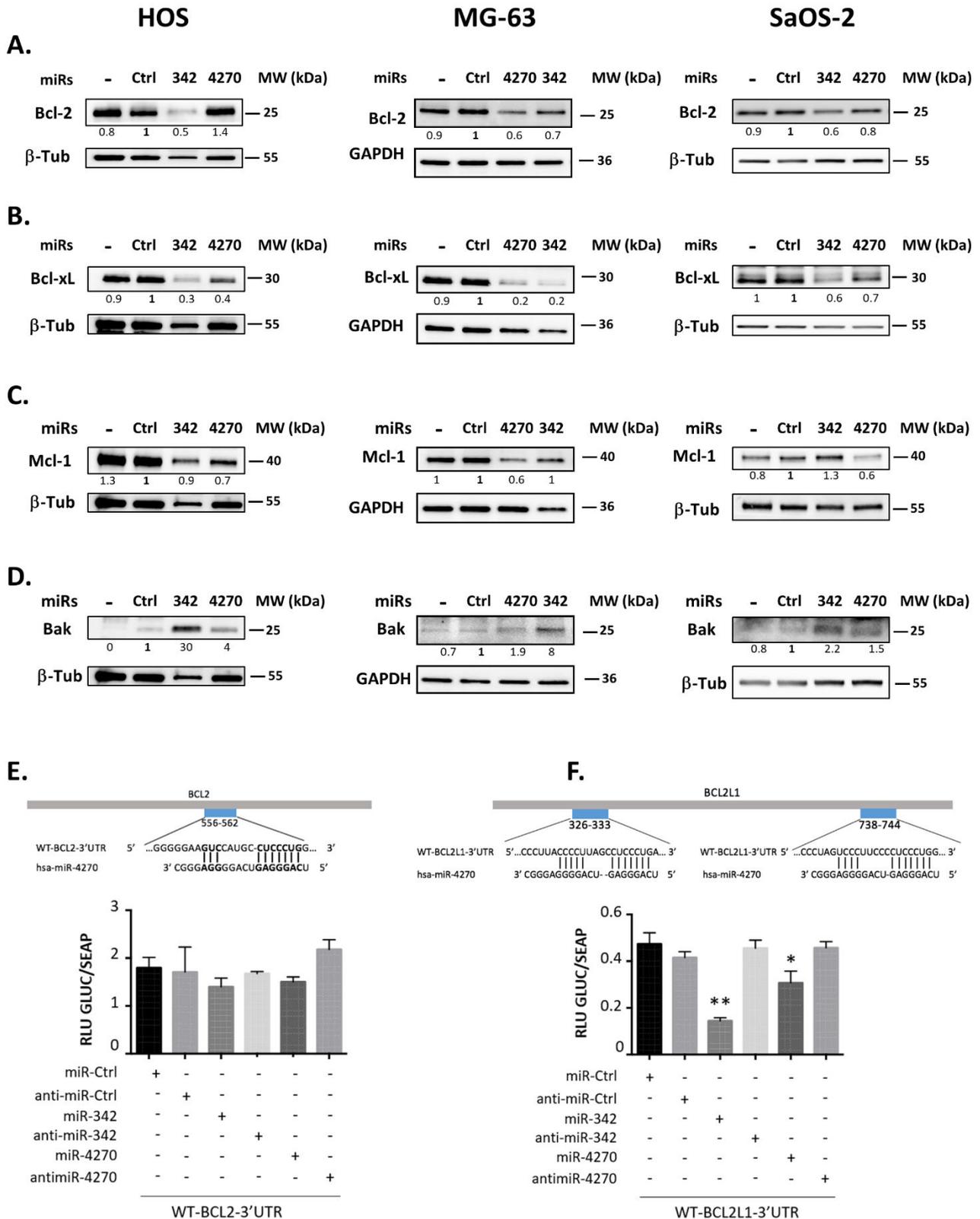
We then investigated the expression of the pro-apoptotic protein Bak, involved in the intrinsic apoptosis pathway. This protein participates to mitochondrial outer membrane permeabilization and subsequent induction of cell death. Both miRNAs clearly induced its protein expression in the three osteosarcoma cell lines, with the best induction for miR-342-5p (from 2.2-fold to 30-fold induction with miR-342-5p and from 1.5-fold to 4-fold induction with miR-4270).

In summary, miR-4270 mainly decreased the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1, whereas miR-342-5p mainly decreased that of Bcl-xL and also Bcl-2 in osteosarcoma cells. Both miRNAs significantly increased the expression of the pro-apoptotic protein Bak.

#### **Direct inhibition of *BCL2L1* mRNA by miR-4270 in HOS osteosarcoma cell line.**

We next verify that the effect of miR-342-5p and miR-4270 on Bcl-2 (*BCL2* gene) or Bcl-xL (*BCL2L1* gene) resulted from direct binding to their respective mRNAs in the 3'UTR region. We co-transfected, in HOS cells, luciferase reporter vectors containing the 3'UTR sequence of these mRNAs as well as miR-4270 and miR-342 mimics or their corresponding hairpin inhibitors.

*In silico* analysis identified a potential binding site for miR-4270 between nucleotides 556-562 in BCL2-3'UTR (Figure 7E). MiR-4270 did not significantly decrease the luciferase activity of the WT-BCL2-3'UTR vector compared to miR-Ctrl. MiR-342 also had a potential binding site on WT-BCL2-3'UTR vector and its transfection decreased the Bcl2 protein expression. Nevertheless, as previously described (Veys *et al.*, submitted), it did not significantly decrease the luciferase activity of the WT-BCL2-3'UTR vector.



**Figure 7: Effects of miR-342 and miR-4270 on the expression of members of the Bcl-2 family in osteosarcoma cell lines.** In panels (A), (B), (C) and (D), HOS, MG63 and SaOS-2 cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miR-Ctrl, miR-342-5p and miR-4270. Protein extracts were analyzed by western-blotting 72 h post-transfection to evaluate Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 and Bak levels versus  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -Tub) or GAPDH loading controls.

Representative blots of 3 independent experiments are shown. Protein expressions are indicated at the bottom of the blots. They were normalized to  $\beta$ -tubulin or GAPDH and to the corresponding miR-Ctrl. In panels (E) and (F), the 3'UTR sequences of *BCL2* and *BCL2L1* have been respectively aligned with the conserved sequence complementary to hsa-miR-4270. Reporter vectors of BCL2- 3'UTR and BCL2L1-3'UTR (1 ng/ $\mu$ l) were co-transfected with the indicated miR or anti-miR (20 nM) in HOS cells. SEAP and GLUC luciferase activities were measured 48 h post-transfection. GLUC activity was normalized to SEAP activity and expressed as RLU. The data show representative experiments (mean  $\pm$  SD) of 4 independent experiments performed in triplicate. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA- or anti-miRNA-treated cells was evaluated by two-tailed Student's t-test (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

We have identified two presumptive binding sites for miR-4270 in BCL2L1-3'UTR at positions 326-333 and 738-744 (Figure 7F). We already demonstrated direct binding of miR-342-5p at position 679-686 and 1407-1413 of BCL2L1-3'UTR in HOS cells (Veys et al, submitted). The co-transfection of miR-4270 resulted in a significant decrease (35%,  $p < 0.05$ ) of the luciferase activity of WT-BCL2L1-3'UTR vector. As expected, miR-342 induced a greater decrease of the reporter activity (70%,  $p < 0.01$ ). The co-transfection of anti-miR-342-5p or anti-miR-4270 restored the luciferase activity at the miR-Ctrl level. Therefore, in HOS cells, miR-4170 downregulated Bcl-XL protein expression through direct binding to the 3'UTR of *BCL2L1* mRNA.

## Discussion

Osteosarcomas and chondrosarcomas are the most common forms of bone sarcomas. Nowadays, osteosarcoma is a well-treated tumor due to the efficacy of combination chemotherapy associated with surgery. However, for patients with metastases or recurrences, the survival rate is much lower. For chondrosarcomas, these tumors are resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy. Surgery remains the only effective therapy. Nevertheless, the location of the tumor may not allow surgery. The use of therapeutic miRNAs had the advantage of a multi-target approach. Moreover, it could be useful to discover new therapeutic targets for clinical applications (Palmini *et al.*, 2017; Botti *et al.*, 2019; Pu *et al.*, 2016; Sampson *et al.*, 2015).

Using high-throughput screening of a human library of 1200 miRNAs, we found numerous miRNAs with the ability to decrease cell proliferation in the SW1353 chondrosarcoma cell line. Out of these miRNAs, we identified 4 miRNAs with predicted pro-apoptotic activities through predictive targeting of the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. Among these members, Bcl-xL and Bcl-2 are thought to play a key role in the survival

and chemoresistance of chondrosarcoma cells (van Oosterwijk *et al.*, 2012; de Jong *et al.*, 2016; de Jong *et al.*, 2018). In osteosarcomas, overexpression of Bcl-2 and Bcl-xL was associated with poor prognosis (Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Moreover, high expression of Bcl-xL in metastatic osteosarcomas was correlated with a low probability of survival due to the acquisition of chemoresistance. In a previous study, we demonstrated a suppressive role of miR-342-5p on chondrosarcoma cells through direct inhibition of Bcl-xL and Bcl-2 (Veys *et al.*, submitted). We also showed that miR-491-5p was an apoptomiR in chondrosarcoma cells, through the direct inhibition of Bcl-xL and the repression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression. In a second study performed on osteosarcoma cells, we demonstrated a direct inhibition of Bcl-xL by both miRNAs, and their concomitant induction of apoptosis (Veys *et al.*, submitted).

Real-time cell analysis and end-point morphological analysis of high-throughput screening of miRNAs on SW1353 cells were performed in glass culture plates under normoxia. However, chondrosarcomas are predominantly hypoxic tumors. We therefore realized an individual functional validation with miR-16-1-3p, miR-646, miR-3667-3p and miR-4270 in conventional plastic culture plates, under normoxia and hypoxia. MiR-342-5p was used as a positive control of cytotoxicity and of apoptosis induction. We were also interested in the chemosensitizing effects of these miRNAs. Unfortunately, we did not confirm the potential cytotoxic effect of the selected miRNAs on the SW1353 chondrosarcoma cell line. They also had no chemosensitizing effects in our experimental culture conditions, as in the high throughput screening. By contrast, we demonstrated anti-metabolic and cytotoxic effects of miR-4270 on HOS and MG63 osteosarcoma cell lines. We only showed a significant anti-metabolic effect of miR-4270 on SaOS-2 osteosarcoma cell line. In addition, we were unable to demonstrate a potential chemosensitizing effect of these miRNAs on the three osteosarcoma cell lines.

Human miR-16, also known as miR-16-5p, originates from to 2 loci, *MIR-16-1* and *MIR-16-2* located on 2 chromosomes. Both loci produce the same guide strand miR-16-5p, but produce different passenger strands, miR-16-1-3p and miR-16-2-3p. Calin *et al.* first found *MIR-16-1* locus deletion and/or miR-16 downregulation in the majority of chronic lymphocytic leukemia (CLL) (Calin *et al.*, 2002). Since this study, miR-16 has been reported to be tumor-suppressor in many types of cancer, and as a potential oncomiR in some types of cancer (Huang *et al.*, 2015). Nevertheless, miR-16-1-3p has been very little studied. Regarding osteosarcomas, expression of miR-16-5p and miR-16-2-3p was downregulated in osteosarcoma samples in

comparison to the healthy bone, while miR-16-1-3p expression was undetectable (Jones *et al.*, 2012). This group also showed that stable HOS clones overexpressing miR-16-1-3p, as well as miR-16-2-3p, have less ability to form colonies in soft agar (Maximov *et al.*, 2019). This effect was much stronger than the effect of miR-16-5p overexpression. In our study, miR-16-1-3p induced a significant decrease in the metabolic activity only on HOS cells, but we failed to demonstrate its cytotoxic or apoptotic effects. Maximov *et al.* (2019) showed an induction of apoptosis 5 days after infection of KHOS cells with lentivirus overexpressing miR-16-5p, miR-16-1-3p and miR-16-2-3p. They did not show this latest experiment with HOS cells, and in comparison, with our study, they performed analysis of the induction of apoptosis later (3 days after transfection in our study). Using an XTT assay, they showed that miR-16-2-3p overexpressing HOS clone, but not miR-16-5p or miR-16-1-3p overexpressing HOS clones, sensitizes cells to both cisplatin and doxorubicin treatments (from 1 to 5  $\mu\text{M}$  CDDP during 48 h). They sensitized U2OS cells to cisplatin treatment (with 5-10  $\mu\text{M}$ , but not with 2  $\mu\text{M}$ , during 48 h) after transfection of miR-16-5p, miR-16-1-3p and miR-16-2-3p mimics. These data were in accordance with our results on HOS cells, because we used CDDP at lower concentration (1.65  $\mu\text{M}$ ) 48 h after transfection during only 24 h. Finally, using HOS clones overexpressing miRNAs, Maximov *et al.* (2019) also showed tumors suppressive properties of miR-16-1-3p *in vivo* and its capacity to reduce invasion *in vitro*. Our experimental methods could explain that miR-16-13p did not induce cell death in all osteosarcoma cell lines and in SW1353 chondrosarcoma cell line. In particular, Maximov *et al.* (2019) explained that HOS polyclonal cultures lose overexpression of miRNAs too quickly. That is why they used stable clones overexpressing miRNAs.

MiR-646 is downregulated in many cancers and increasing evidence supports its tumor suppressive role. For example, the downregulation of miR-646 in renal cancer was associated with a higher probability to develop metastasis through the induction of MAPK pathway by targeting Nin One Binding protein 1 (NOB1) (Li *et al.*, 2014). The role of miR-646 was investigated in three studies performed on osteosarcomas but none on chondrosarcomas. Two studies showed that miR-646 inhibits the migration and invasion (measured with a single transwell assay) of U2OS cell line (Yang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2019). In these studies, the authors did not analyze its anti-metabolic activity, its potential cytotoxic or apoptotic effects. The study reported by Sun *et al.* (2015) showed that miR-646 was downregulated in 4 osteosarcoma cell lines (MG-63, SaOS-2, HOS and U2OS) and in osteosarcoma tissues compared to an osteoblastic cell line and to paired adjacent healthy tissues (Sun *et al.*, 2015).

Moreover, its lower expression was associated with metastasis. They showed that transfection of miR-646 in MG63 cells inhibited cell proliferation (MTT assay), migration (wound healing assay) and invasion (transwell invasion assay). However, these authors did not study the induction of cell death. They concluded that miR-646 might be a tumor suppressor in osteosarcoma *via* its direct target of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). In our study, miR-646 was also able to significantly reduce the metabolic activity of HOS, MG63 and SaOS-2 cells, but it was not able to induce cytotoxicity in all these cell lines. Because it did not induce cell death in the HOS and SW1353 cell lines, we have not continued our investigations in the other cell lines, nor studied its anti-metastatic capacities. Further investigations could lead to the same conclusions as these authors, but we preferred to focus on the more promising miR-4270 on osteosarcoma cells.

For miR-3667-3p, to our knowledge, only one study addressed its role in cancer. MiR-3667-3p targeted the lncRNA (long non-coding RNA) PCAT-1 (Prostate Cancer Associated Transcrit-1) in prostate cancer (Prensner *et al.*, 2014). PCAT-1 promoted prostate cancer cell proliferation through positive post-transcriptional regulation of c-Myc. MiR-3667-3p reversed this stabilization of c-Myc by PCAT1, without binding to *c-Myc*. MiR-3667-3p would therefore have anti-suppressor properties, but in our study, we did not confirm its potential cytotoxic effect observed in the high-throughput screening on any of the cell lines studied.

MiR-4270 seemed to play dual role in cancer. It was downregulated in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues (Zhu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). It inhibited cancer cell proliferation and metastasis in HCC by directly targeting stabilin-2 (STAB2), a key regulator of epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Wang *et al.*, 2020). MiR-4270 downregulation was associated with an increased risk of brain metastasis in patients with lung adenocarcinoma (LAD) (Sun *et al.*, 2019). Transfection of LAD cells with miR-4270 inhibited proliferation, colony formation and migration *in vitro* through direct targeting of MMP19 (Matrix Metalloprotease 19). Recently, other authors showed that the levels of miR-4270 are also decreased in gastric cancer tissues (Shen *et al.*, 2020). Moreover, they highlighted that circ\_0005556, a circular RNA, sponged miR-4270, resulting in MMP19 overexpression, and subsequent proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. Intriguingly, other studies showed that circulating miR-4270 displays up-regulated levels in metastatic gastric cancer and breast cancer patients, with the potential use of miR-4270 as a diagnostic or prognostic biomarker (Tokuhisa *et al.*, 2015; Hamam *et al.*, 2016). In non-small-cell lung cancer (NSCLC), another group suggested its potential contribution to tumor cell growth (Zou

*et al.*, 2019). Zou *et al.* (2019) showed that the overexpression of the long intergenic non-protein-coding RNA 472 (LINC00472) upregulates killin (KLLN) to inhibit the proliferation, invasion, and EMT of NSCLC cells through the sponging of miR-149-3p and miR-4270. They showed a direct binding of miR-4270 to KLLN 3'UTR, despite a weak complementary base pairing in its target region. Collectively, these results suggest that different levels of miR-4270 expression might be associated to different cancers and that miR-4270 should have different functions.

In our study, we showed the best antiproliferative effect of miR-4270 on SW1353 chondrosarcoma cells 120 h after seeding (96 h post-transfection) in high-throughput screening, but we failed to validate its cytotoxic effect in the functional analysis 72 h post-transfection. A longer incubation period could be necessary to validate the effects obtained with this cell line in the screening. However, functional analyses revealed anti-metabolic and cytotoxic effects of miR-4270 on HOS and MG63 osteosarcoma cell line 72 h post-transfection, but only anti-metabolic effects on SaOS-2 osteosarcoma cell line. We also did not detect chemosensitizing effect of this miRNA in the presence of CDDP in any cell line in our experimental conditions. As explained above, sublethal doses of CDDP may not be adequate to unveil chemosensitizing effects of miR-4270 on osteosarcoma cells.

In order to confirm the induction of cell death by apoptosis, we studied, the protein expression of the effectors of apoptosis (PARP and Caspase-3). In the HOS and MG-63 cell lines, we clearly observed an increase in cleaved PARP and cleaved caspase-3 under miR-4270 treatment. In addition, as miR-342-5p, miR-4270 also increased caspase 3/7 activity in both cell lines, whereas we detected only PARP cleavage in SaOS-2 cells. This was already observed in our previous study (Veys *et al.*, submitted). In our previous study, we also demonstrated a cell death induction by miR-342-5p in SaOS-2 cells, without induction of caspase-3 cleavage and caspase 3/7 activity, but we detected the induction of cleaved PARP (Veys *et al.*, submitted).

In order to better understand the mechanisms underlying the activation of apoptosis by miR-4270, we analyzed the protein expression of some members of the Bcl-2 family. Indeed, *in silico* analysis showed that the anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 were potential targets of this miRNA. Bcl-2 protein expression was significantly decreased by miR-342-5p, but not by miR-4270, in the 3 osteosarcoma cell lines. However, we did not validate Bcl-2 as a direct target of both miRNAs in HOS cells, as previously described for miR-342-5p (Veys *et al.*, submitted). We demonstrated that Bcl-xL protein expression is significantly reduced by miR-4270 in HOS and MG-63 cells and to a lesser extent in SaOS-2 cells. We demonstrated for the

first time, by luciferase reporter assay, that Bcl-xL is a direct target of miR-4270. We also demonstrated that miR-4270 decreased Mcl-1 protein expression particularly in MG63 and SaOS-2 cells. However, we did not perform further investigations to confirm that Mcl-1 is a direct target of miR-4270. Furthermore, miR-4270 was able to increase the expression of the pro-apoptotic protein Bak especially in HOS and MG-63 cell lines.

Overall, we have demonstrated the tumor suppressive role of miR-4270 on HOS and MG63 osteosarcoma cell lines. MiR-4270 had anti-metabolic effects and some anti-apoptotic effects on SaOS-2 cell line, but these latter effects were not sufficient to induce cell death in this osteosarcoma cell line. MiR-4270 did not also induced cell death in SW1353 chondrosarcoma cell line, despite its anti-proliferative effects. MiR-4270 would therefore not only have a specific function related to the type of tumor, sometimes it can act as an oncogene or as a tumor suppressor as described above, but it may also have a more or less pronounced effect depending on the cell line used, particularly according to its altered status of differentiation.

## **Conclusion**

Our study demonstrated antiproliferative, anti-metabolic and cytotoxic effects of miR-4270 on HOS and MG63 osteosarcoma cell lines. MiR-4270 also significantly induced apoptosis in these cell lines. We identified for the first time Bcl-xL as a direct target of miR-4270. MiR-4270 also decreased Mcl-1 protein expression, whereas it increased that of Bak. We already demonstrated the therapeutic potential of specifically targeting Bcl-xL and Bcl-2 on chondrosarcoma and osteosarcoma cells. Here, we provide additional evidence that Bcl-xL could be used as a potential drug target in the clinical treatment of patients with osteosarcomas.

## **Materiel & methods**

### **Cell culture**

The chondrosarcoma cell line SW1353 (ATCC® HTB-94) was grown and treated in high glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM, Biowest) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Eurobio), 3 µg/ml ciprofloxacin (Sigma Aldrich) and 0.5 µg/ml amphotericin (Eurobio). The treatments of SW1353 cells were performed under normoxia (21%

O<sub>2</sub>) and hypoxia (3 % O<sub>2</sub>). Hypoxic cultures, including any handling, were exclusively performed in a sealed chamber, with a controlled rate of oxygenation (Legendre *et al.*, 2009).

The osteosarcoma cell line HOS (ATCC® CRL-1543™) was grown and treated in high glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM, Biowest) supplemented with 10 % Fetal Calf Serum (FCS) (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin (0.25 µg/ml) (Eurobio). The osteosarcoma cell line MG-63 (ATCC® CRL-1427™) was grown and treated in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Biowest) supplemented with 10 % FCS (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/ml) (Eurobio). The osteosarcoma cell line SaOS-2 (ATCC® HTB-85™) was grown and treated in DMEM/ Nutrient Mixture F-12 ham (DMEM: HAM's F12, Biowest) supplemented with 5 % FCS (Eurobio), 2 mM L-Glutamine (Eurobio), and a mixture of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/ml) (Eurobio). The treatments of osteosarcoma cells were performed only under normoxia (21% O<sub>2</sub>).

All cells were certified mycoplasma-free after PCR analysis. They were maintained in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **Drugs and miRNAs**

Cisplatin (CDDP) was purchased from Mylan (Merk, France). Sublethal doses of CDDP were used during the transfection of miRNA as follows: 1 µg/ml (3.3 µM) for SW1353 and 0.5 µg/ml (1.65 µM) for HOS, MG-63 and SaOS-2 cells. All miRNA mimics were purchased from Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). MiRNA-Control (miR-Ctrl, MIMAT0000039), was based on *C. elegans* miRNA sequence that has been confirmed to have minimal sequence identify with human miRNAs. Human miRNA hsa-miR-342-5p (miR-342, MIMAT0004694), hsa-miR-16-1-3p (miR-16-1, MIMAT0004489), hsa-miR-646 (miR-646, MIMAT0003316), hsa-miR-3667-3p (miR-3667, MIMAT0018090) and hsa-miR-4270 (miR-4270, MIMAT0016900) were also used in this study. MiRNA hairpin inhibitors were purchased from Dharmacon: hsa-miRNA-342-5p-hairpin inhibitor (anti-miR-342, IH-301083-02), hsa-miR-4270-hairpin inhibitor (anti-miR-4270, IH-301835-01) and miRNA hairpin inhibitor Negative Control (anti-miR-ctrl, IN-001005-01).

### **Real-time cell analysis (xCELLigence)**

MiRNA- and cisplatin-mediated cytotoxicity on SW1353 cells were initially monitored by high throughput screening using Real-Time Cell Analyser (RTCA) multi-plate instrument (xCELLigence System; ACEA, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) under normoxia. This system monitors cellular events in real-time by measuring electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated into the bottom surfaces of 96-well E-plates VIEW (Ozyme). RTCA 2.1.0 software calculates the cell index (CI) based on the impedance. CI correlates with the area of cells attached to the bottom of the plate as described elsewhere (Ke *et al.*, 2011). SW1353 cells were plated in 96-well E-plates as previously described (Veys *et al.*, submitted). Briefly, cells were transfected 24 h after seeding with 20 nM miRNAs using Interferin™ (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). They were treated or not with CDDP 24 h post-transfection. Impedance was continuously measured until the end of the experiment (i.e. 96 h post-transfection and 120 h after seeding) and analyzed with the RTCA software. Endpoint morphological analysis of cells was also done in a high throughput cell imaging system (Cellavista; Roche) at the end of the experiment.

### **Transfection of miRNA and CDDP treatment**

Exponentially growing SW1353, HOS, MG-63 and SaOS-2 cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cell lines were transfected 24 h after seeding with 20 nM of miRNA mimics using INTERFERin™ (Polyplus-Transfection) according to the manufacturer's instructions. An additional CDDP treatment was realized 48 h post-transfection with sublethal doses of CDDP.

### **Metabolic activity analysis**

SW1353 cells and osteosarcoma cell lines were seeded onto 96-well microplates at a density of  $3.5 \times 10^3$  cells/well and  $3.3 \times 10^3$  cells/well respectively in triplicates. Transfection of 20 nM miRNA was performed 24 h later with or without an additional CDDP treatment 48 h post-transfection, as described above. Cellular metabolic activity was estimated 72 h post-transfection using the XTT assay (Roche) as previously described (Veys *et al.*, submitted). Optical density (OD) was measured at 450 nm and 600 nm with an absorbance microplate reader (Spark 10M, Tecan) after 1 h incubation.

### **Cytotoxicity assay**

In parallel with the metabolic activity analysis, a bioluminescence cytotoxicity assay kit (Interchim) was used to evaluate miRNA-induced cytotoxicity 72 h post-transfection. This kit is based on the measurement of adenylate kinase (AK) rapidly released into the culture medium upon damage to the plasma membrane. AK detection was analyzed in the supernatant, as previously described (Veys *et al.*, submitted). The emitted light was measured with a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan) and expressed as relative luciferase units (RLU), reflecting the number of dead cells.

### **Cell cycle analysis**

Adherent cells were harvested by trypsinization. The supernatant, containing the detached cells, and the trypsinized cells were pooled, centrifuged (1400 rpm, 10 min), rinsed with PBS, fixed in 70% ethanol, and stored at -20°C until analysis. The labelling of the cells with propidium iodide was done as previously described (Veys *et al.*, submitted). Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry using the Cytoflex S Flow Cytometer (Beckman Coulter). Data were computed with the Cytexpert® acquisition software (Beckman Coulter).

### **Analysis of nuclear morphology**

Both detached and adherent cells were pooled and applied to a poly-L-lysine-coated glass slide by cyto-centrifugation at 850 rpm for 5 min (Cytospin, Thermo Scientific). They were fixed with a solution of ethanol/chloroform/acetic acid (6: 3: 1) before DNA staining. Slides were then treated with the UltraCruz™ Mounting Medium with DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The observations were made on a fluorescence microscope (Nikon eclipse Ti).

### **Western-blotting**

Both detached and adherent cells were centrifuged at 1400 rpm for 5 min, washed with PBS and stored at -20°C until analysis. Total proteins were extracted using the RIPA-lysis buffer as previously described (Legendre *et al.*, 2003). Protein concentration was assessed according to the Bradford colorimetric procedure (BioRad). Then, 15 µg of total proteins were separated in 10% or 12% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and transferred to a

polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, BioRad) using the Trans Blot®Turbo™ Transfer system (BioRad). Unspecific binding sites of the membranes were blocked with 10% non-fat milk powder in Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween (TBST) for 1 h. Then, protein expression was analyzed by immunoblotting with antibodies from Cell Signaling Technology (Ozyme), according to the manufacturer's instructions: PARP (9542), Bcl-xL (2764), Bak (3814). We also used Mcl-1 (S-19), GAPDH (FL-335) and  $\beta$ -Tubulin (D-10) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, and the Bcl-2 (M0887) antibody from DAKO. After the incubation period, membranes were washed in TBST, followed by an incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch). Signals were visualized with a chemiluminescence imaging system (ChemiDoc™ Touch imaging system, BioRad). Each immunoblot is representative of at least three distinct experiments. Protein expression was estimated by quantifying the density of immunoblots bands adjusted to  $\beta$ -Tubulin or GAPDH (ImageLab® software).

#### **Luciferase miRNA target reporter assay**

Targetscan 7.2 (<http://www.targetscan.org>) was used for miRNA target prediction. Wild-type (WT) vectors of BCL2L1-3'UTR and BCL2-3'UTR were purchased from GeneCopoeia (USA). The full length BCL2L1-3'UTR (217HmiT108616-MT05; 1489 bp) and of the proximal part of BCL2-3'UTR (217HmiT016211a; 2761 bp) were inserted downstream of a Gaussia luciferase (GLUC) reporter gene in the pEZMX-MT05 vector. This vector also carries the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene for normalization of GLUC luciferase activity, as a function of transfection efficiency. HOS cells were seeded at  $4 \times 10^4$  cells/well (triplicates) in a 24-well plate the day before transfection. The cells were co-transfected with 20 nM miRNA mimic or miRNA hairpin inhibitor and with BCL2-3'UTR vector or BCL2L1-3'UTR vector (1ng/ $\mu$ L) using jetOPTIMUS™ DNA transfection reagent (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). Culture medium was collected 48 h later to measure luciferase activities with the secrete-pair dual luminescence assay kit (Genecopoeia) and a luminescence microplate reader (Spark 10M, Tecan). Luciferase activities were expressed as relative luciferase units (RLU) corresponding to GLUC/SEAP ratio.

### **Real-time detection of caspase-3/7 mediated apoptosis**

Caspase-3/7 activity was assessed using the Incucyte® Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (Essen BioScience) as previously described (Veys *et al.*, submitted). Briefly, HOS, MG63 and SaOS-2 cells seeded at  $3.2 \times 10^3$  cells/well were grown in 96-well plates. They were monitored after transfection of 20 nM miRNA during 72 h in the Incucyte® S3 acquiring images (objective x 10) every 3 hours in 2 separate regions per well. Each experiment was done in triplicate and analyzed with the Incucyte® software.

### **Statistical analysis**

All experiments were repeated at least three times. Values are reported as means  $\pm$  SD. Statistical significances of the mean of at least three independent experiments were assessed by one-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Dunnett's test, or two-way ANOVA corrected for multiple comparisons using Sidak's test. Alternatively, two-tailed unpaired student's t test with Welch's correction was used to analyze statistical differences within representative experiments performed in triplicate. Statistical analyzes were done using GraphPad Prism 7 software. P-values of less than 0.05 were considered significant: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , and \* $p < 0.05$ .

### **List of abbreviations**

AK: Adenylate Kinase; Bak: Bcl-2 homologous antagonist-killer; Bcl-2: B-cell Lymphoma-2; Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra Large; CDDP: Cisplatin; CI: Cell Index; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition; FCS: Fetal Calf Serum; HCC: Hepatocellular Carcinoma; KLLN: Killin; LAD: Lung ADenocarcinoma; Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1; miRNA: microRNA; NSCLC: Non-Small-Cell Lung Cancer; OD: Optical Density; PARP: Poly(ADP-Ribose) Polymerase; PCAT-1 : Prostate Cancer Associated Transcrit-1; RLU: Relative Luciferase Unit; RTCA: Real-Time Cell Analyzer.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

The datasets used and analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by the “Regional Council of Normandy” through an “Emergence” program (to C.D., L.P. and P.G.) and a “RIN Recherche OncoThera” program (to L.P. and P.G.), by 2 grants to F.L. from the “Ligue Contre le Cancer” of Normandy confederation (Orne and Seine Maritime committees), by the French Government and the European Community (ERDF (European Regional Development Funds)) to P.G. The xCELLigence apparatus (Core Facility Federative structure 4206 ICORE of Normandie University) was financed by the European Community (ERDF) and the Comprehensive Cancer Center F. Baclesse (Caen). These funding sources had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication

### **Authors contribution**

Conceptualization: C.V., A.B., C.D., L.P., N.G., F.L., P.G.; Methodology: C.V., A.B., E.B., F.R., F.L., P.G.; Formal analysis: C.V., F.B., M.J., A.B., E.B., N.G., F.L., P.G.; Software: A.B., E.B.; Validation: C.V., F.L., P.G.; Investigation: C.V., F.B., M.J., E.B., F.L.; Resources: C.D., L.P., F.R., N.G., P.G.; Data Curation: E.B., C.D.; Writing - Original Draft Preparation: C.V., F.L.; Writing - Review & Editing: F.L., P.G.; Visualization: C.V., M.J., C.D., N.G., F.L., P.G.; Supervision: F.L., P.G.; Project Administration: F.L., P.G.; Funding Acquisition: C.D., L.P., F.L., P.G.

All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgments**

C.V. is a recipient of a PhD scholarship from the French Ministry for Higher Education and Research. M.J. was supported by a PhD fellowship co-financed by the GIS CENTAURE (Consortium for Equine Research) and the Regional Council of Normandy.

## References

- Baranski Z., de Jong Y., Ilkova T., Peterse E.F.P., Cleton-Jansen A.-M., van de Water B., Hogendoorn P.C.W., Bovée J.V.M.G., Danen E.H.J., 2015. Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget* 6(34):36113–36125.
- Bartel D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173(1):20–51.
- Bartel D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–33.
- Botti G., Giordano A., Feroce F., Chiara A.R., Cantile M., 2019. Noncoding RNAs as circulating biomarkers in osteosarcoma patients. *J. Cell. Physiol.* 234(11):19249–19255.
- Bovée J.V.M.G., Hogendoorn P.C.W., Wunder J.S., Alman B.A., 2010. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 10(7):481–8.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M., 2002. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(24):15524–15529.
- Collins M., Wilhelm M., Conyers R., Herschtal A., Whelan J., Bielack S., Kager L., Kühne T., Sydes M., Gelderblom H., Ferrari S., Picci P., Smeland S., Eriksson M., Petrilli A.S., Bleyer A., Thomas D.M., 2013. Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 31(18):2303–12.
- Dela Cruz F.S., 2013. Cancer Stem Cells in Pediatric Sarcomas. *Front. Oncol.* 3.
- Gebert L.F.R., MacRae I.J., 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20(1):21–37.
- Gelderblom H., Hogendoorn P.C., Dijkstra S.D., van Rijswijk C.S., Krol A.D., Taminiau A.H.M., Bovée J.V.M.G., 2008. The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *Oncologist* 13(3):320–329.
- Hamam R., Ali A.M., Alsaleh K.A., Kassem M., Alfayez M., Aldahmash A., Alajez N.M., 2016. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel

panel of circulating microRNA for early detection. *Sci. Rep.* 6:25997.

Huang E., Liu R., Chu Y., 2015. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. *Future Oncol.* 11(16):2351–2363.

Jeong W., Kim H.-J., 2018. Biomarkers of chondrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* 71(7):579–583.

Jones K.B., Salah Z., Del Mare S., Galasso M., Gaudio E., Nuovo G.J., Lovat F., LeBlanc K., Palatini J., Randall R.L., Volinia S., Stein G.S., Croce C.M., Lian J.B., Aqeilan R.I., 2012. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res.* 72(7):1865–1877.

de Jong Y., van Maldegem A.M., Marino-Enriquez A., de Jong D., Suijker J., Briaire-de Bruijn I.H., Kruisselbrink A.B., Cleton-Jansen A.-M., Szuhai K., Gelderblom H., Fletcher J.A., Bovée J.V.M.G., 2016. Inhibition of Bcl-2 family members sensitizes mesenchymal chondrosarcoma to conventional chemotherapy: report on a novel mesenchymal chondrosarcoma cell line. *Lab. Invest.* 96(10):1128–37.

de Jong Y., Monderer D., Brandinelli E., Monchanin M., van den Akker B.E., van Oosterwijk J.G., Blay J.Y., Dutour A., Bovée J.V.M.G., 2018. Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma. *Oncogenesis* 7(9):74.

Kansara M., Teng M.W., Smyth M.J., Thomas D.M., 2014. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* 14(11):722–35.

Ke N., Wang X., Xu X., Abassi Y.A., 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol. Biol.* 740(1):33–43.

Kubo T., Sugita T., Shimose S., Matsuo T., Arihiro K., Ochi M., 2008. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90(3):364–370.

Legendre F., Dudhia J., Pujol J.-P., Bogdanowicz P., 2003. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J. Biol. Chem.* 278(5):2903–12.

Legendre F., Heuze A., Boukerrouche K., Leclercq S., Boumediene K., Galera P., Domagala F., Pujol J.-P., Ficheux H., 2009. Rhein, the metabolite of diacerhein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis. *Scand. J. Rheumatol.* 38(2):104–11.

Li W., Liu M., Feng Y., Xu Y.-F., Huang Y.-F., Che J.-P., Wang G.-C., Yao X.-D., Zheng J.-H., 2014. Downregulated miR-646 in clear cell renal carcinoma correlated with tumour metastasis by targeting the nin one binding protein (NOB1). *Br. J. Cancer* 111(6):1188–1200.

Liu C.-W., Liu D., Peng D., 2019. Long non-coding RNA ZFAS1 regulates NOB1 expression through interacting with miR-646 and promotes tumorigenesis in osteosarcoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23(8):3206–3216.

Longhi A., Errani C., De Paolis M., Mercuri M., Bacci G., 2006. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat. Rev.* 32(6):423–36.

Maximov V. V., Akkawi R., Khawaled S., Salah Z., Jaber L., Barhoum A., Or O., Galasso M., Kurek K.C., Yavin E., Aqeilan R.I., 2019. MiR-16-1-3p and miR-16-2-3p possess strong tumor suppressive and antimetastatic properties in osteosarcoma. *Int. J. cancer* 145(11):3052–3063.

Meyers P.A., Healey J.H., Chou A.J., Wexler L.H., Merola P.R., Morris C.D., Laquaglia M.P., Kellick M.G., Abramson S.J., Gorlick R., 2011. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer* 117(8):1736–1744.

Mirabello L., Troisi R.J., Savage S.A., 2009. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* 115(7):1531–1543.

Nazeri E., Gouran Savadkoohi M., Majidzadeh-A K., Esmaeili R., 2018. Chondrosarcoma: An overview of clinical behavior, molecular mechanisms mediated drug resistance and potential therapeutic targets. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 131(September):102–109.

Onishi A.C., Hincker A.M., Lee F.Y., 2011. Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* 2011:381564.

van Oosterwijk J.G., Herpers B., Meijer D., Briaire-de Bruijn I.H., Cleton-Jansen A.M., Gelderblom H., van de Water B., Bovée J.V.M.G., 2012. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 23(6):1617–26.

Palmini G., Marini F., Brandi M.L., 2017. What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma? *Molecules* 22(3).

Prensner J.R., Chen W., Han S., Iyer M.K., Cao Q., Kothari V., Evans J.R., Knudsen K.E., Paulsen M.T., Ljungman M., Lawrence T.S., Chinnaiyan A.M., Feng F.Y., 2014. The long non-coding RNA PCAT-1 promotes prostate cancer cell proliferation through cMyc. *Neoplasia*

16(11):900–908.

Pu F., Chen F., Shao Z., 2016. MicroRNAs as biomarkers in the diagnosis and treatment of chondrosarcoma. *Tumour Biol.* 37(12):15433–15436.

Pu M., Chen J., Tao Z., Miao L., Qi X., Wang Y., Ren J., 2019. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 76(3):441–451.

Sampson V.B., Yoo S., Kumar A., Vetter N.S., Kolb E.A., 2015. MicroRNAs and Potential Targets in Osteosarcoma: Review. *Front. Pediatr.* 3:69.

Shen D., Zhao H., Zeng P., Song J., Yang Y., Gu X., Ji Q., Zhao W., 2020. Circular RNA hsa\_circ\_0005556 Accelerates Gastric Cancer Progression by Sponging miR-4270 to Increase MMP19 Expression. *J. Gastric Cancer* 20(3):300–312.

Sun G., Ding X., Bi N., Wang Z., Wu L., Zhou W., Zhao Z., Wang J., Zhang Weimin, Fan J., Zhang WenJue, Dong X., Lv N., Song Y., Zhan Q., Wang L., 2019. Molecular predictors of brain metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma. *PLoS Genet.* 15(2):e1007888.

Sun X., Geng X., Zhang J., Zhang C., 2015. miRNA-646 suppresses osteosarcoma cell metastasis by downregulating fibroblast growth factor 2 (FGF2). *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36(3):2127–2134.

Tokuhsa M., Ichikawa Y., Kosaka N., Ochiya T., Yashiro M., Hirakawa K., Kosaka T., Makino H., Akiyama H., Kunisaki C., Endo I., 2015. Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS One* 10(7):e0130472.

Veys C., Benmoussa A., Contentin R., Duchemin A, Brotin E., Lafont J., Saintigny Y., Poulain L., Denoyelle C., Demoor M., Legendre F. and Galéra P. Tumor suppressive role of miR-342-5p in human chondrosarcoma cells and 3D organoids. Submitted to *Cell & Biosciences*.

Veys C., *et al.* Tumor suppressive role of miR-342-5p and miR-491-5p in human osteosarcoma cells.

Wang J., Liu S., Shi J., Li J., Wang S., Liu H., Zhao S., Duan K., Pan X., Yi Z., 2019. The Role of miRNA in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Osteosarcoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* 34(10):605–613.

Wang Y., Li C.-F., Sun L.-B., Li Y.-C., 2020. microRNA-4270-5p inhibits cancer cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting SATB2. *Hum. Cell* 33(4):1155–1164.

Wang Z.-X., Yang J.-S., Pan X., Wang J.-R., Li J., Yin Y.-M., De W., 2010. Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone* 47(2):445–54.

Wu X., Cai Z., Lou L., Zhu Y., 2012. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* 36(2):212–6.

Yang L., Liu G., Xiao S., Wang L., Liu X., Tan Q., Li Z., 2020. Long Noncoding MT1JP Enhanced the Inhibitory Effects of miR-646 on FGF2 in Osteosarcoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* 35(5):371–376.

Yoshitaka T., Kawai A., Miyaki S., Numoto K., Kikuta K., Ozaki T., Lotz M., Asahara H., 2013. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* 31(12):1992–8.

Zhu H.-R., Huang R.-Z., Yu X.-N., Shi X., Bilegsaikhan E., Guo H.-Y., Song G.-Q., Weng S.-Q., Dong L., Janssen H.L.A., Shen X.-Z., Zhu J.-M., 2018. Microarray Expression Profiling of microRNAs Reveals Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 245(2):89–98.

Zou A., Liu X., Mai Z., Zhang J., Liu Z., Huang Q., Wu A., Zhou C., 2019. LINC00472 Acts as a Tumor Suppressor in NSCLC through KLLN-Mediated p53-Signaling Pathway via MicroRNA-149-3p and MicroRNA-4270. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 17:563–577.

#### **Additional figure legends:**

**Figure S1: Analysis of miRNA-induced cytotoxicity and impact of miRNAs on the metabolic activity of SW1353 cells.** SW1353 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 2. The treatment with CDDP (1 µg/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were then carried out 72 h post-transfection. (A) The metabolic activity of cells was evaluated and expressed as mean of OD ± SD of 4 independent experiments. (B) The cytotoxicity of the miRNAs was evaluated and expressed as mean of RLU ± SD of 4 independent experiments. The significance of the results between miR-Ctrl and miRNA-treated cells was assessed using one-way ANOVA (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

**Figure S2: Characterization of the effects of miR-342 and miR-4270 on SW1353 cells.** SW1353 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 2. The treatment with CDDP (1 µg/ml) was performed 48 h post-transfection for 24 h. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was acquired after DAPI staining as described in the “Materials and Methods” section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of at least 4 independent experiments.

**Figure S3: Characterisation of the effects of miR-342 and miR-4270 on HOS cells.** HOS cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 3. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was acquired after DAPI staining as described in the “Materials and Methods” section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 4 independent experiments.

**Figure S4: Characterisation of the effects of miR-342 and miR-4270 on MG63 cells.** MG63 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 4. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was acquired after DAPI staining as described in the “Materials and Methods” section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 4 independent experiments.

**Figure S5: Characterization of the effects of miR-342 and miR-4270 on SaOS-2 cells.** SaOS-2 cells were transfected with miRNAs 24 h after seeding as described in figure 5. Analyses were carried out 72 h post-transfection. In the left part of each panel, cell morphology was obtained by photonic microscopy at the end of the experiment. In the middle part of each panel, nuclear morphology was acquired after DAPI staining as described in the “Materials and Methods” section. White arrowheads show cells with condensed and/or fragmented chromatin and cellular debris. In the right part of each panel, DNA content histograms were obtained by flow cytometry. Images shown are representative of 4 independent experiments.

Figure S1

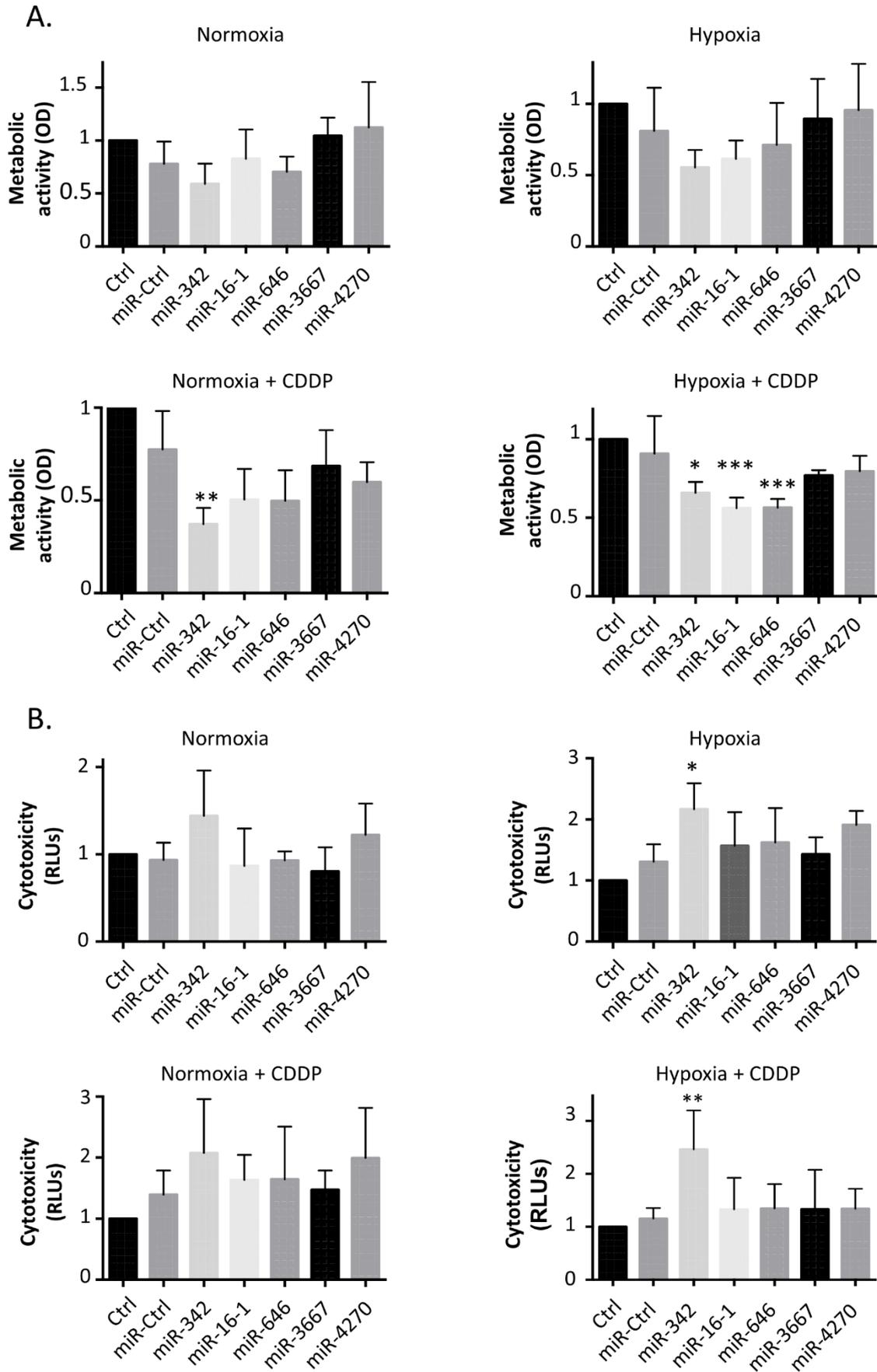


Figure S2

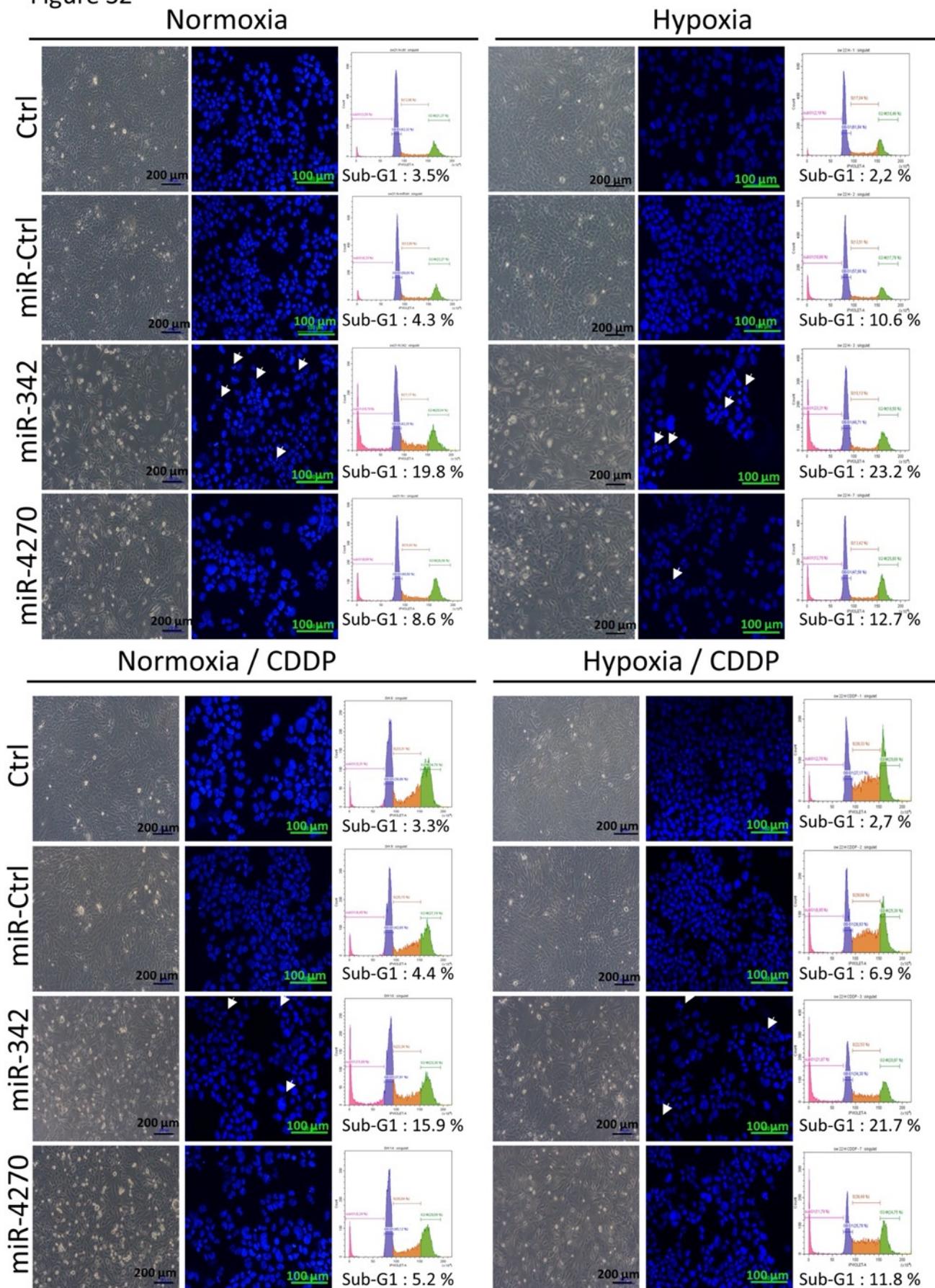


Figure S3

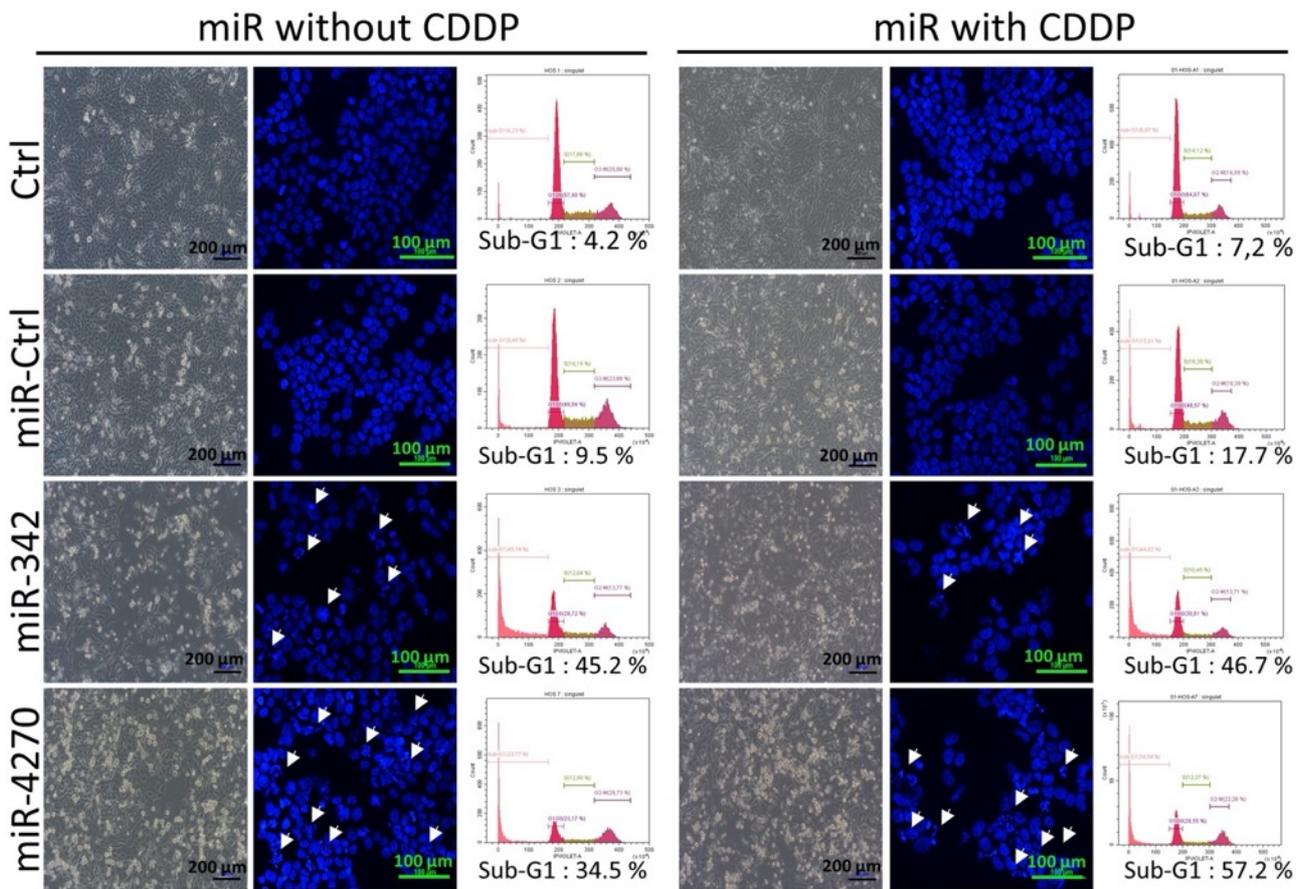


Figure S4

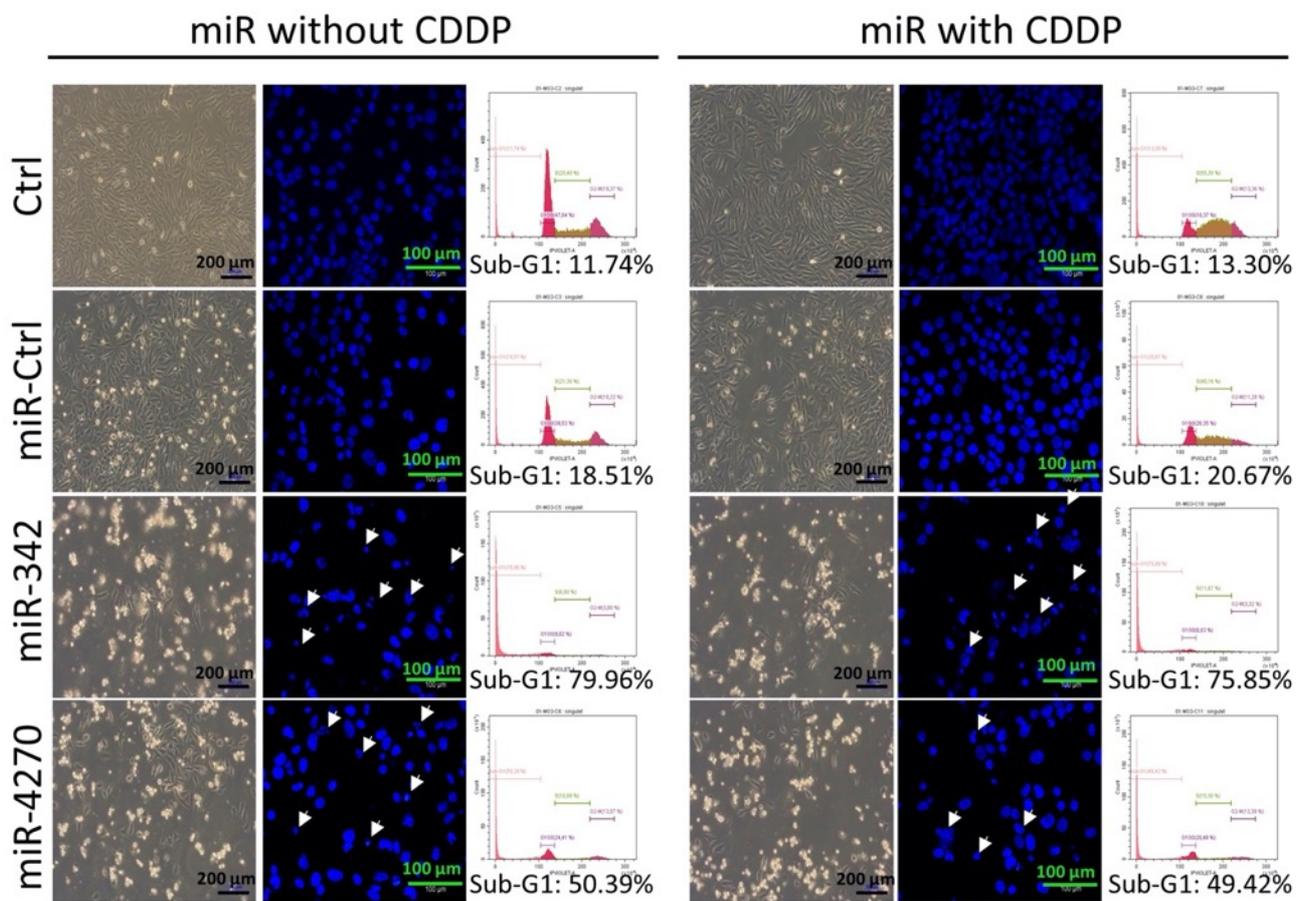
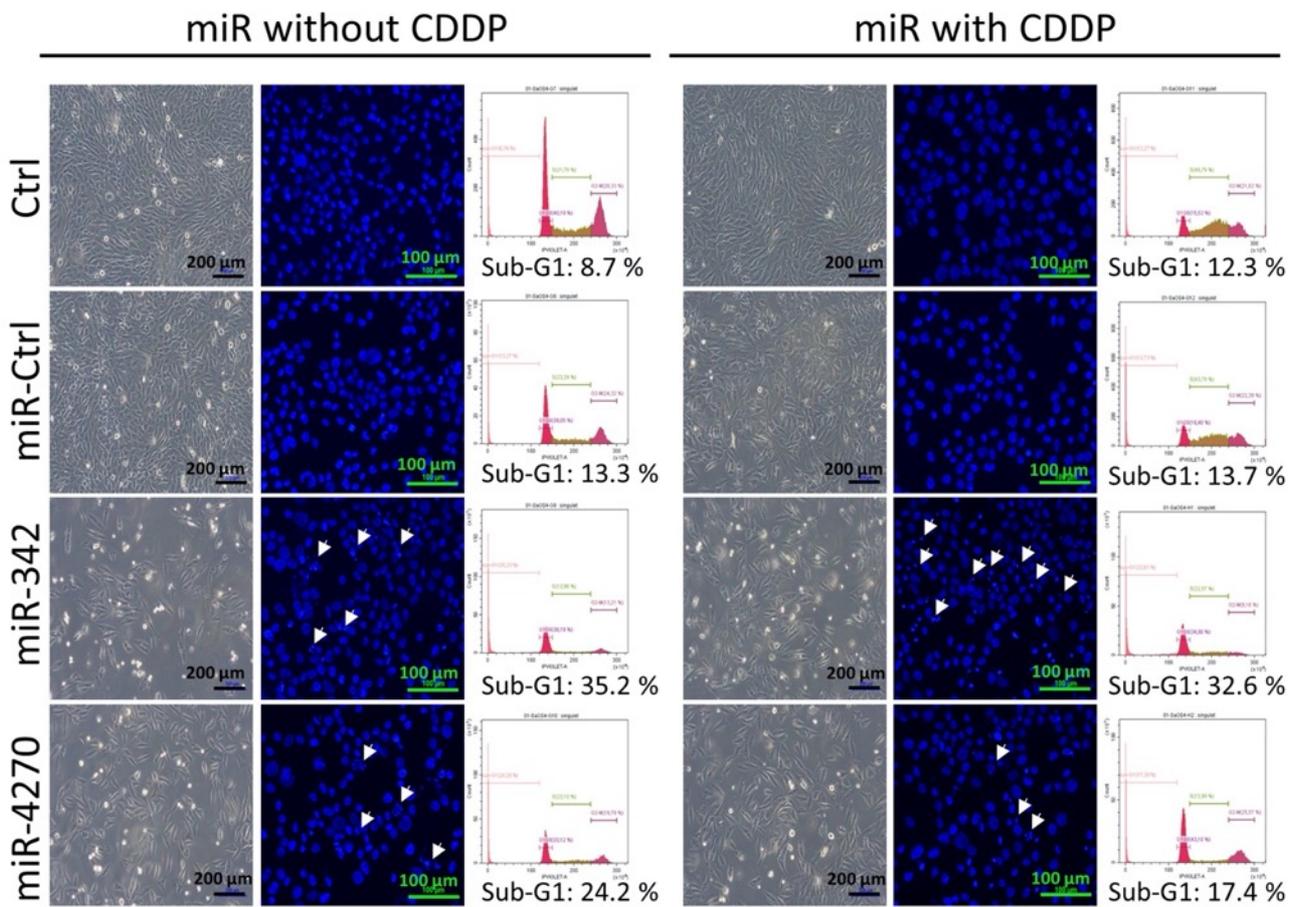


Figure S5



### III. Principaux résultats et conclusions de l'étude

Pour cette étude, nous avons utilisé les données obtenues lors du criblage haut débit d'une banque de 1200 miRNAs. Parmi les miRNAs identifiés comme potentiellement cytotoxiques, nous avons sélectionné, par une analyse *in silico*, les miRNAs qui possédaient des cibles impliquées dans les voies de signalisation régulant la prolifération et l'apoptose comme les membres de la famille Bcl-2. Ainsi, 4 miRNAs ont été sélectionnés : le miR-16-1-3p, le miR-646, le miR-3667-3p et le miR-4270. Le miR-342-5p a été utilisé comme témoin positif de cytotoxicité à la fois pour les lignées de CS et d'OS. Nous avons confirmé sa cytotoxicité sur les lignées SW1353, HOS, MG63 et SaOS-2 dans cet article. Les taux d'induction d'événements sub-G1 sont comparables à ceux des articles 1 et 2 (environ 3x plus d'événements sub-G1 dans toutes les lignées). Toutefois, la significativité des résultats a pu varier d'un article à un autre. La différence la plus marquante concerne une induction significative du pourcentage d'événements sub-G1 avec le miR-342-5p en présence de CDDP en hypoxie dans ce troisième article, alors que cette induction n'était pas significative dans l'article 1. La variabilité des pourcentages d'événements sub-G1 liée au miR-Ctrl et/ou au miR-342-5p peut expliquer ces différences. Dans cet article, nous avons obtenu des moyennes de  $4,4 \pm 1,7\%$  et  $14,4 \pm 7,1\%$  d'événements sub-G1 respectivement avec le miR-Ctrl et le miR-342-5p en présence de CDDP en hypoxie, soit 3,3 fois plus d'événements sub-G1 avec le miR-342-5p qu'avec le miR-Ctrl ( $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ). Ces moyennes étaient de  $6,1 \pm 4,9\%$  et  $16,5 \pm 11\%$  respectivement avec le miR-Ctrl et le miR-342-5p dans l'article 1, soit 4 fois plus d'événements sub-G1 avec le miR-342-5p qu'avec le miR-Ctrl ( $n = 4$ ), mais non significatif (analyse de variance à un facteur corrigée pour des analyses multiples). Ainsi, le fait que la variabilité des pourcentages d'événements sub-G1 soit plus élevée dans l'article 1 pourrait expliquer la non significativité des résultats. De plus, le pourcentage d'événements sub-G1 était aussi plus élevé que dans l'article 3.

Pour la validation fonctionnelle des miRNAs, nous avons dans un premier temps, évalué le potentiel cytotoxique des miRNAs sur la lignée de CS SW1353, puis sur la lignée d'OS HOS. Les effets cytotoxiques d'un seul miRNA, le miR-4270, ont été confirmés uniquement sur la lignée d'OS HOS. Des données non fournies sur leur potentiel anti-métabolique (dosage XTT) et cytotoxique (test de cytotoxicité) ont aussi permis de montrer que ces miRNAs étaient sans effet sur les lignées de CS CH2879 et OUMS-27. Par la suite, nous avons donc évalué les effets des 4 miRNAs sur deux autres lignées d'OS (MG-63 et SaOS-2). Aucun des miRNAs étudiés n'avait été identifié comme potentiellement chimiosensibilisateur lors du criblage haut débit

avec la technologie xCELLigence sur la lignée SW1353. Malgré tout, nous avons évalué leur potentiel effet chimiosensibilisateur afin de confirmer cette observation.

Pour valider l'effet cytotoxique des miRNAs, nous avons évalué l'activité métabolique des cellules, la cytotoxicité et la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Ainsi, plusieurs miRNAs ont permis de diminuer l'activité métabolique des 3 lignées d'OS, mais seul le miR-4270 a induit une cytotoxicité sur au moins 2 lignées d'OS. Le miR-4270 a aussi induit une augmentation significative des événements sub-G1 dans les lignées HOS et MG63. Nous avons donc conclu que **le miR-4270 exerçait un rôle cytotoxique sur certaines lignées d'OS**. Nous avons confirmé cet effet par western-blot où il induit un clivage de la PARP sur les 3 lignées d'OS et un clivage de la caspase-3 sur les lignées HOS et MG-63. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence une activation évidente de l'apoptose par le miR-4270 sur les lignées HOS et MG-63, et un effet apoptotique moindre sur la lignée SaOS-2. Ensuite, nous avons démontré que le miR-4270 diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 et qu'il augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak dans les 3 lignées d'OS, alors que son effet apoptotique ne semble pas significatif dans la lignée SaOS-2. De plus, **nous avons mis en évidence, pour la première fois, que Bcl-xL était une cible directe du miR-4270 dans la lignée HOS**.

**Le miR-4270 peut donc induire l'apoptose en inhibant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 et en favorisant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak. Ceci n'induit une cytotoxicité que sur certaines lignées d'OS.** Ce miRNA se comporte donc différemment selon le contexte cellulaire. Ici, notre miRNA serait un suppresseur de tumeur efficace uniquement dans les 2 lignées d'OS HOS et MG63, mais pas dans la lignée d'OS SaOS-2, ni dans la lignée de CS SW1353.

## D. Vectorisation d'un miRNA anti-tumoral à l'aide d'une bactérie colonisatrice de chondrosarcomes et d'ostéosarcomes

### I. Introduction

L'utilisation des miRNAs pour inhiber la croissance tumorale des sarcomes osseux représente une alternative thérapeutique intéressante, mais ils doivent être ciblés spécifiquement à la tumeur. En effet, leur capacité à cibler l'expression de nombreux gènes accentue le risque d'effets hors-cibles. De nombreux arguments sont en faveur des bactéries pour véhiculer ces miRNAs (Jia and Hua, 2009; Lage and Fruehauf, 2011; Ryan et al., 2006). L'unité de recherche BIOTARGEN, associée à l'unité U2RM, se sont donc intéressées à la vectorisation de miRNAs par des bactéries qui coloniseraient le CS et l'OS. Ainsi, en parallèle de l'identification de miRNAs anti-tumoraux pour le CS et l'OS par l'unité BIOTARGEN, les 2 unités ont mis en évidence deux bactéries colonisatrices de CS et d'OS. Ces bactéries lactiques Gram+, nommées *Eh* et *EfSI* pour des raisons de confidentialité, ont colonisé un modèle de CS humain généré en site orthotopique paratibial chez la souris immunodéprimée et un modèle de CS murin généré en site orthotopique paratibial chez le rat immunocompétent. Ces bactéries ont aussi colonisé ces mêmes types de modèles tumoraux pour l'OS (xénogreffes et allogreffes chez la souris). Ces résultats sont tout à fait novateurs, d'autant plus que ces souches bactériennes sont absolument non pathogènes pour l'Homme.

Par la suite, les deux souches bactériennes colonisatrices de CS ont été modifiées génétiquement par l'unité U2RM afin d'exprimer un pré-miRNA anti-tumoral, à savoir le pré-miR-342. Nous avons opté pour celui-ci car le miR-342-5p se révèle, dans nos études et à ce jour, le plus prometteur parmi les miRNAs identifiés comme cytotoxiques pour le CS. Pour cela, l'élément génétique codant le pré-miR-342 a été cloné en aval d'un promoteur bactérien constitutif (Pt\_constitutif) pour permettre l'expression maximale du pré-miRNA. Cette structure génétique a été clonée dans le plasmide bactérien pUCB2871, et introduite dans *E. coli*, puis électroporée dans les 2 souches *Eh* et *EfSI*. Les différentes vérifications d'expression du plasmide « pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 » ont été réalisées par séquençage et qPCR dans les 2 souches bactériennes. Aucun clone portant cette construction n'a pu être

obtenu avec la souche *EfSI*, alors que des constructions avec des plasmides inductibles avaient pourtant été validées dans les 2 souches. La souche *Eh* a donc été privilégiée pour la suite de l'étude. Par ailleurs, la colonisation des tumeurs était plus spécifique et plus homogène avec cette souche.

Par la suite, l'objectif associé à ma thèse a été de vérifier la fonctionnalité du pré-miRNA produit par la bactérie dans les cellules de CS. Cette étape est indispensable avant d'envisager d'autres modifications génétiques (module d'invasion et d'autolyse) permettant *in fine* de délivrer le miRNA synthétique dans les cellules tumorales *in vitro*, puis *in vivo* grâce à la bactérie *Eh*.

## II. Matériel et méthodes

### Culture cellulaire

La lignée cellulaire de CS SW1353 (ATCC® HTB-94) a été cultivée et traitée avec le milieu High glucose-Dulbecco's modified Eagle's (HG-DMEM, Biowest) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio), 3 µg/ml de ciprofloxacine (Sigma Aldrich) et 0,5 µg/ml d'amphotéricine (Eurobio). Les lignées cellulaires de CS OUMS27 et CH2879 ont été fournies gracieusement par le Dr Y. Saintigny (LARIA, Caen, France), qui les avait obtenues initialement de J.V.M.G Bovée (Department of Pathology, Leiden, Pays-Bas). Ces cellules ont été cultivées et traitées avec le milieu RPMI 1640 (Eurobio) supplémenté avec 10 % de SVF et un mélange de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) (Eurobio).

Les cellules ont été certifiées sans mycoplasmes après analyse PCR. Elles ont été maintenues dans une étuve avec une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C.

### Extraction des petits et longs ARNs produits par la souche *Eh* (Unité U2RM)

La souche *Eh* a été modifiée génétiquement pour transcrire le plasmide pUCB2871 vide ou le plasmide pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342. Le plasmide pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 possède un terminateur nécessaire à l'arrêt de la transcription du pré-miR-342 par la bactérie. Les petits ARNs (< 200 nucléotides) et les grands ARNs (> 200 nucléotides) produits par la souche *Eh* sauvage ou modifiée, ont été extraits grâce au kit « Nucleospin miRNA » (Macherey-Nagel). Les effets des ARNs incluant les transcrits de PUCB2871 et de pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342, ont été comparés à ceux du miR-342-5p commercialisé par Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). La concentration massique des ARNs extraits a été quantifiée à l'aide d'un Nanodrop. Du fait de la présence de

différents ARNs dans ces extraits, il n'a pas été possible d'établir la concentration molaire du pré-miR-342 dans ces extraits. Ces extraits ont donc été utilisés à des concentrations massiques équivalentes à celles utilisées avec le miR-342-5p commercial (20 nM équivaut à 269,5 ng/ml) et le miR-Ctrl (20 nM équivaut à 281,5 ng/ml) ; soit  $1X \approx 226$  à  $366$  ng/ml pour les extraits contenant le plasmide pUCB2871 et  $1X \approx 214,3$  à  $317,6$  ng/ml avec les extraits contenant pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 (variabilité inhérente aux différents échantillons).

### **Transcription *in vitro* du pré-miR-342 (Unité U2RM)**

A partir de la construction « Pt\_constitutif/pré-miR-342 » dans le plasmide pUCB2871, le pré-miR-342 a été amplifié par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques du pré-miR-342, de manière à obtenir (i) un amplicon correspondant au pré-miR-342 sans terminateur (TIV-pré-miR-342) et (ii) un amplicon correspondant au pré-miR-342 avec un terminateur à l'extrémité 3' (TIV-pré-miR-342-TER). Les amplicons ont ensuite été transcrits *in vitro* grâce au kit « Riboprobe *in vitro* Transcription Systems-Promega » puis traités par la DNase I et purifiés, avant de tester leur efficacité sur les lignées de CS. Les concentrations molaires des transcrits *in vitro* ont été calculées par qPCR.

### **Purification du pré-miR-342 produit à partir des bactéries (Unité U2RM)**

La méthode de purification du pré-miR-342 produit par la bactérie *Eh* a été mise au point en utilisant le système de liaison « biotine/streptavidine » grâce au kit « Dynabeads™ Streptavidine Trial Kit-InVitrogen ». Un oligonucléotide complémentaire au miR-342 contenant une queue biotine à son extrémité 3' a été désigné. Après incubation de ce dernier avec des nanoparticules magnétiques enrobées de streptavidine (type M-280), l'extrait de petits ARNs produit par la souche *Eh*-pUCB2871-pré-miR-342 (avec terminateur) a été ajouté au complexe « nanoparticules magnétiques de streptavidine/oligonucléotide marqué à la biotine ». Le pré-miR-342 a ensuite été élué par différentes étapes de lavage. Le pré-miR-342 produit par la bactérie avant et après purification a subi une rétro-transcription à l'aide du kit « miScriptII RT Kit-Qiagen ». Son expression a été déterminée par RT-qPCR (kit GoTaq qPCR MasterMix) en utilisant 2 oligonucléotides spécifiques du pré-miR-342 et comparée à celle du gène de référence 5S bactérien.

Les données fournies par l'unité U2RM montrent que le facteur de purification moyen était de 139 par rapport au gène 5S bactérien. Les concentrations molaires des différents

échantillons de pré-miR-342 purifié ont été calculées par qPCR (concentrations finales entre 2,5 et 30 pM selon les échantillons).

### **MiRNAs mimétiques et oligonucléotides**

Les miRNAs synthétiques ont été fournis par Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). Le miR-Contrôle (miR-Ctrl, MIMAT0000039) représente la séquence d'un miRNA de *C. elegans* validé pour avoir un minimum de séquence commune avec des miRNAs humains. Les miRNAs mimétiques humains utilisés sont : Hsa-miR-342-5p (miR-342 ou miR-342-5p, MIMAT0004694) et hsa-miR-342-3p (miR-342-3p, MIMAT0000753).

Les oligonucléotides correspondant à la séquence 5p ou 3p du miR-342 (oligo-miR-342-S-5p et oligo-miR-342-AS-3p) ont été obtenues chez Eurogentec : miR-342-S-5p 5'-AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA-3' et miR-342-AS-3p 5'-UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU-3'.

### **Transfection des miRNAs, des pré-miRNAs et des ARNs bactériens**

Les cellules ont étéensemencées à une densité de  $1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> pour la lignée SW1353,  $7,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> pour la lignée OUMS27 et  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> pour la lignée CH2879. Les cellules ont été transfectées 24 h après l'ensemencement avec 20 nM de miRNA mimétique et/ou d'ARN bactérien en utilisant l'INTERFERin™ (Polypus-Transfection) en accord avec les instructions du fournisseur. L'arrêt de la culture a été réalisé 72 h après la transfection.

### **Cytométrie en flux (CMF)**

Les cellules adhérentes ont été détachées avec de la trypsine. Le surnageant, contenant les cellules détachées a été centrifugé (1400 rpm, 10 min), rincé avec du PBS, fixé dans l'éthanol 70 % et stocké à -20 °C jusqu'à analyse. Les cellules ainsi fixées dans l'éthanol ont été centrifugées (3000 rpm, 10 min) et rincées avec du PBS pour enlever les traces d'éthanol. Après centrifugation (2000 rpm, 5 min), les cellules ont été reprises et incubées pour 30 min dans une solution de PBS contenant 20 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma Aldrich) et 100 µg/ml de RNase (Fisher Scientific). La distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire a été analysée par CMF en utilisant le cytoflex S Flow Cytometer (Beckman Coulter) et calculée avec le logiciel d'acquisition Cytexpert® (Beckman Coulter).

## **Analyses statistiques**

Toutes les expériences sur la lignée cellulaire SW1353 ont été répétées entre 2 et 5 fois. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD. La significativité des résultats a été évaluée par analyse multiple de la variance à 1 facteur (ANOVA) corrigée par le test de Dunnett pour une comparaison par rapport au miR-Ctrl ou au miR-342-5p, dans le cas de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Une p-value  $< 0,05$  est considérée comme étant significative : \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  et \* $p < 0,05$ .

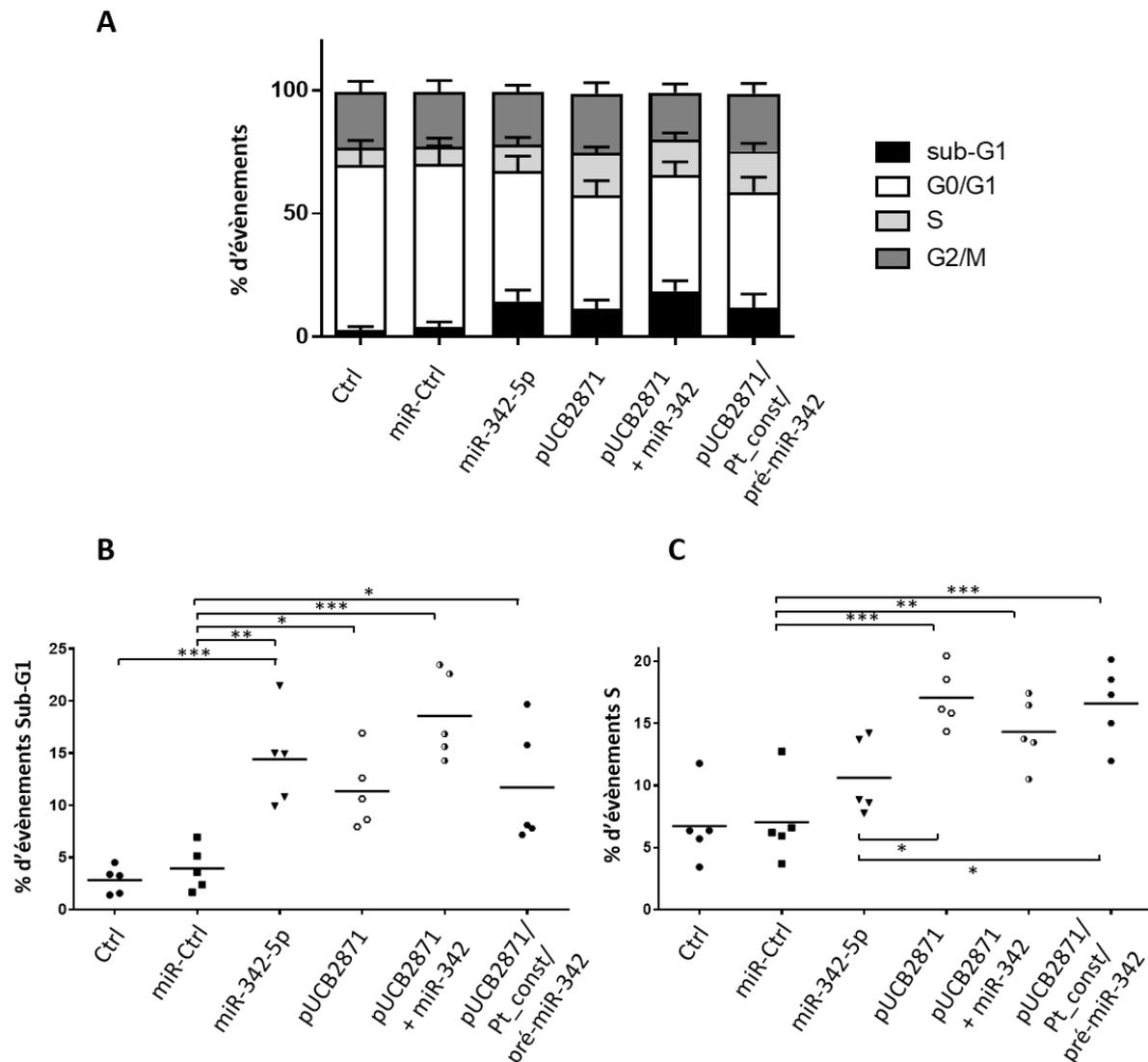
## **III. Résultats**

### **1. Etude des effets de petits ARNs extraits de la souche *Eh* modifiée sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome**

Dans un premier temps, les cellules de la lignée SW1353 ont été transfectées avec des miRNAs synthétiques (miR-Ctrl et miR-342-5p), ou avec des petits ARNs extraits de la souche *Eh* modifiée contenant soit le vecteur vide PUCB2871, soit le vecteur pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 ou « pré-miR-342 » (Figure 48). Des concentrations d'ARN équivalentes à celles du miR-342-5p ont été transfectées, de l'ordre de 269,5 ng/ml = 1X. Comme attendu, le miR-342-5p a un effet cytotoxique significatif avec 14,4% des cellules en phase sub-G1 en moyenne, pour 3,9% seulement avec le miR-Ctrl, soit 3,7 fois plus d'effet cytotoxique avec le miR-342-5p ( $p < 0,001$ , figure 48B). L'effet cytotatique du miR-342-5p est plus modéré (10,6% des cellules en phase S en moyenne), soit 1,5 fois plus de cellules en phase S par rapport au miR-Ctrl (non significatif, 7% de cellules en phase S avec le miR-Ctrl, figure 48C).

Avec l'extrait pUCB2871, la proportion de cellules bloquées en phase S (17,1% en moyenne) augmente de façon significative par rapport au miR-Ctrl (2,4 fois,  $p < 0,001$ , figure 48C) et est supérieure à celle obtenue avec le miR-342-5p. A noter que le blocage du cycle a été observé dès la plus faible concentration d'extrait pUCB2971 testée (0,25 X) et est restée stable à 17% en moyenne de cellules bloquées en phase S, quelle que soit la concentration testée (4 expériences, données non fournies). L'extrait pUCB287 induit une cytotoxicité significative (11,3% d'évènements sub-G1 en moyenne) au moins 3 fois supérieure à celle du miR-Ctrl ( $p < 0,05$ ). Des concentrations plus élevées (5X) d'extrait pUCB287 n'ont pas induit systématiquement de cytotoxicité avec une hétérogénéité entre les expériences (15%, 28,5%,

6% et 5 % de cellules en phase sub-G1 avec 4 expériences indépendantes, données non fournies).



**Figure 48 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de petits ARNs produits par la souche *Eh* modifiée sur la lignée de CS SW1353.** La culture de la lignée SW1353 est réalisée en normoxie. Les cellules sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec du miRNA contrôle (miR-Ctrl), du miRNA-342 synthétique (miR-342-5p), et des petits ARNs bactériens extraits de la souche *Eh* portant les constructions pUCB2871 ou pUCB2871/P t\_constitutif/pré-miR-342. L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. Les figures représentent l'analyse par CMF de 5 expériences indépendantes. Le pourcentage moyen de cellules dans les différentes phases du cycle est représenté en A. B et C correspondent respectivement aux pourcentages de cellules en phases sub-G1 et S du cycle cellulaire de chaque expérience ; la moyenne étant représentée par un trait horizontal. La significativité des résultats a été évaluée par analyse multiple de la variance à 1 facteur (ANOVA) corrigée par le test de Dunnett pour une comparaison par rapport au miR-Ctrl ou au miR-342-5p (seules les valeurs significatives sont présentées : \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  en B et C).

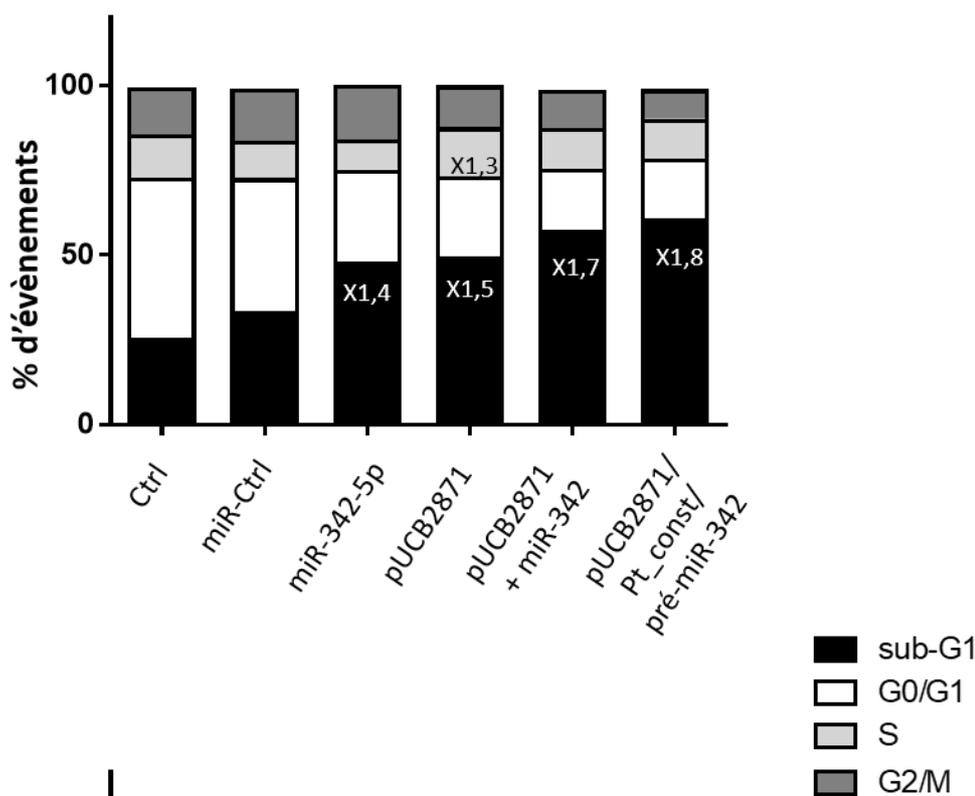
L'action combinée de l'extrait pUCB2871 et du miR-342-5p n'augmente pas de façon significative l'effet cytotoxique ou cytostatique induits par l'extrait PUCB2871 seul ou par le miR-342-5p seul. Nous trouvons plutôt moins de cellules bloquées en phase S du fait de l'augmentation de la proportion de cellules mortes.

L'extrait pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 induit une cytotoxicité pour 11,7% des cellules en moyenne, soit 3 fois plus que pour le miR-Ctrl, mais inférieure à celle du miR-342-5p du commerce (14,4%) et comparable à celle observée avec l'extrait pUCB2871 (11,3%). Le pourcentage moyen de cellules bloquées en phase S est également important (16,6 %) et équivaut à celui obtenu avec l'extrait pUCB2871 (17,1%).

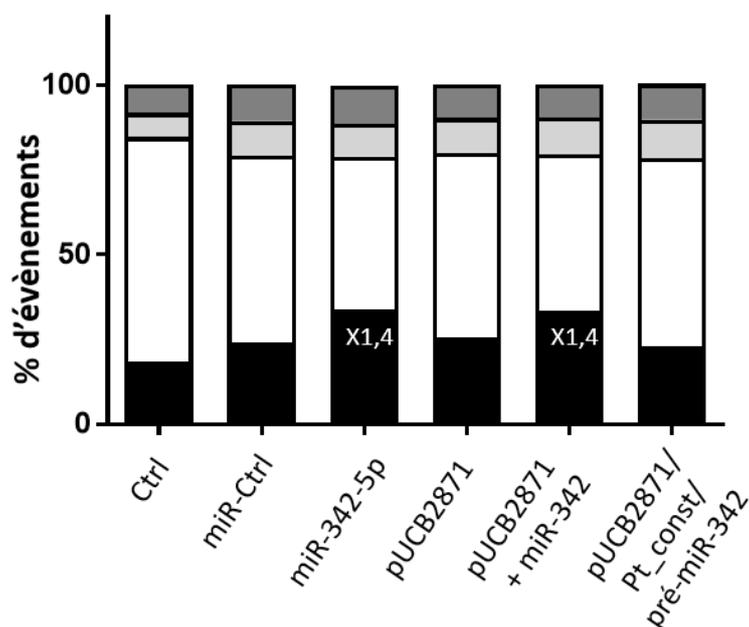
**En résumé, du fait d'un effet cytostatique fort et d'un effet cytotoxique plus modéré liés aux petits ARNs produits par la souche *Eh* portant le vecteur vide, nous ne pouvons pas conclure si notre extrait d'ARN « pré-miR-342 » bactérien est fonctionnel dans la lignée SW1353.**

Les extraits de petits ARNs de la souche *Eh* modifiée ont ensuite été testés lors d'une expérience préliminaire (n= 1) sur les deux lignées de CS répondant au miR-342-5p (Figure 49). Dans la lignée CH2879 (Figure 49A), l'extrait pUCB2871 induit à la fois un blocage en phase S (14,6% des cellules en phase S comparé à 11,1% pour le miR-Ctrl) et surtout une cytotoxicité (49,6% des cellules en phase sub-G1 comparé à 33,5% avec le miR-Ctrl). La cytotoxicité est comparable à celle du miR-342-5p (48,1% des cellules en phase sub-G1). L'action combinée de l'extrait pUCB2871 et du miR-342-5p induit plus de cytotoxicité (57,6% des cellules en phase sub-G1), qu'avec le miR-342-5p seul ou l'extrait PUCB2871. En conséquence, le taux de cellules en phase S (11,8%) est comparable à celui du miR-Ctrl. L'extrait pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 a plus d'effet que l'extrait vecteur vide ; il a aussi le plus d'effet avec 1,8 fois plus de cellules en phase sub-G1 (60,6%), sans blocage en phase S (11,6%). **L'extrait « pré-miR-342 » semble donc fonctionnel et cytotoxique dans la lignée CH2879, mais nous ne pouvons pas valider complètement cette conclusion du fait de l'impact de l'extrait « vecteur vide » sur cette lignée.** Cela reste toutefois à confirmer dans d'autres expériences.

### A-CH2879



### B-OUMS27



**Figure 49 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de petits ARNs produits par la souche *Eh* modifiée sur d'autres lignées de CS.** La culture des cellules est réalisée en normoxie. Les cellules de la lignée CH2879 (A) et OUMS-27 (B) sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec du miRNA contrôle (miR-Ctrl), du miRNA-342 synthétique (miR-342-5p), et des petits ARNs bactériens extraits de la souche *Eh* portant les constructions pUCB2871 ou pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342. L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. Les figures représentent l'analyse par CMF d'une expérience indépendante pour chaque lignée de CS et montrent le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les facteurs multiplicateurs indiqués correspondent à une augmentation du pourcentage de cellules en phase sub-G1 ou S par rapport au miR-Ctrl.

Dans la lignée OUMS-27, seuls le miR-342-5p et la combinaison de l'extrait pUCB2871 et du miR-342-5p induisent une augmentation de la proportion de cellules en phase sub-G1 par rapport au miR-Ctrl (34%, et 33,2% et 24% des cellules en phase sub-G1 respectivement ; Figure 49B). **L'extrait « pré-miR-342 » ne semble donc pas fonctionnel dans la lignée OUMS-27** et l'extrait « vecteur vide » n'a pas d'effet sur cette lignée (23% et 25,8% des cellules en phase sub-G1 respectivement). Cela reste aussi à confirmer par d'autres expériences.

## 2. Etude des effets des ARNs extraits de la souche *Eh* sauvage sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome

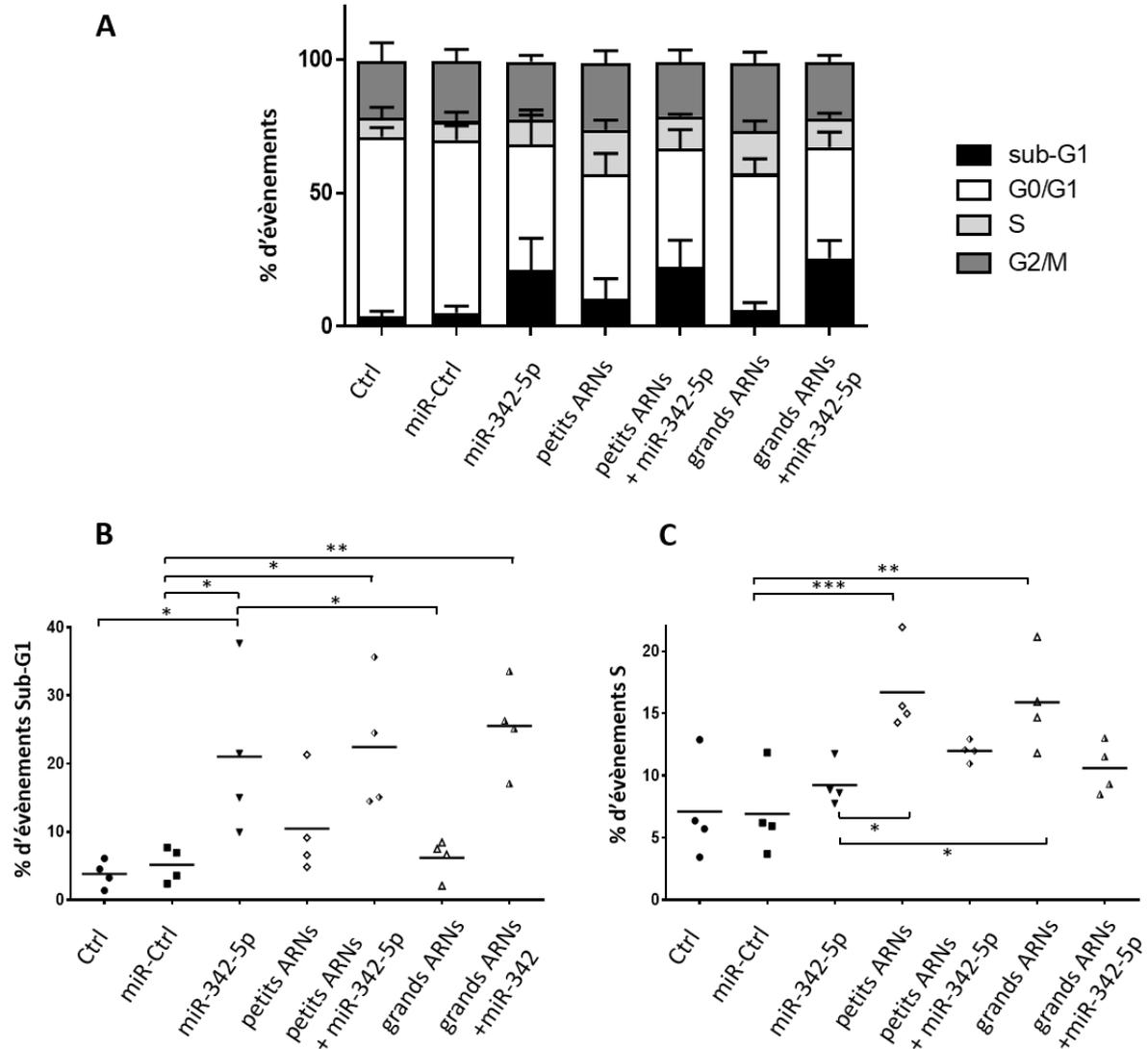
Pour savoir si les effets cytotostatiques ou cytotoxiques obtenus sont inhérents aux petits ARNs bactériens, nous avons testé les effets des petits ARNs (< 200 nucléotides) et grands ARNs (> 200 nucléotides) issus de la souche *Eh* sauvage sur des cellules de la lignée SW1353 de CS cultivées en normoxie (Figure 50). Des concentrations d'ARN équivalentes à celles du miR-342-5p ont été transfectées, de l'ordre de 269,5 ng/ml = 1X.

Nous avons constaté que les petits et grands ARNs de la souche *Eh* sauvage induisent un blocage significatif du cycle en phase S (16,7% des cellules avec les petits ARNs, 15,9% avec les grands ARNs, comparés à 6,9% avec le miR-Ctrl ;  $p < 0,01$  ou  $0,001$ ; Figure 50C). Ce blocage en phase S est comparable à celui observé précédemment avec les petits ARNs issus des souches Eh-pUCB2871 (17,1%) et Eh-pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 (16,6%). Les ARNs de la souche *Eh* sauvage n'induisent pas d'augmentation significative de la proportion de cellules en phase sub-G1 comparativement au miR-Ctrl (10,5% avec les petits ARNs, 6,2% avec les grands ARNs et 5,1% le miR-Ctrl ; Figure 50B). A noter que l'effet cytotatique des petits ARNs de la souche *Eh* semble indépendant de la concentration des extraits (17% de blocage maximum jusqu'à 9X ~ 2 µg/ml ; données non fournies).

L'ajout du miR-342-5p aux extraits de petits et grands ARNs bactériens induit une cytotoxicité comparable à celle du miR-342-5p seul (22,4% des cellules en phase sub-G1 avec les petits ARNs plus le miR-342-5p, 25,5% avec les grands ARNs plus le miR-342-5p, et 21% avec le miR-342-5p seul).

En conclusion, **l'effet cytotatique que nous avons observé avec la souche Eh-pUCB2871 vide serait donc inhérent aux ARNs bactériens de la souche *Eh***. L'effet cytotoxique moindre pourrait être lié à la fois à ces mêmes ARNs et à d'autres ARNs produits en réaction à la présence du plasmide ou par le plasmide lui-même dans le cas de pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342. Ces résultats sont novateurs et prometteurs puisque la

souche *Eh* non modifiée pourrait ralentir la progression du CS. L'implication de longs ARNs non codants dans l'infection bactérienne et la mort cellulaire a déjà été décrite pour des souches telles que *Salmonella* ou *Listeria* (Duval et al., 2017b). Ils pourraient ouvrir d'autres perspectives d'étude, mais ne nous renseignent pas sur la fonctionnalité du pré-miR-342 produit. Nous avons donc initié d'autres expériences pour répondre à cette question.



**Figure 50 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytotostatiques potentiels des petits et grands ARNs de la souche *Eh* sauvage sur la lignée de CS SW1353.** La culture des cellules de la lignée SW1353 est réalisée en normoxie. Les cellules sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec du miR contrôle (miR-Ctrl), du miRNA-342 synthétique (miR-342-5p), des petits et grands ARNs bactériens extraits de la souche *Eh* non modifiée. L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. Les figures représentent l'analyse par CMF de 4 expériences indépendantes. Le pourcentage moyen de cellules dans les différentes phases du cycle est représenté en A. B et C correspondent respectivement aux pourcentages de cellules en phases sub-G1 et S du cycle cellulaire de chaque expérience ; la moyenne étant représentée par un trait horizontal. La significativité des résultats a été évaluée par analyse multiple de la variance à 1 facteur (ANOVA) corrigée par le test de Dunett pour une comparaison par rapport au miR-Ctrl ou au miR-342-5p (seules les valeurs significatives sont présentées : \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  en B et C).

### 3. Etude des effets du pré-miR-342 produit par transcription *in vitro* sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome

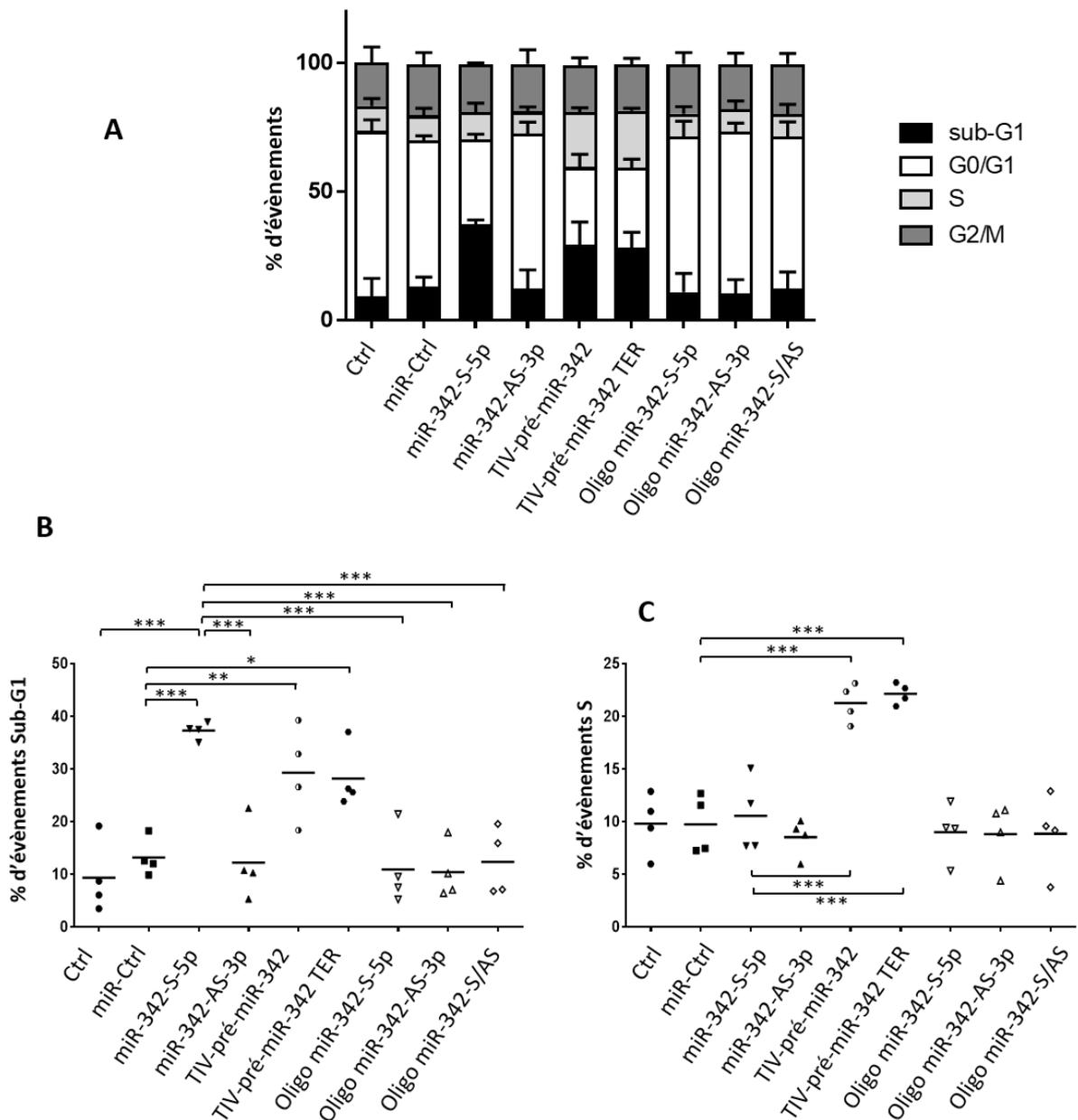
Pour rappel, les gènes des miRNAs sont transcrits sous forme de longs précurseurs appelés pri-miRNA, pris en charge par le complexe Drosha/DGCR8 pour former les pré-miRNAs. Le pré-miRNA est un ARN long d'environ 70 nucléotides replié en tige-boucle imparfaite par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de la séquence. Le pré-miRNA est clivé par l'enzyme Dicer qui libère un petit miRNA-db qu'on nomme communément miRNA ou miR. Ce miRNA est pris en charge par le complexe RISC, au sein duquel seul un des deux brins est conservé (brin guide). Ce brin guide fonctionnel (21 à 24 nucléotides) a une séquence partiellement complémentaire à la séquence 3'UTR des ARNm cibles dont il régule la traduction. La sélection d'un brin ou de l'autre s'effectue selon des principes complexes relevant de la thermodynamique (Medley et al., 2020).

Les miRNAs de synthèse sont des miRNA-db qui sont modifiés chimiquement pour favoriser la prise en charge du brin sens ou du brin antisens par le complexe RISC. Majoritairement, c'est le brin 5' (brin guide) qui est pris en charge par le complexe RISC (Medley et al., 2020). Nous avons choisi de faire produire un pré-miR-342 à la bactérie, en supposant qu'il serait pris en charge par la machinerie cellulaire eucaryote, avec le brin S-5p comme brin guide.

Pour étudier la fonctionnalité du pré-miR-342, nous avons mis au point une méthode de transcription *in vitro* du pré-miR-342 avec ou sans terminateur. En effet, le terminateur nécessaire à l'arrêt de la transcription du pré-miR-342 par la bactérie, pourrait éventuellement empêcher la fonctionnalité du pré-miR-342 produit par la bactérie.

Différentes formes du miR-342 ont été testés à 20 nM dans la lignée SW1353 : miR-342-S-5p, miR-342-AS-3p, oligonucléotides simples brins correspondants soit à la forme sens (oligo-miR-342-S-5p), soit à la forme antisens (oligo-miR-342-AS-3p) du miR-342, et oligonucléotides doubles brins des séquences S et AS appariées du miR-342 (oligo-miR-342-S/AS). Les effets des formes TIV-pré-miR-342 et TIV-pré-miR-342-TER (20 nM) ont été comparés à ceux des différentes formes du miR-342 (Figure 51).

Les oligonucléotides simples brins ou doubles brins du miR-342 n'induisent pas de cytotoxicité (10 à 12% des cellules en phase sub-G1 avec les oligonucléotides et 13,2% avec le miR-Ctrl), ni de blocage du cycle cellulaire (9% environ des cellules en phase S avec les oligonucléotides et 9,7% avec le miR-Ctrl). Ils ne sont donc pas fonctionnels.



**Figure 51 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de différentes formes du miR-342 sur la lignée de CS SW1353.** La culture des cellules de la lignée SW1353 est réalisée en normoxie. Les cellules sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec 20 nM du miR-contrôle (miR-Ctrl) ou de différents oligonucléotides synthétiques du miR-342 : formes matures sens (miR-342-S-5p) ou antisens (miR-342-AS-3p); transcrits *in vitro* du pré-miR-342 avec ou sans terminateur TIV-pré-miR-342: (TIV-pré-miR-342-TER et TIV-pré-miR-342 respectivement); oligonucléotides correspondants à la séquences sens (oligo-miR-342-S-5p) ou antisens (oligo-miR-342-AS-3p) du miR-342, et oligonucléotides des séquences S et AS appariées du miR-342 (oligo-miR-342-S/AS). L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. Les figures représentent l'analyse par CMF de 4 expériences indépendantes. Le pourcentage moyen de cellules dans les différentes phases du cycle est représenté en A. B et C correspondent respectivement aux pourcentages de cellules en phases sub-G1 et S du cycle cellulaire de chaque expérience ; la moyenne étant représentée par un trait horizontal. La significativité des résultats a été évaluée par analyse multiple de la variance à 1 facteur (ANOVA) corrigée par le test de Dunnett pour une comparaison par rapport au miR-Ctrl ou au miR-342-5p (seules les valeurs significatives sont présentées : \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  en B et C).

Les oligonucléotides simples brins, très sensibles aux RNAses, sont sans doute dégradés et les doubles brins, faute de modification chimique les stabilisant sont aussi sans doute dégradés.

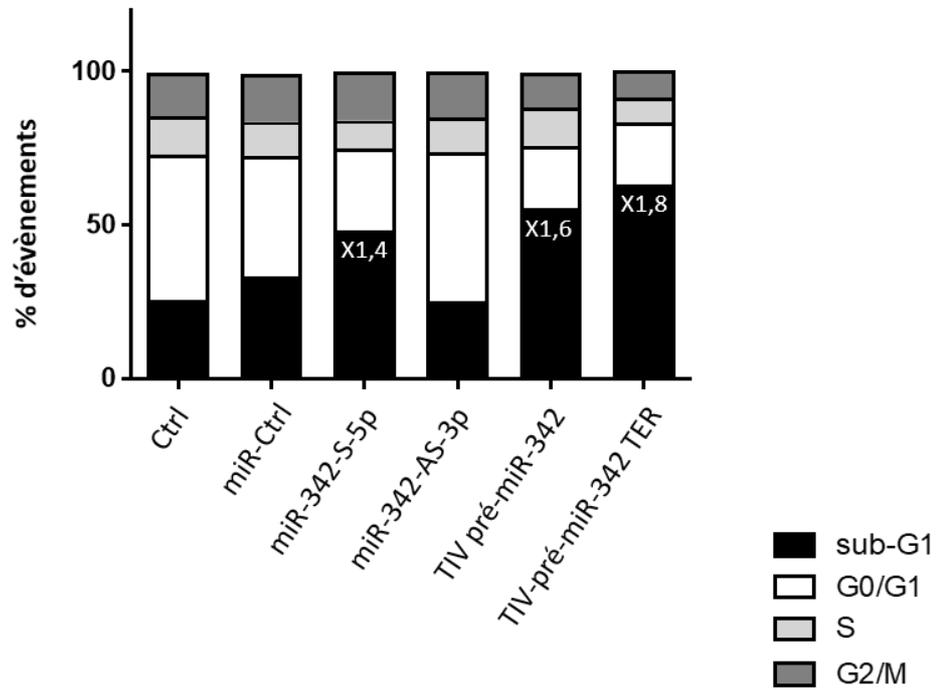
Le miR-342-AS-3p n'a pas d'effet cytotoxique (12,2% de cellules en phase sub-G1) ou cytostatique (8,5% des cellules en phase S) sur cette lignée, alors que le miR-342-5p est, comme nous l'avons déjà observé, cytotoxique sur cette lignée avec 2,8 fois plus de cellules en phase sub-G1 comparé au miR-Ctrl ( $p < 0,001$ ; 37,3% de cellules en phase sub-G1).

Les transcrits *in vitro* du pré-miR-342, avec ou sans terminateur, ont à la fois un effet cytotoxique et cytostatique sur cette lignée. On observe en moyenne 2,2 fois plus de cellules en phase sub-G1 (28,8% en moyenne) et en phase S (21,7% en moyenne) pour ces deux transcrits. Ces transcrits ont, d'après l'analyse statistique, le même effet cytotoxique que le miR-342-5p (pas de différence significative dans la proportion de cellules en phase sub-G1), mais un effet cytostatique qui se démarque (en moyenne 2 fois plus de cellules en phase S qu'avec le miR-342-5p,  $p < 0,001$ ). **Les formes TIV-pré-miR-342 et TIV-pré-miR-342-TER sont donc fonctionnelles dans la lignée SW1353.** De plus, au vu des effets différents observés entre le miR-342-5p et le miR-342-3p, le brin pris en charge par le pré-miR-342 produit par la bactérie semble bien être le brin 5'.

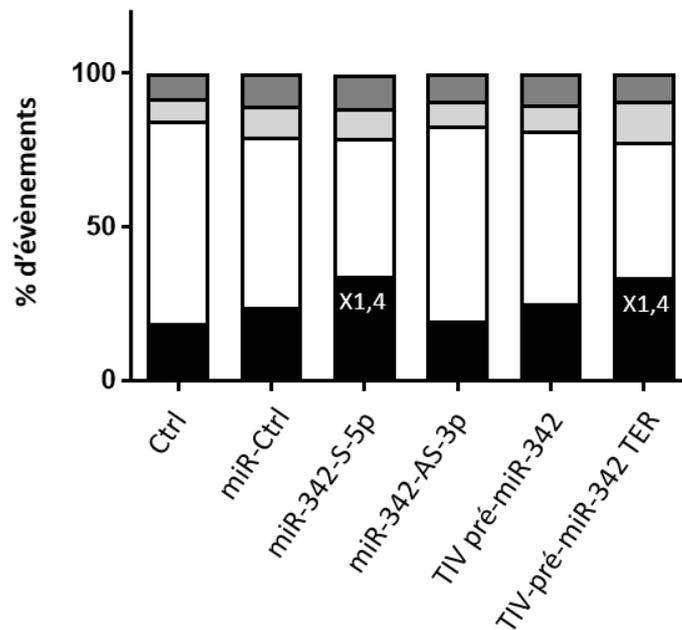
Les transcrits *in vitro* du pré-miR-342 ont ensuite été testés dans une expérience préliminaire sur les lignées CH2879 et OUMS-27 (Figure 52). Dans la lignée CH2879, ces transcrits, et en particulier le transcrit avec terminateur TIV-TER, ont plus d'effet cytotoxique que le miR-342-5p, sans effet cytostatique (Figure 52A). On dénombre 48,1%, 55,3%, 63% et 33,5% d'évènements sub-G1 avec respectivement le miR-342-5p, les transcrits TIV et TIV-TER, et le miR-Ctrl. Le miR-342-3p n'a pas d'effet cytotoxique avec 25,1% des cellules en phase sub-G1. **Les formes TIV-pré-miR-342 et TIV-pré-miR-342-TER semblent donc également fonctionnelles dans la lignée CH2879, mais cela reste à confirmer par d'autres expériences.**

Dans l'expérience préliminaire sur la lignée OUMS-27, seul le transcrit *in vitro* avec terminateur TIV-TER a le même effet cytotoxique que le miR-342-5p (Figure 52B). On dénombre 34%, 25,4%, 33,8% et 24% d'évènements sub-G1 avec respectivement le miR-342-5p, les transcrits TIV et TIV-TER, et le miR-Ctrl. Le miR-342-3p n'a pas d'effet cytotoxique avec 19,6% des cellules en phase sub-G1. Le transcrit TIV-TER pourrait aussi avoir un effet cytostatique avec 13% des cellules en phase S comparé à 10% avec le miR-Ctrl. **Seule la forme TIV-pré-miR-342-TER semble donc fonctionnelle dans la lignée OUMS-27.** Néanmoins, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer les effets observés.

### A-CH2879



### B-OUMS27



**Figure 52 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques de différentes formes du miR-342 sur d'autres lignées de CS.** La culture des cellules est réalisée en normoxie. Les cellules de la lignée CH2879 (A) et OUMS-27 (B) sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec 20 nM de miR-contrôle (miR-Ctrl) ou de différents oligonucléotides synthétiques du miR-342 : formes matures sens (miR-342-S-5p) ou antisens (miR-342-AS-3p) ; transcrits *in vitro* du pré-miR-342 avec ou sans terminateur TIV-pré-miR-342: (TIV-pré-miR-342-TER et TIV-pré-miR-342 respectivement). L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. Les figures représentent l'analyse par CMF d'une expérience indépendante pour chaque lignée de CS et montrent le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les facteurs multiplicateurs indiqués correspondent à une augmentation du pourcentage de cellules en phase sub-G1 par rapport au miR-Ctrl.

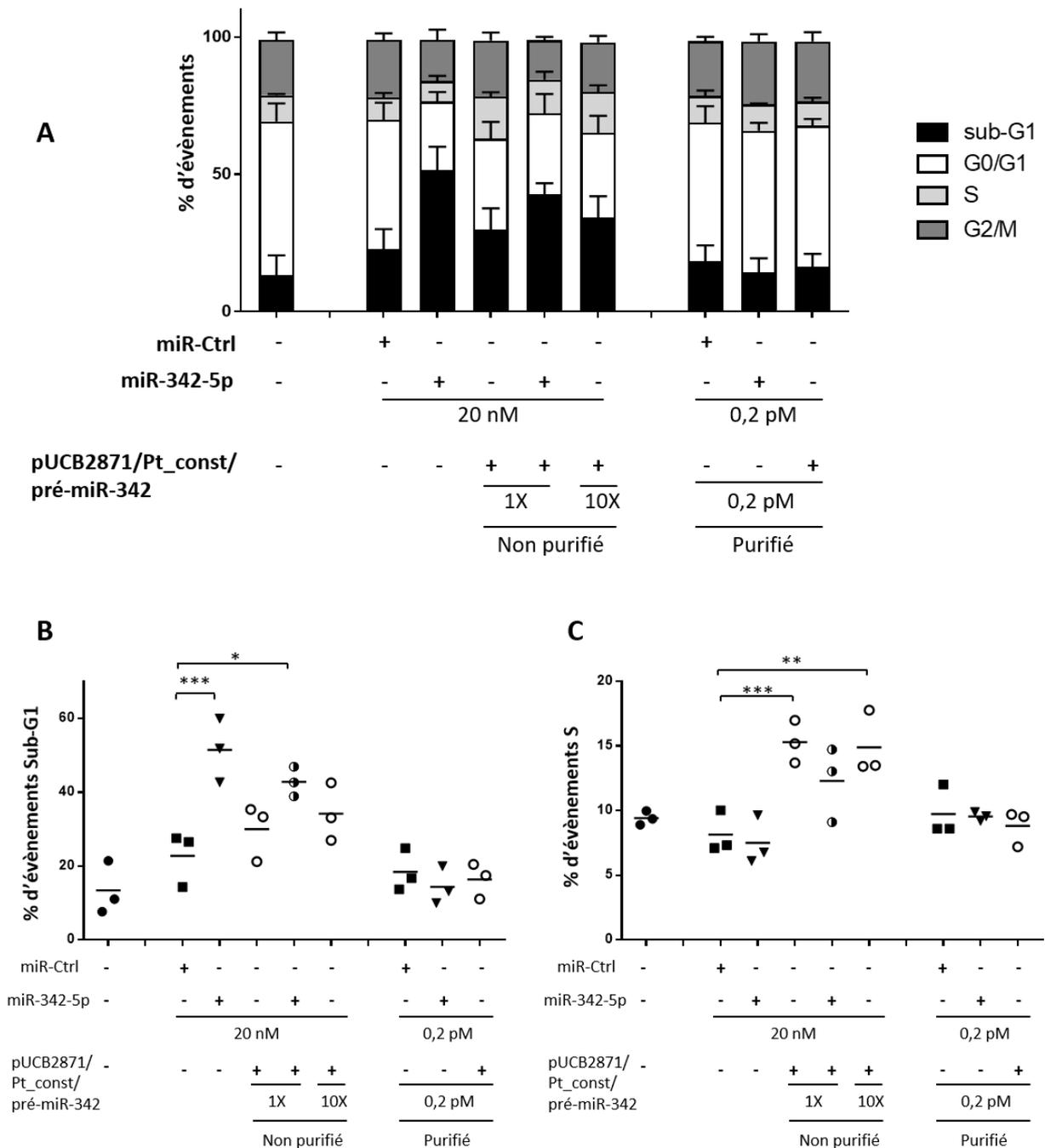
#### 4. Etude des effets du pré-miR-342 produit par la souche *Eh* modifiée sur des cultures de chondrocytes de chondrosarcome.

Pour valider définitivement la fonctionnalité du pré-miR-342, celui-ci a été purifié à partir d'extraits de petits ARNs de la souche Eh-pUCB2871-pré-miR-342 et a été testé sur la lignée de CS SW1353 (Figure 53).

Comme décrit précédemment, les extraits (1X ou 10X) de petits ARNs non purifiés extraits de la souche Eh-pUCB2871-pré-miR-342 permettent d'augmenter le nombre d'évènements sub-G1 de 1,3 et 1,5 fois respectivement (30% et 34,2% de cellules en phase sub-G1 ; figure 53B). Ces augmentations sont non significatives, sans doute compte tenu du faible nombre d'expériences (n= 3). De plus, la cytotoxicité induite par le miR-Ctrl est plus élevée que dans les expériences précédentes : 13,4% d'évènements sub-G1 en moyenne ici et seulement 3,9% en moyenne dans la figure 48. Les extraits de petits ARNs non purifiés à 1X et 10X augmentent significativement de 1,9 et 1,8 fois respectivement le blocage en phase S des cellules SW1353 (15,3% de cellules en phase S pour 1X, 14,9% pour 10X et 8,1% pour le miR-Ctrl). Le miR-342-5p à 20 nM induit une cytotoxicité significative avec 51,5% des cellules en phase sub-G1 ( $p < 0,001$ ). La combinaison d'extrait d'ARN non purifié à 1X et du miR-342-5p à 20 nM induit également une cytotoxicité avec 42,8% des cellules en phase sub-G1 ( $p < 0,05$ ).

Les concentrations de pré-miR-342 bactérien obtenues après la purification avec le kit « Dynabeads<sup>TM</sup> Straptavidine Trial Kit-InVitrogen » se sont avérées faibles (de 2,5 à 30 pM) dans les différents échantillons. De ce fait, nous n'avons pas pu tester le pré-miR-342 purifié à 20 nM comme habituellement avec le miR-342-5p synthétique, mais uniquement à 0,2 pM, soit 100 000 fois moins concentré. A cette concentration, le miR-342-5p synthétique n'induit pas d'effet cytotoxique sur les cellules de CS SW1353 (14,4% des cellules en phase sub-G1 et 18,4% avec le miR-Ctrl à 0,2 pM). De la même façon, le pré-miR-342 purifié, issu de la bactérie *Eh*, ne permet pas non plus d'induire un effet cytotoxique ou cytostatique sur les cellules de CS SW1353 (16,3% des cellules en phase sub-G1 et 8,8% en phase S).

Nous n'avons donc pas pu valider définitivement la fonctionnalité du pré-miR-342 bactérien, bien que son transcrit *in vitro* semble fonctionnel. Il nous faudra optimiser le rendement de production de pUCB2871/Pt\_constitutif/pré-miR-342 et/ou la méthode de purification du pré-miR-342 pour obtenir des concentrations de pré-miR-342 purifié compatibles avec nos expérimentations.



**Figure 53 : Analyse par CMF des effets cytotoxiques et cytostatiques du pré-miR-342 produit par la souche *Eh* modifiée sur la lignée de CS SW1353.** La culture de la lignée SW1353 est réalisée en normoxie. Les cellules sont transfectées 24 h après l'ensemencement avec un miRNA contrôle (miR-Ctrl), du miRNA-342 synthétique (miR-342-5p), et des petits ARNs bactériens non purifiés ou purifiés extraits de la souche *Eh* portant la construction pUCB2871/P<sub>t</sub> constitutif/pré-miR-342. Différentes concentrations du miR-342-5p synthétique (20 nM et 0,2 pM) et du pUCB2871/P<sub>t</sub> constitutif/pré-miR-342 (1X, 10X ou 0,2 pM) ont été testées. L'arrêt de la culture est réalisé 72 h post-transfection. La figure représente l'analyse par CMF de 3 expériences indépendantes. Le pourcentage moyen de cellules dans les différentes phases du cycle est représenté en A. B et C correspondent respectivement aux pourcentages de cellules en phases sub-G1 et S du cycle cellulaire de chaque expérience ; la moyenne étant représentée par un trait horizontal. La significativité des résultats a été évaluée par analyse multiple de la variance à 1 facteur (ANOVA) corrigée par le test de Dunnett pour une comparaison par rapport au miR-Ctrl ou au miR-342-5p (seules les valeurs significatives sont présentées : \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*p<0,001 en B et C).

## IV. Conclusion

L'utilisation des miRNAs est une alternative thérapeutique intéressante pour de nombreuses pathologies. Outre le besoin de caractériser l'efficacité d'un miRNA d'intérêt et ses cibles directes, la vectorisation des miRNAs pour leur utilisation en thérapie reste un problème majeur. En effet, les petits ARNs non codants ont une demi-vie limitée. Les miRNAs sont très rapidement dégradés s'ils ne sont pas protégés (Trang et al., 2011). Par notre approche, nous avons démontré pour la première fois, qu'il était possible de reprogrammer une bactérie lactique Gram<sup>+</sup> non pathogène pour l'Homme, afin de lui faire exprimer un pré-miRNA suppresseur de tumeur.

Des petits ARNs extraits à partir de cette bactérie modifiée avec le vecteur d'expression du pré-miR-342, induisent par eux-mêmes un effet cytotoxique presque équivalent au miR-342-5p synthétique dans la lignée SW1353 de CS. Cependant, des petits ARNs extraits à partir cette bactérie modifiée avec le vecteur vide sont également cytotoxiques. Les 2 types d'extraits bloquent également les cellules en phase S du cycle cellulaire. A ce stade, nous n'avons pas pu exclure que les effets cytotoxiques ou cytostatiques observés étaient effectivement dus au vecteur d'expression.

Notre extraction de petits ARNs à partir de la bactérie modifiée implique également la présence d'autres petits ARNs bactériens dans notre échantillon. Nous avons mis en évidence que les ARNs (petits ou grands) de la bactérie sauvage étaient responsables d'un blocage des cellules SW1353 en phase S du cycle cellulaire. Les petits ARNs de la bactérie sauvage tendent aussi à augmenter le pourcentage d'évènements sub-G1. Nous avons donc mis en évidence pour la première fois l'effet anti-tumoral potentiel des ARNs de la bactérie *Eh*. Cette observation avait également été décrite dans la littérature chez *Salmonella* ou *Listeria* (Duval et al., 2017b). Ces petits ARNs contribueraient donc aux effets cytostatiques, voire cytotoxiques, observés avec les extraits de la bactérie modifiée dans les cellules SW1353.

Afin de valider l'efficacité du pré-miRNA, il nous fallait évaluer l'effet du pré-miR-342 bactérien sans la présence d'autres ARNs bactériens. Le pré-miR-342 inséré dans le plasmide a donc été produit *in vitro* avec ou sans terminateur pour stopper sa transcription. Ces 2 transcrits ont induit un effet cytotoxique sur nos cellules de CS. De manière surprenante, ils ont également induit un blocage des cellules dans la phase S du cycle cellulaire. A ce stade, nous ne pouvons pas apporter d'explication à cette observation. Toutefois cette expérience a démontré que notre construction bactérienne du pré-miR-342 est fonctionnelle chez le CS.

L'objectif suivant était donc de tester le pré-miRNA-342 purifié produit par la bactérie. Malheureusement, nos méthodes de production et/ou de purification n'ont pas permis de récupérer des quantités suffisantes de pré-miR-342. Par ailleurs, les conditions expérimentales imposées pour la purification de notre pré-miRNA ont pu conduire à sa dénaturation. Plusieurs études ont utilisé des hôtes procaryotes pour la production de miRNAs (Li et al., 2014, 2015b; Wang et al., 2015). Pour effectuer des études fonctionnelles et structurales des miRNAs produits, l'ensemble de ces études a dû mettre au point des techniques de purification de leurs miRNAs. Malheureusement, l'utilisation de conditions souvent dénaturantes lors de la purification conduit à un rendement faible de miRNAs produits.

Les expériences préliminaires avec les cellules CH2879 et OUMS-27 devront être reproduites pour valider les effets obtenus avec les ARNs extraits de la bactérie, modifiée ou non, sur d'autres lignées de CS. Nous devons aussi valider la fonctionnalité de notre construction bactérienne du pré-miR-342 sur ces lignées. L'ensemble de ces expériences devra être réitéré sur des cellules saines non tumorales, comme des chondrocytes articulaires sains, pour vérifier que les activités cytotoxiques et/ou cytostatiques des ARNs issus de la bactérie modifiée ou non, et des transcrits *in vitro*, sont limitées aux cellules cancéreuses.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

La résistance des CS face aux traitements actuels reste à ce jour, une problématique pour la prise en charge de certains patients. Le seul traitement efficace reste la chirurgie, avec certaines limites, comme l'accessibilité à la tumeur, le risque de récurrence et de métastases. Pour l'OS, depuis l'introduction des traitements de chimiothérapie combinatoire, la survie des patients s'est considérablement améliorée. Cependant, en présence de métastases ou d'une récurrence tumorale, les approches thérapeutiques actuelles présentent certaines limites. La survie des patients est alors diminuée. Les travaux de cette thèse avaient donc pour objectif de trouver des miRNAs avec des effets suppresseurs de tumeurs chez le CS et l'OS et d'initier des travaux en vue de leur vectorisation *in vivo* à plus long terme.

Dans un premier temps, l'effet cytotoxique et chimiosensibilisateur de miRNAs présélectionnés par criblage haut débit ont été évalués chez des lignées de CS, puis l'étude a été étendue à l'OS. Ensuite, nous avons étudié les mécanismes moléculaires (apoptose, autophagie, cibles moléculaires) mis en jeu par les miRNAs pour lesquels les effets cytotoxiques ont été validés. Enfin, nous avons évalué le potentiel d'une bactérie colonisatrice de xénogreffes de CS et d'OS à produire le miRNA le plus cytotoxique pour l'ensemble des cellules tumorales, à savoir le miR-342-5p.

Dans cette discussion, nous revenons donc sur les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse, grâce aux différentes approches expérimentales, puis nous soulignons les éventuelles difficultés rencontrées en proposant des perspectives pour les travaux à venir.

## 1. Approche haut débit par xCELLigence

Ces dernières années, différentes études ont montré l'implication des miRNAs dans la progression des cancers, notamment dans le CS et l'OS, offrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (Palmini et al., 2017). C'est dans ce contexte que le laboratoire a initié des travaux pour mettre en évidence des miRNAs présentant un potentiel thérapeutique vis-à-vis du CS. Ces travaux ont débuté en 2012 avec le criblage haut débit (technologie xCELLigence) par mesure d'impédance d'une banque de 1200 miRNAs. L'objectif était de mettre en évidence des miRNAs potentiellement cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs sur la lignée de CS SW1353. L'identification de nouveaux miRNAs cytotoxiques pour le CS par un criblage fonctionnel à haut débit était donc tout à fait novatrice. Cette identification a été réalisée en

collaboration avec l'unité BioTICLA qui travaillait sur le cancer ovarien. Cette dernière a d'ailleurs récemment validé cette approche par l'identification d'un nouveau miRNA d'intérêt dans les cancers de l'ovaire (Vernon et al., 2020). D'autres études ont également mis en évidence la fonctionnalité de cette approche pour identifier de nouvelles molécules pharmacologiques. Par exemple, la technologie xCELLigence a été utilisée afin de tester et d'identifier de nouvelles molécules antivirales pour le traitement de l'herpès virus équin I dans notre unité (Thieulent et al., 2020).

Lors du criblage initié en 2013, seulement 1500 miRNAs étaient répertoriés. Cela représentait déjà un travail considérable pour tester tous ces miRNAs. Or, la découverte de nouveaux miRNAs s'est accélérée ces dernières années. A ce jour, 2675 miRNA matures sont répertoriés chez l'Homme par le site miRBase, laissant la porte ouverte à la découverte de bien d'autres miRNAs possédant une action cytotoxique ou chimiosensibilisatrice dans les tumeurs osseuses.

La technologie xCELLigence permet de suivre en temps réel l'activité des cellules. Elle est basée sur la mesure d'impédance électrique lors de la culture cellulaire. La culture des cellules est réalisée dans des microplaques avec des puits tapissés de microélectrodes en or. Du courant alternatif de faible voltage circule entre les microélectrodes grâce au milieu de culture qui joue le rôle d'électrolyte. Les cellules qui poussent sur les microélectrodes affectent le flux électronique en augmentant l'impédance électrique, c'est-à-dire l'opposition au passage du courant. L'impédance est calculée en continu lors de la culture : plus les cellules prolifèrent, plus la surface des électrodes est recouverte de cellules et plus la valeur de l'impédance sera grande. Cette technique permet donc d'apprécier l'adhésion, la prolifération cellulaire et la viabilité des cellules. Au cours du criblage haut débit, les cellules SW1353 ont été cultivées en normoxie dans des plaques de 96 puits possédant un fond en verre recouvert de microélectrodes en or, plutôt qu'un fond en plastique comme utilisé classiquement en culture cellulaire. Elles ont été traitées avec les miRNAs en présence ou en absence de CDDP. En parallèle, la morphologie des cellules a été observée grâce à un microscope dédié à l'utilisation de microplaques (Cellavista) pour caractériser la cause des modifications d'impédance (détachement des cellules, modifications morphologiques, mort cellulaire, confluence

L'utilisation de la technologie XCELLigence présente quelques limites que nous avons pu mettre en évidence :

Les miRNAs sont capables de modifier l'expression d'un grand nombre de protéines y compris des protéines d'adhérence cellulaire ou du cytosquelette. Ainsi, la mesure d'impédance peut

être modifiée sans qu'elle ne soit associée à un effet cytotoxique. C'est pourquoi nous avons associé la mesure de l'impédance à une observation de la morphologie cellulaire.

Les mesures d'impédance ont uniquement été réalisées en normoxie, alors que le CS est une tumeur évoluant dans un microenvironnement hypoxique. Les effets antiprolifératifs des miRNAs mis en évidence par le criblage haut débit pourraient donc être différents en hypoxie, puisque la tension en O<sub>2</sub> influence aussi le métabolisme cellulaire. De plus, une seule lignée cellulaire de CS a été utilisée pour la mesure de l'impédance, ce qui ne permet pas de généraliser les résultats à l'ensemble des CS.

Les mesures d'impédance ont été réalisées sur une surface en verre alors que les supports de culture classique sont en plastique. A notre connaissance, aucune étude n'a analysé l'impact d'un revêtement en verre sur la culture de lignées de CS. Il était donc nécessaire de confirmer les résultats obtenus dans des boîtes de culture en verre sur support plastique.

L'approche de mesure d'impédance avec le système xCELLigence a permis de pré-sélectionner 21 miRNAs potentiellement cytotoxiques pour le CS et 30 miRNAs potentiellement chimiosensibilisateurs au CDDP parmi une banque de 1200 miRNAs. Une approche *in silico* nous a permis de sélectionner ceux qui présentaient des cibles moléculaires impliquées dans l'apoptose (famille Bcl2 en particulier). Les miRs sélectionnés ont donc ensuite fait l'objet d'une étude fonctionnelle individuelle en normoxie et en hypoxie pour différentes lignées de CS. Cette étude fonctionnelle a aussi été réalisée chez des lignées d'OS cultivées en normoxie. Comme nous l'avons vu avec les limites de l'utilisation de la technologie xCELLigence ci-dessus, une validation fonctionnelle est indispensable pour confirmer les effets des miRNAs observés par criblage haut débit. Elle permet de caractériser les effets anti-prolifératifs observés, c'est-à-dire de définir s'ils sont liés à un effet cytostatique ou cytotoxique des miRNAs. Il est ensuite nécessaire de caractériser les mécanismes d'action des miRNAs. Dans cette étude, nous nous sommes principalement focalisés sur la mort cellulaire par apoptose et la validation de cibles moléculaires des miRNAs.

## 2. Validation des effets cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs des miRNAs

### Effets cytotoxiques

La validation fonctionnelle des miRNAs sélectionnés a représenté le cœur de mon travail de thèse. En effet, pour une utilisation en thérapie clinique, il était important de caractériser au maximum l'effet des miRNAs afin de minimiser ou de mieux anticiper les possibles effets hors-cibles.

La stratégie était donc de valider l'effet cytotoxique du miRNA *via* différentes approches. Pour cela, nous avons évalué l'activité métabolique des miRNAs par un test XTT. Nous avons analysé la cytotoxicité des miRNAs par un test de dosage de l'adénylate kinase qui est libérée dans le milieu de culture en présence d'une mortalité cellulaire. Nous avons ensuite analysé la répartition des cellules dans le cycle cellulaire par CMF afin d'évaluer le potentiel effet cytostatique et/ou cytotoxique des miRNAs. L'ensemble de ces expériences a été réalisé en normoxie et en hypoxie pour les lignées de CS, en présence ou non de CDDP. Des analyses morphologiques des cellules en point final ont également été effectuées.

Afin de valider l'effet cytotoxique d'un miRNA, nous devons observer un effet du miRNA au travers de ces 4 types d'expériences. Pour le CS, 2 miRNAs ont ainsi retenus notre attention : le miR-491-5p et le miR-342-5p. Bien qu'ils n'aient pas eu d'effet sur la lignée de CS L835, ils ont induit un changement morphologique, un effet cytotoxique et anti-métabolique sur 3 lignées de CS (SW1353, OUMS27 et CH2879), en normoxie et en hypoxie. Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de ces miRNAs sur des chondrocytes issus d'un tissu non tumoral avoisinant au CS et possédant le même type de MEC, le cartilage. Aucun effet cytotoxique n'a été observé avec ces deux miRNAs sur des cultures primaires de chondrocytes articulaires humains. L'évaluation par PCR a permis d'écarter l'hypothèse que cette absence d'effet ne provenait pas d'une mauvaise transfection des cellules (données non fournies). Aucune étude n'avait étudié auparavant ces miRNAs dans le CS. Néanmoins, plusieurs études avaient mis en évidence leurs propriétés de suppresseurs de tumeur. Le miR-491-5p avait été étudié dans le cancer ovarien (Denoyelle et al., 2014), le cancer colorectal (Nakano et al., 2010), le cancer du pancréas (Guo et al., 2012), le glioblastome (Li et al., 2015c) et l'OS (Yin et al., 2017). Le miR-342-5p avait également été identifié comme suppresseur de tumeur dans le neuroblastome (Soriano et al., 2019), le cancer du côlon (Yang et al., 2016) et l'OS (Liu et al., 2019). De plus,

l'analyse du miRNome réalisée dans notre unité n'a pas montré que ces deux miRNAs étaient sous- ou sur-exprimés dans le CS (données non fournies). A notre connaissance, leur dérégulation n'a pas été mise en évidence dans le CS. Par contre, le miR-491-5p serait sous-exprimé dans l'OS (Yin et al., 2017). La majorité des études sur l'utilisation de miRNAs thérapeutiques pour le traitement des cancers s'attachent à cibler les miRNAs dont le niveau d'expression est dérégulé dans les cancers. Ces études cherchent à rétablir l'expression des miRNAs sous-exprimés (suppresseurs de tumeur) ou d'inhiber l'expression des miRNAs sur-exprimés (oncogènes) dans le phénotype malin. Dans notre cas, nous avons mis en évidence 2 apoptomiRs, dont la dérégulation n'a pas été mise en évidence dans le CS.

Pour l'OS, 3 miRNAs cytotoxiques ont retenus notre attention, le miR-491-5p, le miR-342-5p et le miR-4270. Pour le miR-342-5p et le miR-491-5p, cet effet avait déjà été décrit dans l'OS (Liu et al., 2019; Yin et al., 2017). L'effet cytotoxique de ces 2 miRNAs a été observé sur nos 3 lignées cellulaires d'OS (HOS, MG-63 et SaOS-2). En revanche, le miR-4270 n'avait jamais été étudié dans l'OS et très peu dans d'autres types de cancer. Le miR-4270 a été identifié comme suppresseur de tumeur dans l'hépatocarcinome (Wang et al., 2020). Puis il a été identifié comme sur-exprimé dans le cancer gastrique, ce qui sous-entendait un potentiel rôle oncogénique du miR-4270 dans ce type de cancer (Tokuhisa et al., 2015). Dans notre étude, le miR-4270 n'a pas engendré d'effet suppresseur de tumeur dans le CS et uniquement un effet cytotoxique sur 2 lignées d'OS (HOS et MG-63). C'est donc sur ces 3 miRNAs que nous avons poursuivi nos investigations afin de caractériser leur mécanisme d'action et leurs cibles dans l'OS. Par ailleurs, nous n'avons pas évalué l'effet des miRNAs sur des ostéoblastes sains physiologiquement proches des cellules d'OS, mais sans leur potentiel prolifératif. Il serait donc nécessaire d'évaluer l'effet des miRNAs sur ces cellules.

Les autres miRNAs étudiés n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude. Aucun d'entre eux n'a engendré d'effet anti-métabolique ou cytotoxique sur les lignées de CS. En revanche, certains d'entre eux possédaient des effets anti-métaboliques sur les lignées d'OS. Le miR-16-1-3p a entraîné une diminution de l'activité métabolique sur la lignée HOS et sur la lignée SaOS-2, uniquement en présence de CDDP pour cette dernière. Ce miRNA a déjà été étudié dans l'OS (Maximov et al., 2019). La diminution de l'activité métabolique que nous avons observée, concorde avec les résultats de cette étude. En revanche, même si une diminution de l'activité métabolique peut être associée à une diminution de la croissance tumorale, nous n'avons pas observé d'effet cytotoxique. Le miR-646 a également entraîné une diminution de l'activité métabolique sur nos 3 lignées d'OS. Les effets de ce miRNA sur l'OS avaient déjà

été étudiés (Sun et al., 2015). Cette équipe avait montré une diminution du niveau d'expression de ce miRNA sur des biopsies d'OS, mais également sur 4 lignées cellulaires d'OS (HOS, MG-63, SaOS-2 et U2OS). Grâce à des expériences évaluant l'activité métabolique, le comblement de blessure et l'invasion, les auteurs de cette étude ont conclu à un effet supresseur de tumeur de ce miRNA chez l'OS. Nos résultats obtenus par mesure de l'activité métabolique confirment l'effet anti-tumoral de ce miRNA. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence son effet cytotoxique chez des cellules d'OS.

En se basant sur la mesure de l'activité métabolique, de la cytotoxicité et de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, nous n'avons donc retenu que 3 miRNAs parmi les 9 étudiés durant ma thèse. Parmi les miRNAs possédant uniquement une activité anti-métabolique sur le CS, des expériences complémentaires pourraient être réalisées. En effet, nous pourrions évaluer l'efficacité de ces miRNAs avec des cinétiques différentes. Différents essais avaient été réalisés au laboratoire. Nous avons évalué l'efficacité des miRNAs à 24, 48 et 72 h post-transfection. Finalement, le temps d'arrêt retenu pour la fin de culture fût 72 h, alors que différentes études évaluent l'efficacité des miRNAs 96 h post-transfection voire à 5 jours (Maximov et al., 2019). Toutefois, les techniques de transfection sont parfois différentes. Ces équipes réalisent par exemple des transfusions à l'aide de vecteurs viraux. Nous avons également testé différentes concentrations des miRNAs. Ainsi, la dose retenue fût de 20 nM ; les concentrations supérieures n'ayant pas amélioré l'efficacité des miRNAs. Lorsque la concentration des miRNAs est trop importante au sein de la cellule, il est possible que la machinerie cellulaire pour la prise en charge des miRs (miRISC) soit saturée. Les miRNAs non pris en charge sont alors dégradés rapidement. Par ailleurs, des concentrations plus élevées de miRNAs potentialisent aussi les effets hors-cibles. Nous n'avons pas étudié l'action des miRNAs sur le potentiel métastatique des cellules *via* les processus d'invasion et migration du fait que le CS est une tumeur peu métastatique. En revanche, l'OS est une tumeur qui forme des métastases. Il serait donc pertinent d'étudier ces mécanismes sur les lignées cellulaires d'OS grâce à des expériences de comblement de blessure et d'invasion.

### **Effets chimiosensibilisateurs**

Parmi les miRNAs sélectionnés par le criblage haut débit, certains semblaient avoir un effet chimiosensibilisateur vis-à-vis du CDDP dans la lignée de CS SW1353. Pour évaluer leur effet chimiosensibilisateur dans d'autres lignées, il nous fallait déterminer la dose sub létale de CDDP à utiliser. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de dose réponse au CDDP pour les différentes lignées cellulaires par CMF. Les concentrations de CDDP retenues

correspondaient aux doses permettant d'induire un blocage des cellules en phase S et/ou en phase G2/M du cycle cellulaire, sans augmenter le nombre d'évènements sub-G1. Ensuite, le CDDP était ajouté aux cellules 48 h après la transfection. Les cellules étaient ainsi laissées au contact du CDDP durant 24 h. Les expériences n'ont pas pu permettre de mettre en évidence un effet chimiosensibilisateur vis-à-vis du CDDP. Notre cinétique n'est peut-être pas adaptée ou la concentration de CDDP trop faible. Des études ont montré que certaines cibles moléculaires pouvaient améliorer la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. Par exemple, une équipe a montré que l'inhibition sélective de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL augmentait la sensibilité des cellules SW1353, CH2879 et L835 au CDDP. Cependant, cette équipe utilisait une concentration de CDDP de 10  $\mu\text{M}$  (de Jong et al., 2018). Par rapport aux  $\text{IC}_{50}$  (concentration inhibitrice pour atteindre 50% de réduction de la viabilité cellulaire), nous avons utilisé des concentrations de 3,3  $\mu\text{M}$ , soit 0,82% de l' $\text{IC}_{50}$  pour les cellules SW1353, de 1,65  $\mu\text{M}$  soit 4,12% de l' $\text{IC}_{50}$  pour les cellules CH2879, de 1,65  $\mu\text{M}$  également pour les cellules L835 soit 0,82% de l' $\text{IC}_{50}$  et de 0,33  $\mu\text{M}$  soit 0,66 % de l' $\text{IC}_{50}$  pour les cellules OUMS-27 selon van Oosterwijk et al. (van Oosterwijk et al., 2012).

Dans la littérature, plusieurs études ont montré une sensibilisation au CDDP par des miRNAs chez le CS *via* l'inhibition de différentes voies de signalisation. Ainsi, la transfection du miR-100 resensibilise ainsi les cellules de la lignée CH2879 au CDDP (Zhu et al., 2014) La méthode expérimentale employée par ces auteurs est cependant différente, puisque les cellules ont été réensemencées après la transfection avec le pré-miR-100, puis traitées avec du CDDP (de 1 à 10  $\mu\text{M}$ ) pendant 48 h avant l'analyse de la viabilité cellulaire. Dans une autre étude, la surexpression de miR-23b a inhibé la voie de signalisation Src/Akt et a conduit à la sensibilisation au CDDP de cellules de CS (Huang et al., 2017). Les cellules SW1353 et CH2879 ont été transfectées avec du pré-miR-23b et elles ont été traitées 48 h plus tard avec du CDDP (de 10 à 80  $\mu\text{M}$ ). A noter que la diminution significative de la viabilité cellulaire n'a été observée qu'à partir de 20  $\mu\text{M}$  de CDDP. Ces résultats confortent le fait que nos concentrations de CDDP sont certainement trop faibles ou que notre temps d'incubation en présence de CDDP n'est pas assez long pour mettre en évidence un effet chimiosensibilisateur des miRNAs.

Pour les lignées d'OS, nous n'avons pas non plus démontré d'effet chimiosensibilisateur au CDDP utilisé à une dose sub-léthale de 1,65  $\mu\text{M}$ . Dans la littérature, les  $\text{IC}_{50}$  qui ont été déterminées pour les 3 lignées d'OS utilisées sont très variables : de 1,65 à 26  $\mu\text{M}$  pour la lignée MG63, de 4,9 à 46  $\mu\text{M}$  pour la lignée SaOS-2 et de 3,5 à 78  $\mu\text{M}$  pour la lignée HOS (Wang et

al., 2019 ; Riman et al., 2014 ; Qi et al., 2019). Nous étions donc plus proches des IC<sub>50</sub> que pour les lignées de CS, mais sans doute pas assez pour mettre en évidence un effet chimiosensibilisateur des miRNAs. En effet, Wang et al. ont mis en évidence que la surexpression stable du miR-491-5p sensibilise les cellules U2OS et MG63 au CDDP utilisé à 10 µM pendant 48 h (Wang et al., 2017). Il est toutefois assez difficile de comparer nos deux études puisque la méthode de surexpression du miRNA diffère, tout comme la concentration de CDDP et le temps d'incubation en présence de CDDP.

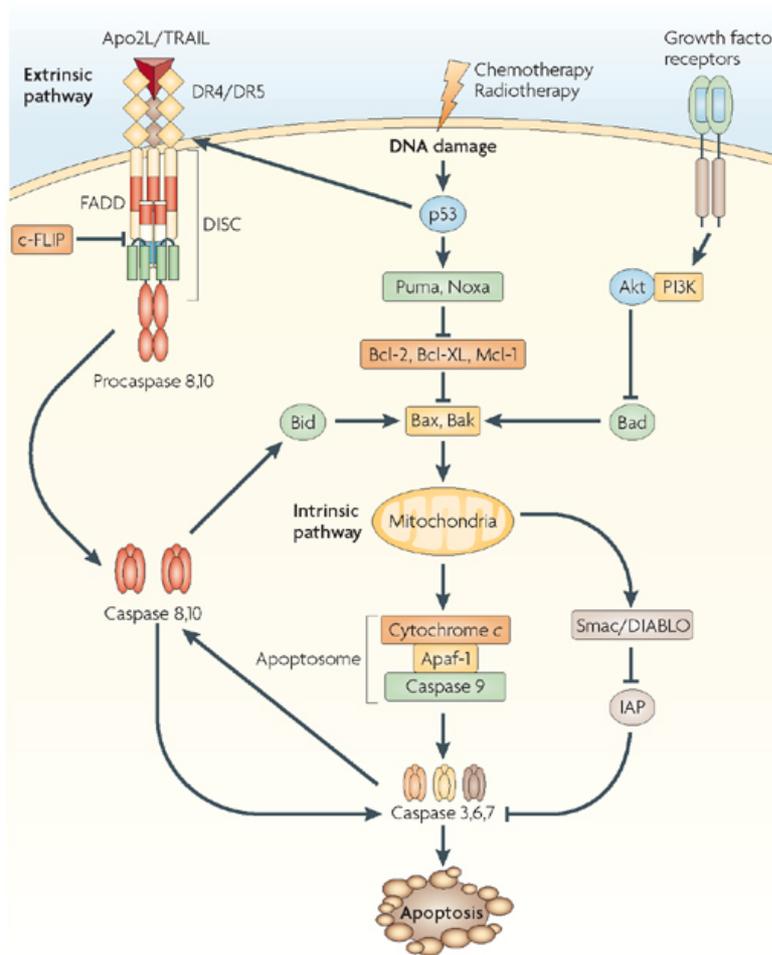
En clinique, l'utilisation de la chimiothérapie est ajustée selon l'état de santé du patient, l'agressivité et le stade de la tumeur. Des associations d'agents chimiothérapeutiques sont également possibles. La durée de la séance varie de quelques minutes à quelques heures. Ces nombreuses variables compliquent la mise en place d'un protocole en laboratoire pour des analyses *in vitro*. Notre protocole pourrait donc être optimisé afin de mieux évaluer l'effet chimiosensibilisateur des miRNAs vis-à-vis du CDDP ou vis-à-vis d'un autre agent chimiothérapeutique utilisé pour le traitement des sarcomes osseux, comme la doxorubicine.

### 3. Caractérisation des effets cytotoxiques et cibles moléculaires des miRNAs

L'utilisation des miRNAs en thérapie ne fait pas partie des traitements conventionnels à l'heure actuelle. L'absence de moyens de vectorisation spécifique des miRNAs vers le site pathologique en est l'une des premières causes. Cependant, l'identification des différentes cibles moléculaires des miRNAs et leurs réseaux associés pourrait permettre de proposer la mise en place de nouvelles associations d'agents pharmacologiques mimant l'action du miRNA. Cette approche a déjà été validée dans le cancer ovarien avec le miR-491-5p. Ce miRNA cible l'EGFR et Bcl-xL dans les lignées cellulaires de cancer ovarien pour entraîner un effet cytotoxique. Ces effets ont été retrouvés en associant une molécule BH3-mimétique (ABT-737 ciblant Bcl-xL) à un inhibiteur de l'EGFR (cétuximab ou géfitinib) (Denoyelle et al., 2014; Lambert et al., 2015).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence par une approche *in silico* que nos miRNAs pourraient cibler des ARNm codant des protéines impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose (**Figure 54**). Ainsi, d'après l'analyse *in silico* les 3 miRNAs étudiés (miR-491-5p, miR-342-5p et miR-4270) étaient pressentis pour cibler l'expression de protéines anti-apoptotiques comme : Bcl-2, Bcl-xL et/ou Mcl-1. De plus, le miR-342-5p était aussi pressenti

pour cibler l'expression de protéines pro-apoptotiques comme la pro-caspase-9 ou Bak. Par ailleurs, des études avaient mis en évidence une surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans certaines lignées cellulaires de CS (de Jong et al., 2018; van Oosterwijk et al., 2012). Il avait été aussi démontré que l'inhibition de Bcl-xL sensibilisait les cellules de CS à la chimiothérapie (de Jong et al., 2018).



**Figure 54 :** Représentation schématique des deux voies, intrinsèque et extrinsèque, contrôlant l'apoptose. Ces deux voies convergent toutes deux vers l'activation des caspases effectrices. L'initiation peut provenir d'un stress extracellulaire (a) ou intracellulaire (b). L'activation des caspases effectrices entraîne l'inactivation de la PARP par clivage. Les conséquences sont donc la non réparation de l'ADN, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques (Ashkenazi, 2008).

Nature Reviews | Drug Discovery

Pour l'OS, la surexpression des protéines anti-apoptotiques, dont les membres de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL), a également été associée à un mauvais pronostic. De plus, il a été montré qu'une surexpression de Bcl-xL était corrélée avec un taux de survie faible chez des patients présentant des métastases ou une récurrence (Wang et al., 2010; Wu et al., 2012). L'inhibition d'une ou plusieurs protéines telles que Bcl-xL, Bcl-2 ou Mcl-1 par un miRNA pourrait donc favoriser la mort cellulaire par apoptose des cellules de CS et d'OS. Nous avons donc choisi d'étudier en priorité la régulation du niveau d'expression de ces protéines.

### Cas du miR-491-5p (Tableau XII)

Nous avons mis en évidence que le miR-491-5p était cytotoxique en favorisant l'activation de l'apoptose dans les lignées de CS SW1353, CH2879 et OUMS-27, puis dans les lignées d'OS HOS, MG-63 et SaOS-2. Cela a été observé grâce à l'analyse par western-blot de deux protéines impliquées dans le processus apoptotique : la PARP et la caspase-3. La PARP est clivée lors de la phase exécutoire du programme de mort cellulaire par apoptose. La caspase-3 est une protéine effectrice qui est activée lorsqu'elle est clivée, permettant entre autres le clivage de la PARP. Ainsi, l'observation de ces deux protéines clivées témoigne d'un engagement irréversible de la cellule vers une mort cellulaire par apoptose.

L'aspect suppresseur de tumeur du miR-491-5p a déjà été étudié dans plusieurs types de cancers, nous permettant de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant à la mort des cellules par apoptose. Dans la littérature, plusieurs cibles directes du miR-491-5p ont déjà été décrites. Ce miRNA cible directement l'ARNm de Bcl-xL dans le cancer colorectal (Nakano et al., 2010), Bcl-xL et EGFR dans le cancer ovarien (Denoyelle et al., 2014), Bcl-xL et TP53 dans le cancer du pancréas (Guo et al., 2012), EGFR et CDK6 dans le glioblastome (Li et al., 2015c), PKM2 et FOXP4 dans l'OS (Yin et al., 2017). Au vu des données disponibles dans la littérature, nous avons donc retrouvé, sans trop de surprise, que le miR-491-5p ciblait directement la séquence 3'UTR de Bcl-xL dans les cellules de CS et d'OS. Nous avons également observé une diminution de l'expression protéique de l'EGFR dans les cellules de CS et d'OS. Par ailleurs, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak en présence du miR-491-5p pour les deux types de sarcomes osseux.

Nous n'avons pas observé de diminution du niveau d'expression de Mcl-1 dans aucune des deux tumeurs étudiées. Mcl-1 peut-être séquestré par la protéine Bim. Nous avons vérifié le niveau d'expression de Bim et nous n'avons pas mis en évidence une augmentation de son expression par le miR-491-5p (données non fournies). Nous avons également étudié l'expression d'autres protéines pro-apoptotiques pouvant inhiber Mcl-1 comme PUMA et Noxa. L'expression de PUMA n'a pas été modifiée en présence du miR-491-5p. Pour la protéine Noxa, au vu de sa petite taille, il a été difficile de la visualiser et de l'étudier par western-blot. Sur la lignée cellulaire de cancer ovarien IGROV1-R10, la synthèse de Bim est activée *via* l'inhibition de l'EGFR ayant pour conséquence de diminuer l'activité des voies de signalisation MAPK et AKT (Denoyelles et al., 2014). Dans notre étude, malgré l'inhibition de l'expression de l'EGFR, nous n'avons pas mis en évidence une diminution de l'activité de ces voies permettant l'expression de Bim. Toutefois, une étude a mis en évidence que malgré la

surexpression de Mcl-1 dans les CS, son inhibition n'était pas suffisante pour diminuer la viabilité cellulaire des cellules de CS (van Oosterwijk et al., 2012).

miR-491-5p		Chondrosarcome						Ostéosarcome		
		SW1353		OUMS-27		CH2879		HOS	MG-63	SaOS-2
		Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Normoxie	Normoxie
Activité métabolique		-	↘ ns					↘↘	↘↘↘	↘↘
Cytotoxicité		↗	↗					↗↗	↗↗	↗↗ ns
Nombre d'évènements sub-G1		↗↗	↗↗	↗ ns	↗ ns	↗↗	↗	↗↗	↗↗	↗↗
Apoptose		oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Autophagie		↗↗ ns	↗ ns							
Protéines anti-apoptotiques	Bcl-2	-	-	-	-	-	↘↘	↗	-	-
	Bcl-xL	↘	-	↘	↘↘	↘↘↘	↘↘↘	↘↘	↘↘	↘↘
	Mcl-1	-	-	-	-	↗	↗	-	-	-
Protéines pro-apoptotiques	Bak	↗	↗	↗	↗↗	↗	↗	↗↗	↗↗↗	↗↗↗
	Caspase-9	-	-	-	↗	-	↘	-	-	-
Protéines liées aux voies de prolifération et survie	EGFR	↘↘	↘	↘↘	↘↘	↘↘	↘↘	↘	↘↘	↘↘
	Cycline D1	-	↗	-	-	-	↗	↗	-	-
	ERK	↘	-	-	-	-	↘			
	ERK-P	↘	-	-	-	↘	↘			
	AKT	↘	-	-	-	↘	↘↘			
	AKT-P	-	-	-	-	↗	↗			

**Tableau XII : Bilan des différents effets du miR-491-5p dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome.**

- : pas d'effet; ns : non significatif; ↘ ou ↗ : diminution ou augmentation de 1,3 à 1,99 fois; ↘↘ ou ↗↗ : diminution ou augmentation de 2 à 3,99 fois; ↘↘↘ ou ↗↗↗ : diminution ou augmentation supérieure à 4 fois;  : non évalué. Seule la présence ou l'absence d'apoptose est précisée, car elle a été évaluée par différents tests qualitatifs et quantitatifs réalisés à différents temps (clivages de la PARP et/ou de la caspase 3 à 72 h, tests d'activité caspase 3/7 en temps réel jusqu'à 72 h ou 96 h).

En résumé, nous avons donc mis en évidence que le miR-491-5p induisait la mort des cellules de CS et d'OS par apoptose en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, de la protéine EGFR et en favorisant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak dans les lignées cellulaires de CS et d'OS (Tableau XII). En comparaison avec les différentes études menées *in vitro* dans différents types de tumeur, le rôle le plus redondant du miR-491-5p est son inhibition de Bcl-xL. Même si nous n'avons pas réalisé de tests de blessure et d'invasion *in vitro*, ni d'étude *in vivo* pour valider plus précisément son rôle

suppresseur de tumeur dans le CS et l'OS, ce rôle semble bien établi. Une étude a ainsi montré qu'il avait un rôle suppresseur de tumeur *in vivo* en diminuant la croissance tumorale et la formation de métastases pulmonaires dans des modèles de xénogreffes d'OS (Wang et al., 2017)

#### Cas du miR-342-5p (Tableau XIII)

Nous avons mis en évidence que le miR-342-5p induisait l'activation de l'apoptose dans les lignées de CS SW1353, CH2879 et OUMS-27, puis dans les lignées d'OS HOS et MG-63 grâce à l'observation du clivage de la PARP et de la caspase-3. Sur la lignée cellulaire d'OS SaOS-2, nous avons également démontré une mort cellulaire par apoptose, mais sans clivage évident de la caspase-3 ou d'augmentation significative de l'activité des caspases 3/7. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'activation de l'apoptose, nous avons étudié le niveau d'expression des protéines de la voie intrinsèque de l'apoptose, pressenties comme cibles du miR-342-5p.

Quelques études avaient démontré l'effet anti-tumoral du miR-342-5p, notamment dans le neuroblastome, où il promeut l'apoptose en ciblant la protéine N-alpha-acetyltransférase 10 (Yang et al., 2016). Dans l'OS, il cible directement le membre 7B de la famille Wnt inhibant ainsi la prolifération, la migration et l'invasion et il restaure la sensibilité vis-à-vis de la doxorubicine (Liu et al., 2019).

Dans notre étude, nous avons donc mis en évidence, dans la lignée de CS SW1353, que le miR-342-5p diminuait de façon significative, d'un point de vue statistique, l'activité luciférase d'un vecteur rapporteur contenant la séquence 3'UTR de *BCL-2*. Cela était par ailleurs associé à une diminution de l'expression protéique de Bcl-2 dans nos 3 lignées de CS. Nous avons donc conclu, pour la première fois, à un ciblage direct de l'ARNm de Bcl-2 par le miR-342-5p chez des cellules de CS. Cependant, dans la lignée d'OS HOS, le miR-342-5p n'inhibait pas de façon significative l'expression du vecteur rapporteur contenant la séquence 3'UTR de Bcl-2, malgré des taux d'inhibition comparables (20% environ). L'expression de la protéine Bcl-2 était pourtant inhibée de 50% à la fois dans les lignées SW1353 et HOS. Ces résultats nous montrent que les cibles des miRNAs peuvent être différemment inhibées selon le type cellulaire. La biodisponibilité des cibles peut varier d'un type cellulaire à un autre. Il est donc possible que dans la lignée HOS, le miR-342-5p cible préférentiellement d'autres

séquences 3'UTR au sein de la cellule, mais il en résulte tout de même, probablement en réponse à un effet indirect, une inhibition de la protéine Bcl-2.

Nous avons également démontré pour la première fois que le miR-342-5p ciblait directement la séquence 3'UTR de l'ARNm de Bcl-xL dans les cellules de CS et d'OS. L'analyse *in silico* a révélé 3 sites potentiels de fixation du miR-342-5p dans la séquence 3'UTR de Bcl-xL. Nous avons observé que le miR-342-5p se fixait préférentiellement à la région 679-686. Mcl-1 était également une cible du miR-342-5p, mais nous n'avons pas observé de modification de son expression au sein des lignées cellulaires de CS et d'OS. Ensuite, nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bak uniquement sur les lignées cellulaires d'OS. Pourtant, Bak était une cible prédite du miR-342-5p.

miR-342-5p		Chondrosarcome						Ostéosarcome		
		SW1353		OUMS-27		CH2879		HOS	MG-63	SaOS-2
		Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Normoxie	Normoxie
Activité métabolique		↘	↘					↘	↘↘	↘↘
Cytotoxicité		↗ <sub>ns</sub>	↗					↗	↗↗	↗↗
Nombre d'événements sub-G1		↗↗	↗↗	↗	↗	↗	↗	↗↗↗	↗↗↗	↗↗
Apoptose		oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	faible
Autophagie		↗↗↗	↗↗							
Protéines anti-apoptotiques	Bcl-2	↘↘	↘↘	-	↘	↘	↘↘↘	↘↘	↘	↘
	Bcl-xL	↘	↘	↘↘↘	↘↘↘	↘↘↘	↘↘↘	↘↘	↘↘↘	↘↘
	Mcl-1	-	-	-	-	↗	-	-	-	-
Protéines pro-apoptotiques	Bak	-	-	-	-	↘	-	↗	↗↗↗	↗↗↗
	Caspase-9	↘↘↘	↘↘	↘↘	↘↘	↘	↘↘↘	↘↘	↘↘	↘↘
Protéines liées aux voies de prolifération et survie	EGFR	-	↗	-	-	-	-	-	-	-
	Cycline D1	-	↗	-	-	↗	-	-	-	-
	ERK	-	-	-	-	-	-			
	ERK-P	↗↗	-	-	↗	-	-			
	AKT	↘	↘	-	-	↘	↘↘↘			
	AKT-P	↗	↘	↗	-	↗	↗			

**Tableau XIII : Bilan des différents effets du miR-342-5p dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome.**

- : pas d'effet; ns : non significatif; ↘ ou ↗ : diminution ou augmentation de 1,3 à 1,99 fois; ↘↘ ou ↗↗ : diminution ou augmentation de 2 à 3,99 fois; ↘↘↘ ou ↗↗↗ : diminution ou augmentation supérieure à 4 fois;  : non évalué. Seule la présence ou l'absence d'apoptose est précisée, car elle a été évaluée par différents tests qualitatifs et quantitatifs réalisés à différents temps (clivages de la PARP et/ou de la caspase 3 à 72 h, tests d'activité caspase 3/7 en temps réel jusqu'à 72 h ou 96 h).

L'analyse bio-informatique a désigné les protéines AKT et ERK comme cibles potentielles du miR-342-5p. Leur expression a donc également été étudiée dans les lignées de CS. Les résultats obtenus étaient hétérogènes entre les lignées et n'ont pas permis d'affirmer sans ambiguïté que le miR-342-5p influence l'expression de ces protéines.

Enfin, l'expression d'une protéine pro-apoptotique, la caspase-9 a été fortement diminuée dans l'ensemble des lignées de CS et d'OS. Cette cible potentielle du miR-342-5p a été validée dans les cardiomyocytes (Hou et al., 2019). La caspase-9 joue un rôle central pour l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3. Une inhibition de la caspase-9 peut donc diminuer l'activation de la caspase-3. D'ailleurs, sur la lignée SaOS-2, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une activité significative des caspases 3/7. Malgré cela, nous avons bien observé un clivage de la PARP. Il aurait pu être intéressant d'étudier l'activation de l'apoptose par la voie indépendante des caspases. En effet, la diminution du niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak, permettent une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cela peut permettre la libération des protéines apoptotiques comme AIF (« Apoptosis-Inducing Factor ») et l'endonucléase G qui sont exportées dans le noyau et sont responsables de la condensation de la chromatine et le clivage de l'ADN.

Compte tenu des nombreux rôles que jouent Bcl-2 et Bcl-xL au sein des cellules, nous avons étudié un autre mécanisme cellulaire, l'autophagie. Dans les cellules de CS, le miR-342-5p entraîne une diminution de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL. Or, ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'autophagie. Elles inhibent beclin-1, qui est une protéine essentielle à la formation d'autophagosomes. Ainsi, nous avons mis en évidence une activation de l'autophagie en présence du miR-342-5p, mais pas du miR-491-5p qui inhibe uniquement Bcl-xL. L'inhibition de Bcl-xL par le miR-491-5p n'est donc pas suffisante pour induire l'autophagie. Le potentiel du processus autophagique à provoquer la mort cellulaire est encore discuté (Yu et al., 2004a). Dans le cas présent, au vu de l'ensemble des résultats, il semblerait que l'activation de l'autophagie soit délétère pour la survie des cellules. De plus, l'environnement hypoxique régule positivement l'autophagie. Ainsi, une activation de l'autophagie par l'hypoxie et par le miR-342-5p pourrait permettre d'atteindre un point critique et donc l'autophagie pourrait soit être directement responsable de la mort cellulaire (Lohberger et al., 2016), soit elle pourrait sensibiliser les cellules de CS à la mort par apoptose (Jiao et al., 2014). Pour compléter cette étude, il serait pertinent de vérifier que le miR-342-5p induit également l'autophagie dans au moins une lignée d'OS.

**En résumé, nous avons mis en évidence que le miR-342-5p induit la mort cellulaire par apoptose des cellules de CS et d'OS. Le miR-342-5p favorise aussi l'activation de l'autophagie dans les cellules de CS. Il cible directement les ARNm de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans le CS et l'OS et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le CS. Le miR-342-5p diminue également l'expression de la pro-caspase-9 dans le CS et l'OS et favorise l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak dans l'OS (Tableau XIII). Ces résultats sont en adéquation avec des études antérieures qui ont établi son rôle antitumoral chez le neuroblastome et l'OS (Yang et al., 2016 ; Li and al., 2019). Il pourrait être intéressant de compléter cette étude par des tests de blessure et d'invasion *in vitro* dans les deux types de modèle de tumeur.**

#### Cas du miR-4270 (Tableau XIV)

Nous n'avons pas validé l'effet cytotoxique du miR-4270 mis en évidence par criblage haut débit dans la lignée de CS SW1353. Il aurait pu être intéressant de modifier les cinétiques des expériences pour analyser son effet (96 h après la transfection plutôt que 72 h dans la validation fonctionnelle). En effet, les observations morphologiques réalisées en point final montrent une diminution de la confluence par rapport aux conditions contrôle 96 h post-transfection. L'activité métabolique et la cytotoxicité du miR-4270 ont aussi été évaluées sur les lignées OUMS-27 et CH2879. Nous n'avons observé aucun effet significatif du miR-4270 (données non fournies), suggérant que ce miRNA n'a pas d'effet cytotoxique significatif chez le CS. Pour les lignées d'OS HOS et MG-63, nous avons confirmé que l'effet cytotoxique engendré par le miR-4270 entraînait effectivement la mort cellulaire par apoptose. Nous avons observé la présence de la PARP clivée et de la caspase-3 clivée. Sur la lignée SaOS-2, nous n'avons pas observé d'effet cytotoxique du miR-4270. Seule une diminution de l'activité métabolique a été observée. Pourtant, nous avons observé un léger clivage de la PARP par western-blot sur cette lignée. Cependant, nous n'avons pas constaté de variation d'activité des caspases-3/7 par imagerie en temps réel. Donc, le miR-4270 diminue uniquement l'activité métabolique des cellules SaOS-2, sans induire significativement leur mort par apoptose.

Les analyses bio-informatiques ont révélé que le miR-4270 cible potentiellement l'expression des protéines Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1. Nous avons donc analysé le niveau d'expression de ces protéines par western-blot dans les 3 lignées d'OS. Nous avons ensuite vérifié si le miR-4270 ciblait directement l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans la lignée HOS. Nous n'avons pas été en mesure de réaliser cette dernière

expérience pour Mcl-1, car nous ne possédions pas encore le vecteur rapporteur luciférase incluant la séquence 3'-UTR de son ARNm. Cette expérience sera réalisée prochainement.

Le miR-4270 n'a pas influencé de la même façon le niveau d'expression de la protéine Bcl-2 dans les 3 lignées cellulaires d'OS (augmentation de son expression de 40% dans la lignée HOS et faible diminution d'expression d'environ 30% dans les lignées MG-63 et SaOS-2). Le miR-4270 ne ciblerait donc pas directement la séquence 3'UTR de l'ARNm Bcl-2 dans les OS.

En revanche, nous avons observé une diminution importante (60-80%) de l'expression de Bcl-xL en présence du miR-4270 dans les deux lignées HOS et MG-63. L'inhibition a été modeste (30%) dans la lignée SaOS-2. L'analyse par « luciferase assay » a confirmé que le miR-4270 ciblait directement la séquence 3'UTR de l'ARNm de Bcl-xL dans la lignée HOS. Il serait intéressant de vérifier si le miR-4270 cible directement Bcl-xL dans les lignées MG-63 et SaOS-2.

Le miR-4270 a induit une diminution (40%) du niveau d'expression de la protéine Mcl-1 principalement dans les 2 lignées MG-63 et SaOS-2. Sur la lignée HOS, l'inhibition a été plus modérée (30%) et surtout beaucoup moins reproductible entre les différents western-blots. Là encore, il faudrait vérifier sur chacune des lignées si le miR-4270 cible directement la séquence 3'UTR de l'ARNm de Mcl-1. Cela pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes influencés par ce miRNA et son mode d'action selon les lignées.

Nous avons observé une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique Bak en présence du miR-4270 dans les trois lignées d'OS utilisées. Bak pourrait donc contribuer à son effet pro-apoptotique. L'influence du miR-4270 sur les voies de signalisation AKT et ERK a été étudiée par western-blot, mais les résultats que nous avons obtenus n'ont pas été concluants, car ils étaient non reproductibles (données non fournies). Ces données ne permettent donc pas de conclure sur le rôle de ces voies de signalisation dans les mécanismes d'action du miR-4270.

**En résumé, le miR-4270 induit la mort cellulaire par apoptose dans les lignées d'OS HOS et MG-63 en ciblant directement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et en diminuant également l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Le miR-4270 augmente aussi l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak.** Nous devons toutefois vérifier qu'il cible spécifiquement l'ARNm de Mcl-1 dans l'OS.

miR-4270		Chondrosarcome		Ostéosarcome		
		SW1353		HOS	MG-63	SaOS-2
		Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Normoxie	Normoxie
Activité métabolique		↗ ns	-	↘	↘↘	↘
Cytotoxicité		↗ ns	↗ ns	↗	↗	-
Nombre d'évènements sub-G1		↗ ns	↗↗ ns	↗↗	↗↗	↗ ns
Apoptose				oui	oui	faible
Autophagie						
Protéines anti-apoptotiques	Bcl-2			↗	↘	-
	Bcl-xL			↘↘	↘↘↘	↘
	Mcl-1			↘	↘	↘
Protéines pro-apoptotiques	Bak			↗↗↗	↗	↗
	Caspase-9					

**Tableau XIV : Bilan des différents effets du miR-4270 dans les différentes lignées de chondrosarcome et d'ostéosarcome.**

- : pas d'effet; ns : non significatif; ↘ ou ↗ : diminution ou augmentation de 1,3 à 1,99 fois; ↘↘ ou ↗↗ : diminution ou augmentation de 2 à 3,99 fois; ↘↘↘ ou ↗↗↗ : diminution ou augmentation supérieure à 4 fois;  : non évalué. Seule la présence ou l'absence d'apoptose est précisée, car elle a été évaluée par différents tests qualitatifs et quantitatifs réalisés à différents temps (clivages de la PARP et/ou de la caspase 3 à 72 h, tests d'activité caspase 3/7 en temps réel jusqu'à 72 h ou 96 h).

Le miR-4270 a été peu étudié dans les cancers. Il a été identifié comme ayant un rôle suppresseur de tumeur dans l'hépatocarcinome, où il cible directement une protéine impliquée dans les processus d'angiogenèse et d'adhésion cellulaire, la stabilin-2 (Wang et al., 2020). Il cible la MMP-19 dans des cellules d'adénocarcinome du poumon, inhibant ainsi leur migration et leur invasion (Sun et al., 2019). Par contre, d'autres études suggèrent plutôt qu'il a un effet oncogène (Hamam et al., 2016; Tokuhisa et al., 2015; Zou et al., 2019). Dans notre étude, il aurait plutôt un effet suppresseur de tumeur, mais avec une efficacité avérée seulement dans 2 lignées cellulaires d'OS. Il pourrait être intéressant de vérifier ses effets suppresseurs de tumeur par des tests de blessure et d'invasion *in vitro* dans les lignées d'OS.

L'utilisation des miRNAs pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est tout à fait pertinente. Cette étude a permis de consolider le fait que Bcl-xL était une cible intéressante pour le traitement des tumeurs osseuses comme le CS et l'OS. Néanmoins, nous pourrions renforcer cette conclusion en utilisant des inhibiteurs spécifiques de Bcl-xL, ou des

si-RNAs dirigés contre Bcl-xL, pour vérifier que l'inhibition seule de Bcl-xL suffit à provoquer la mort des cellules tumorales. Toutefois, en utilisant des inhibiteurs sélectifs de Bcl-2 ou de Bcl-xL, de Jong et al. (2018) ont déjà montré que l'inhibition de Bcl-xL semble plus pertinente que celle de Bcl-2 pour inhiber la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*.

Comme le miR-342-5p, certains miRNAs possèdent à la fois des cibles moléculaires codant des « suppresseurs de tumeur » ou des « oncogènes ». C'est l'équilibre entre la disponibilité des cibles dans la cellule et leur affinité plus ou moins importante avec le miRNA qui va orienter le miRNA vers une propriété suppressive de tumeur ou oncogène dans le type cellulaire où il est exprimé. Par exemple, il a été observé que le miR-4270 agissait comme un oncogène dans certains types de cellules tumorales, tandis qu'il pouvait exercer un rôle anti-tumoral dans d'autres. Dans notre étude, il a exercé des effets sélectifs selon les lignées. De plus, nous avons pu observer, des différences d'affinité pour les cibles entre les deux types de tumeurs, notamment avec le miR-342-5p et Bcl-2. La capacité du miR-342-5p à cibler directement Bcl-2 dans les CS semble modérée (20% d'inhibition de l'activité transcriptionnelle du vecteur rapporteur dans la lignée de CS SW1353) et n'a pas été significative dans la lignée d'OS HOS. Ainsi, nous avons pu montrer qu'une cible validée dans un type tumoral, ne l'était pas forcément dans un autre. L'inhibition post-transcriptionnelle de Bcl-xL par les miRs-491-5p et -342-5p est beaucoup plus importante (70-80% d'inhibition de l'activité transcriptionnelle), démontrant leur forte affinité pour leur cible. Comme cela a été démontré dans d'autres types de cancer et dans le CS, Bcl-xL serait donc une cible thérapeutique de choix.

#### **4. Modèle d'étude : lignée cellulaire, hypoxie et culture en 3D**

Nous avons obtenu des résultats variables avec les miRNAs selon les lignées cellulaires utilisées. Même si elles proviennent du même type de tumeur, les lignées possèdent leurs propres caractéristiques. Il est nécessaire de prendre en compte les observations obtenues sur l'ensemble des lignées afin de bien interpréter les effets que l'on pourrait retrouver au sein d'une tumeur primaire. En effet, les cellules tumorales au sein d'une même tumeur se caractérisent souvent par une diversité morphologique, une variabilité d'expression de marqueurs moléculaires et la présence de sous-populations différentes.

Pour le CS, nous avons utilisé 4 lignées de CS conventionnels centraux, la lignée SW1353 est issue d'une tumeur de grade II, tandis que les lignées OUMS-27, CH2879 et L835 sont issues de tumeurs de grade III. Elles sont toutes résistantes au CDDP, mais la lignée

SW1353 est définie comme étant la plus résistante parmi les 4 lignées (van Oosterwijk et al., 2012). Ces données ont été confirmées par nos tests d'effet dépendant de la dose avec le CDDP. Une étude a montré que l'inhibition de Bcl-xL et Bcl-2 par le BH3-mimétique ABT-737 diminuait la viabilité cellulaire de la lignée L835 après 72 h d'incubation (van Oosterwijk et al., 2012). Le miR-491-5p et le miR-342-5p devraient inhiber Bcl-xL et/ou Bcl-2 dans cette lignée, mais nous n'avons pas constaté leur effet cytotoxique dans cette lignée. Des expériences complémentaires (western-blot) seraient donc nécessaires pour savoir si les miRNAs inhibent effectivement Bcl-2 et Bcl-xL dans la lignée L835, d'autant plus que cette lignée exprime ces 2 membres anti-apoptotiques, avec une expression plus forte de Bcl-xL que de Bcl-2 (van Oosterwijk 2012 ; de Jong 2018).

Les 3 lignées d'OS sont issues de tumeurs d'OS centraux et sont donc classées comme des tumeurs de haut grade. Seul le sous-type de la lignée MG-63 est renseigné et est classé comme un OS fibroblastique (Mohseny et al., 2011). Nous n'avons pas d'hypothèse pour expliquer pourquoi l'apoptose induite par le miR-342-5p est moins prononcée dans la lignée SaOS-2, alors que ce miRNA est cytotoxique dans cette lignée et qu'il inhibe l'expression protéique de Bcl-xL et Mcl-1 et augmente celle de Bak. Nous n'avons pas non plus d'hypothèse pour expliquer l'absence d'effet cytotoxique significatif et d'induction significative de l'apoptose par le miR-4270 dans la lignée SaOS-2, alors que ce miRNA inhibe l'expression de Bcl-xL et Mcl-1 et augmente celle de Bak dans cette lignée.

Pour ce qui concerne les conditions de culture utilisées, nous avons uniquement cultivé les cellules d'OS en 2D et en normoxie. Les OS ne sont pas des tumeurs hypoxiques. Néanmoins, il peut exister au sein de la tumeur des zones hypoxiques plus ou moins importantes. Les résultats obtenus en normoxie et en hypoxie sont concordants pour les lignées de CS, Il nous faudrait confirmer cette même concordance des résultats avec les lignées d'OS. Compte tenu de l'impact de l'environnement 3D sur les cellules, l'efficacité des miRNAs pourrait aussi être testée sur les lignées d'OS cultivées dans un modèle d'organoïde en 3D. Ce type de modèle est plus proche de l'environnement *in vivo*. Par ailleurs, les OS sont des tumeurs métastatiques. Afin d'évaluer le potentiel anti-invasif des miRNAs, des expériences d'invasion/migration pourraient être mises en place, avant d'envisager des études *in vivo*.

Le CS présente la particularité de synthétiser une MEC importante et d'évoluer dans un environnement hypoxique. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet du miR-491-5p et du miR-342-5p sur un modèle d'organoïde en 3D avec les cellules SW1353. Cette étude a été réalisée en normoxie et en hypoxie. En effet, le contexte 3D/2D peut influencer le fonctionnement des

cellules (Duval et al., 2017a) et l'efficacité des miRNAs pourrait être modifiée. L'environnement hypoxique influence également le fonctionnement cellulaire. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que le miR-342-5p, mais pas le miR-491-5p, entraînait une augmentation (1,5 fois) des événements sub-G1 dans la lignée SW1353 cultivée en 3D. Cette augmentation n'était d'ailleurs significative qu'en hypoxie. L'induction de l'autophagie par l'hypoxie a été démontrée par Bellot et ses collaborateurs (Bellot et al., 2009). Nous pouvons donc proposer l'hypothèse que l'activation de l'autophagie à la fois par le miR-342-5p et par l'hypoxie faciliterait la mort des cellules dans un contexte de culture en 3D. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression des protéines impliquées dans l'autophagie, comme BNIP3, Beclin-1 ou Atg5, par western-blot, afin de vérifier si l'environnement en 3D et l'hypoxie influencent leur expression en présence ou non du miR-342-5p.

Le développement de biomatériaux et l'évolution des conditions de culture ont permis de se rapprocher du contexte physiologique dans lequel évolue une tumeur. Malheureusement, ces techniques permettent de travailler uniquement sur des lignées cellulaires. Une alternative intéressante serait de pouvoir tester l'efficacité de ces miRNAs lors d'expériences *ex vivo* sur des explants de tumeurs, voire sur des cultures en organoïdes avec des cellules directement dérivées de la tumeur, avant de poursuivre sur des tests *in vivo*. Cependant, l'obtention de tissu tumoral provenant de patients n'est pas simple, au vu du nombre restreint de patients atteints de CS, et peut représenter un frein pour ce type d'expérimentation.

## 5. Utilisation des bactéries pour la vectorisation des miRNAs

L'amélioration des connaissances et des outils utilisés en génomique ont permis dans les années 1970 de développer la production de protéines dites recombinantes par des bactéries. L'utilisation de bactéries pour produire des ARNs et plus précisément des miRNAs était donc tout à fait pertinente et déjà développée par d'autres équipes, comme par exemple pour le miR-34a (Wang et al., 2015).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que des bactéries étaient capables de coloniser spécifiquement des tumeurs. Ainsi, des travaux ont été entrepris au laboratoire en étroite collaboration avec l'équipe Stress et Virulence de l'unité U2RM, afin de trouver des bactéries capables de coloniser spécifiquement les CS et OS. Deux bactéries lactiques non pathogènes pour l'Homme ont été identifiées, puis elles ont été génétiquement modifiées afin d'insérer la

séquence du pré-miR-342 dans un plasmide incorporé dans la bactérie. La bactérie *Eh* a ainsi été transformée de manière efficace et a exprimé ce pré-miR-342.

Mon travail a donc consisté à vérifier que ce miRNA produit par la bactérie *Eh* était bien fonctionnel et de le comparer à l'efficacité du miR-342-5p synthétique. Les résultats obtenus ont montré que les petits ARNs extraits de la souche *Eh*, modifiée ou non, possèdent par eux-mêmes un effet cytotatique sur la lignée SW1353, alors que le miR-342-5p n'a pas d'effet cytotatique significatif. Les petits ARNs extraits de la souche *Eh* modifiée, avec le plasmide vide ou exprimant le pré-miR-342, possèdent en plus un effet cytotoxique, mais moindre que celui du miR-342-5p. Par ailleurs, le transcrit *in vitro* du pré-miR-342 bactérien a lui aussi engendré à la fois un effet cytotatique et cytotoxique. La construction génétique du pré-miRNA au sein du plasmide bactérien semble donc fonctionnelle, même si elle a en plus un effet cytotatique que n'a pas le miR-342-5p synthétique. Nous avons mis en évidence que le miR-342-5p synthétique n'a pas d'activité cytotoxique sur des chondrocytes articulaires sains. Nous devons aussi vérifier que l'activité cytotoxique et cytotatique des petits ARNs bactériens issus de la souche *Eh*, modifiée ou non, et des transcrits *in vitro* du pré-miR-342 est limitée à des cellules tumorales en les testant sur des cellules saines non tumorales, comme des chondrocytes articulaires sains ou des fibroblastes dermiques. Les expériences préliminaires sur les lignées CH2879 et OUMS-27 devront aussi être complétées pour valider les effets des différents extraits d'ARN bactérien sur d'autres lignées de CS.

Nous avons essayé de confirmer la fonctionnalité du pré-miR-342 transcrit par la bactérie en le purifiant afin de se débarrasser des autres ARNs bactériens. Malheureusement, le rendement de purification a été trop faible pour obtenir des concentrations suffisantes en miRNA. Il faudrait dans un premier temps augmenter les volumes d'extraits d'ARN bactériens à purifier afin d'augmenter la quantité finale de pré-miR-342 purifié. Dans la littérature, le rendement lors de la purification est un problème récurrent (Li et al., 2014, 2015b; Wang et al., 2015). La stabilité des miRNAs est faible, et les conditions de purification peuvent être parfois trop stringentes pour les miRNAs. Ainsi, il serait nécessaire de revoir notre technique de purification et s'assurer que l'ensemble de l'expérience se déroule dans un environnement sans RNase ou encore il faudra identifier les étapes critiques pouvant conduire à la dégradation des miRNAs. Par ailleurs, il pourrait également être intéressant d'étudier la structure du pré-miRNA synthétisé par la bactérie afin de s'assurer de la bonne formation de la structure en épingle à cheveux.

Notre objectif initial était d'utiliser une bactérie colonisatrice de CS pour produire un miRNA cytotoxique *in vivo* au sein de la tumeur. Toutefois, la bactérie *Eh* qui a été sélectionnée antérieurement à mon projet de thèse n'est pas une bactérie invasive. Les étapes suivantes, avant une utilisation de la bactérie *Eh* modifiée sur les cellules *in vitro* et *in vivo*, consistent en la mise en place d'un système d'invasion de la bactérie *Eh* dans les cellules, puis un système d'autolyse de la bactérie pour libérer le pré-miRNA. En effet, il est nécessaire de faire entrer les bactéries dans les cellules afin qu'elles puissent y libérer les miRNAs. Pour cela, il nous faut mettre en place un système inductible d'invasion. Un système inductible permettrait de déclencher l'invasion des cellules au moment voulu, lorsque les bactéries ont bien colonisé la tumeur et d'éviter ainsi une invasion des bactéries dans d'autres tissus. Le système d'invasion pourrait également être déclenché par des conditions anaérobies. De plus, il faudra s'assurer que les cellules tumorales expriment bien des protéines à leur surface qui permettent aux protéines de liaison de la bactérie de s'y fixer. Cette propriété est essentielle pour permettre l'internalisation sélective des bactéries dans la cellule. Nos perspectives de travail étaient de tester les systèmes d'invasion de *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie peut utiliser deux protéines de surface différentes pour s'internaliser chez les eucaryotes InlA et InlB (Lecuit et al., 1997). InlA est nécessaire pour l'invasion des cellules épithéliales, alors qu'InlB permet l'invasion dans d'autres types cellulaires (hépatocytes, fibroblastes). L'interaction entre la molécule de surface InlB de *L. monocytogenes* et le récepteur eucaryote HGFR Met (« Hepatocyte Growth Factor Receptor Met) permet à *Listeria* de pénétrer dans une cellule eucaryote (Pizarro-Cerdá et al., 2012). La littérature montre que la plupart des cellules de CS et la souche de CS SW1353 expriment HGFR Met (Tsou et al., 2013; Wallenius et al., 2000). Des expériences préliminaires réalisées en collaboration avec le Dr. Torsten Hain (Université de Gießen, Allemagne) ont permis de montrer, pour la première fois, que *L. monocytogenes* peut s'internaliser dans les cellules SW1353. Toutefois, jusqu'à présent l'unité U2RM n'a pas réussi à transformer la bactérie *Eh* avec le système d'invasion de *L. monocytogenes*.

La dernière étape consistera à libérer les miRNAs dans les cellules cancéreuses après leur invasion. A ce stade, nous ne savons pas si notre souche bactérienne internalisée peut s'autolyser ou être lysée par les défenses intracellulaires des cellules de CS. Néanmoins, nous pouvons également imaginer la mise en place d'un système de lyse contrôlée, comme cela a été décrit chez *E. coli* (Callura et al., 2010). Cette étape n'a pas été entreprise à ce jour puisqu'elle est dépendante de la précédente. Une fois ces objectifs atteints, des expériences *in vitro* devront

être réalisées sur différentes lignées cellulaires, puis des tests *in vivo* permettront d'évaluer la toxicité et les possibles effets secondaires que peuvent entraîner ce type de vectorisation.

En cas d'abandon de notre stratégie initiale, d'autres stratégies de vectorisation de miRNAs peuvent être envisagées, comme celles qui ont été décrites précédemment dans des essais cliniques : encapsulation dans des nanoparticules de lipides ou conditionnement dans des EDV par exemple (Rupaimoole and Slack, 2017). Toutefois, ces stratégies induisent des effets secondaires à l'origine de réactions inflammatoires ou immunitaires sévères. Néanmoins, avant d'atteindre ce stade de développement, nous devons au préalable prouver l'efficacité pré-clinique du pré-miRNA-342 dans des modèles de xénogreffe de CS comme cela a été rapporté avec le pré-miR-34a pour l'OS (Wang et al., 2015 ; Zhao et al., 2016).

## 6. Conclusion

La découverte des miRNAs, et leurs implications dans les cancers au début des années 2000 a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu. Outre l'amélioration des traitements par radiothérapie et par chimiothérapie, l'utilisation de la biologie moléculaire jouera un rôle essentiel dans le dépistage et la prise en charge des cancers. La caractérisation des tumeurs, grâce à la biologie moléculaire, permet de préciser le diagnostic et d'identifier les anomalies moléculaires responsables de l'évolution vers un phénotype malin. De plus, l'identification et la compréhension de ces anomalies moléculaires tendent à évoluer vers la mise en place de thérapies ciblées et personnalisées pour le traitement des cancers.

Les miRNAs auront très certainement une place importante parmi ces nouveaux outils moléculaires utilisés en thérapie ciblée. Ils pourront permettre la mise en place de pronostics et diagnostics précoces *via* l'identification de miRNAs circulants, caractéristiques d'un type tumoral. Ils pourront également être directement utilisés comme médicament, même si, à l'heure actuelle, la vectorisation de ces miRNAs thérapeutiques représente un obstacle, un véritable verrou technologique à lever. Malgré tout, les nombreux progrès scientifiques et les innovations technologiques qu'ont connus le domaine de la biologie et de la médecine ces dernières décennies, permettent d'entrevoir un avenir prometteur pour l'utilisation des miRNAs en oncologie.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Ahmed, N., Brawley, V.S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., Liu, E., Dakhova, O., Ashoori, A., Corder, A., et al. (2015). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) – Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol.* *33*, 1688–1696.
- Akhtar, S., and Benter, I.F. (2007). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J. Clin. Invest.* *117*, 3623–3632.
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X., and Letesson, J.-J. (2002). *Yersinia enterocolitica* as a Vehicle for a Naked DNA Vaccine Encoding *Brucella abortus* Bacterioferritin or P39 Antigen. *Infect. Immun.* *70*, 1915–1923.
- Alabdullrahman, L.W., and Byerly, D.W. (2020). Osteochondroma. In *In StatPearls*. StatPearls Publishing, (Treasure Island (FL)), p.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* *25*, 3049–3055.
- Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarrategi, A., Amaral, T., de Alava, E., Menendez, P., Garcia-Castro, J., and Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* *72*, 3097–3113.
- Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M., Erba, E., Bianchi, G., Marchesi, F., Olimpico, C.O., Bonardi, C., Garbi, A., Lissoni, A., et al. (2005). Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res.* *65*, 2964–2971.
- Amary, M.F., Bacsi, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., Berisha, F., Pollock, R., O'Donnell, P., Grigoriadis, A., Diss, T., et al. (2011). IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J. Pathol.* *224*, 334–343.
- Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* *57*, 49–57.
- Anderson, J.C., Clarke, E.J., Arkin, A.P., and Voigt, C.A. (2006). Environmentally Controlled Invasion of Cancer Cells by Engineered Bacteria. *J. Mol. Biol.* *355*, 619–627.
- 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. (2016). A phase II study of clinical activity of SCH 717454 (robatumumab) in patients with relapsed osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* *63*, 1761–1770.
- Ando, K., Mori, K., Corradini, N., Redini, F., and Heymann, D. (2011). Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.* *12*, 285–292.
- Asp, J., Sangiorgi, L., Inerot, S.E., Lindahl, A., Molendini, L., Benassi, M.S., and Picci, P. (2000). Changes of the p16 gene but not the p53 gene in human chondrosarcoma tissues. *Int. J. Cancer* *85*, 782–786.
- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell* *152*, 844–858.
- Avnet, S., Longhi, A., Salerno, M., Halleen, J.M., Perut, F., Granchi, D., Ferrari, S., Bertoni, F., Giunti, A., and Baldini, N. (2008). Increased osteoclast activity is associated with aggressiveness of osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* *33*, 1231–1238.
- Ayala, G., Liu, C., Nicosia, R., Horowitz, S., and Lackman, R. (2000). Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. *Hum. Pathol.* *31*, 341–346.
- Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2008). Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* *4*, 195–204.
- Baban, C.K., Cronin, M., O'Hanlon, D., O'Sullivan, G.C., and Tangney, M. (2010). Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioeng. Bugs* *1*, 385–394.
- Babar, I.A., Cheng, C.J., Booth, C.J., Liang, X., Weidhaas, J.B., Saltzman, W.M., and Slack, F.J. (2012). Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E1695–E1704.
- Bader, A.G. (2012). miR-34 – a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front. Genet.* *3*.

- Bader, A.G., Brown, D., and Winkler, M. (2010). The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Res.* *70*, 7027–7030.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* *455*, 64–71.
- Bandara, K.V., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2017). MicroRNA Biogenesis in Hypoxia. *MicroRNA* *6*.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* *116*, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Bartel, D.P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* *173*, 20–51.
- Basyuk, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* *31*, 6593–6597.
- Behjati, S., Tarpey, P.S., Haase, K., Ye, H., Young, M.D., Alexandrov, L.B., Farndon, S.J., Collord, G., Wedge, D.C., Martincorena, I., et al. (2017). Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nat. Commun.* *8*, 15936.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2570–2581.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Mol. Cell* *28*, 328–336.
- Bermudes, D., Zheng, L., and King, I.C. (2002). Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* *5*, 194–199.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Bernstein-Molho, R., Kollender, Y., Issakov, J., Bickels, J., Dadia, S., Flusser, G., Meller, I., Sagi-Eisenberg, R., and Merimsky, O. (2012). Clinical activity of mTOR inhibition in combination with cyclophosphamide in the treatment of recurrent unresectable chondrosarcomas. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *70*, 855–860.
- Bertino, Göker, Gorlick, Li, and Banerjee (1996). Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* *1*, 223–226.
- Biasiolo, M., Sales, G., Lionetti, M., Agnelli, L., Todoerti, K., Bisognin, A., Coppe, A., Romualdi, C., Neri, A., and Bortoluzzi, S. (2011). Impact of Host Genes and Strand Selection on miRNA and miRNA\* Expression. *PLoS One* *6*, e23854.
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., et al. (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* *20*, 776–790.
- Bielack, S.S., Smeland, S., Whelan, J.S., Marina, N., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M.D., Gebhardt, M., Pápai, Z., Meyer, J., et al. (2015). Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Respons. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2279–2287.
- Blum, J.S., and Saltzman, W.M. (2008). High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *J. Control. Release* *129*, 66–72.
- Boehme, K., Schleicher, S., Traub, F., and Rolauffs, B. (2018). Chondrosarcoma: A Rare Misfortune in Aging Human Cartilage? The Role of Stem and Progenitor Cells in Proliferation, Malignant Degeneration and Therapeutic Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 311.
- Boeuf, S., Bovée, J.V.M.G., Lehner, B., Hogendoorn, P.C.W., and Richter, W. (2010). Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology* *56*, 641–651.
- Bohnsack, M.T., Czapinski, K., and Gorlick, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* *10*, 185–191.
- Bouvier, C., Macagno, N., Nguyen, Q., Loundou, A., Jiguet-Jiglaire, C., Gentet, J.-C., Jouve, J.-L., Rochwerger, A., Mattei, J.-C., Bouvard, D., et al. (2016). Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and  $\beta$ 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* *7*, 64702–64710.
- Bovée, J.V.M.G., van den Broek, L.J., Cleton-Jansen, A.M., and Hogendoorn, P.C.W. (2000). Up-regulation of PTHrP and Bcl-2 expression characterizes the progression of osteochondroma towards peripheral chondrosarcoma and is a late event in central chondrosarcoma. *Lab. Invest.* *80*, 1925–1934.
- Bovée, J.V.M.G., Hogendoorn, P.C.W., Wunder, J.S., and Alman, B.A. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 481–488.

- Boyce, B.F., and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* *473*, 139–146.
- Bracken, C.P., Scott, H.S., and Goodall, G.J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 719–732.
- Brard, C., Piperno-Neumann, S., Delaye, J., Brugières, L., Hampson, L. V, Le Teuff, G., Le Deley, M.-C., and Gaspar, N. (2019). Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open* *9*, e025877.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.
- Briccoli, A., Rocca, M., Salone, M., Bacci, G., Ferrari, S., Balladelli, A., and Mercuri, M. (2005). Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer* *104*, 1721–1725.
- Brownawell, A.M., and Macara, I.G. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* *156*, 53–64.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., and Lyko, F. (2007). The Human let-7a-3 Locus Contains an Epigenetically Regulated MicroRNA Gene with Oncogenic Function. *Cancer Res.* *67*, 1419–1423.
- Buddingh, E.P., Kuijjer, M.L., Duim, R.A.J., Burger, H., Agelopoulos, K., Myklebost, O., Serra, M., Mertens, F., Hogendoorn, P.C.W., Lankester, A.C., et al. (2011). Tumor-Infiltrating Macrophages Are Associated with Metastasis Suppression in High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for Treatment with Macrophage Activating Agents. *Clin. Cancer Res.* *17*, 2110–2119.
- Burrow, S., Andrulis, I.L., Pollak, M., and Bell, R.S. (1998). Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* *69*, 21–27.
- Buttaro, C., and Fruehauf, J. (2010). Engineered E. coli as Vehicles for Targeted Therapeutics. *Curr. Gene Ther.* *10*, 27–33.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 857–866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 15524–15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2999–3004.
- Callura, J.M., Dwyer, D.J., Isaacs, F.J., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2010). Tracking, tuning, and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15898–15903.
- Campbell, V.T., Nadesan, P., Ali, S.A., Wang, C.Y.Y., Whetstone, H., Poon, R., Wei, Q., Keilty, J., Proctor, J., Wang, L.W., et al. (2014). Hedgehog pathway inhibition in chondrosarcoma using the smoothened inhibitor IPI-926 directly inhibits sarcoma cell growth. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 1259–1269.
- Carroll, V.A., and Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev. Mol. Med.* *7*, 1–16.
- Le Cesne, A., Marec-Berard, P., Blay, J.-Y., Gaspar, N., Bertucci, F., Penel, N., Bompas, E., Cousin, S., Toulmonde, M., Bessedé, A., et al. (2019). Programmed cell death 1 (PD-1) targeting in patients with advanced osteosarcomas: results from the PEMBROSARC study. *Eur. J. Cancer* *119*, 151–157.
- Chan, L.H., Wang, W., Yeung, W., Deng, Y., Yuan, P., and Mak, K.K. (2014). Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression. *Oncogene* *33*, 4857–4866.
- Chang, J., Guo, J.-T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., and Block, T.M. (2008a). Liver-Specific MicroRNA miR-122 Enhances the Replication of Hepatitis C Virus in Nonhepatic Cells. *J. Virol.* *82*, 8215–8223.
- Chang, L., Shrestha, S., LaChaud, G., Scott, M.A., and James, A.W. (2015). Review of microRNA in osteosarcoma and chondrosarcoma. *Med. Oncol.* *32*, 613.
- Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C. V, Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008b). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* *40*, 43–50.
- Chauveinc, L., Mosseri, V., Quintana, E., Desjardins, L., Schlienger, P., Doz, F., and Dutrillaux, B. (2001). Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* *22*, 77–88.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broome, A.J., Zhou, Z., H., L.D., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-

- loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179–e179.
- Chen, C., Zhou, H., Wei, F., Jiang, L., Liu, X., Liu, Z., and Ma, Q. (2011a). Increased levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* 29, 143–151.
- Chen, C., Ma, Q., Ma, X., Liu, Z., and Liu, X. (2011b). Association of Elevated HIF-2 $\alpha$  Levels with Low Beclin 1 Expression and Poor Prognosis in Patients with Chondrosarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 2364–2372.
- Chen, C., Tian, A., Zhou, H., Zhang, X., Liu, Z., and Ma, X. (2020). Upregulation of miR-211 Promotes Chondrosarcoma Development via Targeting Tumor Suppressor VHL. *Onco. Targets. Ther. Volume 13*, 2935–2943.
- Chen, H., Ghorri-Javed, F.Y., Rashid, H., Serra, R., Gutierrez, S.E., and Javed, A. (2011c). Chondrocyte-Specific Regulatory Activity of Runx2 Is Essential for Survival and Skeletal Development. *Cells Tissues Organs* 194, 161–165.
- Chen, J., Yan, D., Wu, W., Zhu, J., Ye, W., and Shu, Q. (2016). MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. *Oncol. Rep.* 35, 3285–3292.
- Chen, T., Li, Y., Cao, W., and Liu, Y. (2018a). miR-491-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting PKM2. *Oncol. Lett.* 16, 6472–6478.
- Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E.M., and Xie, C. (2018b). Osteoblast–osteoclast interactions. *Connect. Tissue Res.* 59, 99–107.
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 771–794.
- Cho, H.-J., Lee, T.-S., Park, J.-B., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Sin, D.-I., Park, Y.-Y., Moon, Y.-S., Lee, K.-G., Yeo, J.-H., et al. (2007). Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 1069–1076.
- Choi, W.-Y., Giraldez, A.J., and Schier, A.F. (2007). Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science (80-. )*. 318, 271–274.
- Chou, A.J., Kleinerman, E.S., Krailo, M.D., Chen, Z., Betcher, D.L., Healey, J.H., Conrad, E.U. 3rd, Nieder, M.L., Weiner, M.A., Wells, R.J., et al. (2009). Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a report from the Children’s Oncology Group. *Cancer* 115, 5339–5348.
- Chow, W., Frankel, P., Ruel, C., Araujo, D.M., Milhem, M., Okuno, S., Hartner, L., Undevia, S., and Staddon, A. (2020). Results of a prospective phase 2 study of pazopanib in patients with surgically unresectable or metastatic chondrosarcoma. *Cancer* 126, 105–111.
- Cintra, F.F., Etchebehere, M., Gonçalves, J.C.B., Cassone, A.E., and Amstalden, E.M.I. (2014). Vascular Pattern in Enchondroma and Chondrosarcoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 22, 600–605.
- Clark, J.C.M., Dass, C.R., and Choong, P.F.M. (2009). Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J. Surg.* 79, 327–336.
- Clayer, M. (2015). Many faces of osteosarcoma on plain radiographs. *ANZ J. Surg.* 85, 22–26.
- Coley, W.B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc. R. Soc. Med.* 3, 1–48.
- Collins, S., Guinn, B., Harrison, P., Scallan, M., O’Sullivan, G., and Tangney, M. (2008). Viral Vectors in Cancer Immunotherapy: Which Vector for Which Strategy? *Curr. Gene Ther.* 8, 66–78.
- Connell, H.C. (1935). The Study and Treatment of Cancer by Proteolytic Enzymes: Preliminary Report. *Can. Med. Assoc. J.* 33, 364–370.
- Corcoran, D.L., Pandit, K. V, Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N., and Benos, P. V (2009). Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* 4, e5279.
- Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J.A., Heymans, S., and Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3, 499–506.
- Costantino, L., and Barlocco, D. (2008). STAT 3 as a Target for Cancer Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* 15, 834–843.
- Courvalin, P., Goussard, S., and Grillot-Courvalin, C. (1995). Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C. R. Acad. Sci. III.* 318, 1207–1212.
- van Cruijssen, H., Voest, E.E., Punt, C.J.A., Hoekman, K., Witteveen, P.O., Meijerink, M.R., Puchalski, T.A., Robertson, J., Saunders, O., Jürgensmeier, J.M., et al. (2010). Phase I evaluation of cediranib, a selective VEGFR signalling inhibitor, in combination with gefitinib in patients with advanced tumours. *Eur. J. Cancer* 46, 901–911.
- Czarnecka, A.M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., Grieb, P., and

- Rutkowski, P. (2020). Molecular Biology of Osteosarcoma. *Cancers (Basel)*. *12*, 2130.
- Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 19–31.
- Dahlin, D.C. (1975). Pathology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 23–32.
- Dai, N., Qing, Y., Cun, Y., Zhong, Z., Li, C., Zhang, S., Shan, J., Yang, X., Dai, X., Cheng, Y., et al. (2018). miR-513a-5p regulates radiosensitivity of osteosarcoma by targeting human apurinic/apyrimidinic endonuclease. *Oncotarget* *9*.
- Dai, X., Ma, W., He, X., and Jha, R.K. (2011). Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. *Med. Sci. Monit.* *17*, RA177-190.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* *462*, 739–744.
- 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. (2019). Randomized Double-Blind Phase II Study of Regorafenib in Patients With Metastatic Osteosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *37*, 1424–1431.
- Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H.J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., and Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* *464*, 1067–1070.
- Deeks, E.D. (2014). Nivolumab: A Review of Its Use in Patients with Malignant Melanoma. *Drugs* *74*, 1233–1239.
- Delaunay-Lemarié, C. (2011). Intérêt de l'analyse du niveau d'expression de C1CP et C2CP par technique immunohistochimique pour le diagnostic différentiel entre chondrome et chondrosarcome. UHP - Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- Deng, J., Huang, Q., Wang, Y., Shen, P., Guan, F., Li, J., Huang, H., and Shi, C. (2014). Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates autophagy to activate hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *454*, 328–334.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- Denoyelle, C., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Vigneron, N., Brotin, E., Lecerf, C., Abeilard, E., Giffard, F., Louis, M.-H., Gauduchon, P., et al. (2014). miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis.* *5*, e1445.
- Deraniyagala, R.L., Yeung, D., Mendenhall, W.M., Li, Z., Morris, C.G., Mendenhall, N.P., Okunieff, P., and Malyapa, R.S. (2014). Proton therapy for skull base chordomas: an outcome study from the university of Florida proton therapy institute. *J. Neurol. Surg. B. Skull Base* *75*, 53–57.
- Dey, B.K., Gagan, J., Yan, Z., and Dutta, A. (2012). miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes Dev.* *26*, 2180–2191.
- Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell* *131*, 1097–1108.
- Dönmez, F.Y., Tüzün, U., Başaran, C., Tunaci, M., Bilgiç, B., and Acunaş, G. (2008). MRI findings in parosteal osteosarcoma: correlation with histopathology. *Diagn. Interv. Radiol.* *14*, 142–152.
- Dorfman, H.D., and Czerniak, B. (1995). Bone cancers. *Cancer* *75*, 203–210.
- Drilon, A.D., Popat, S., Bhuchar, G., D'Adamo, D.R., Keohan, M.L., Fisher, C., Antonescu, C.R., Singer, S., Brennan, M.F., Judson, I., et al. (2008). Extraskelatal myxoid chondrosarcoma. *Cancer* *113*, 3364–3371.
- Du, Z., Li, F., Wang, L., Huang, H., and Xu, S. (2018). Regulatory effects of microRNA-184 on osteosarcoma via the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Mol. Med. Rep.*
- Duffaud, F., Mir, O., Boudou-Rouquette, P., Piperno-Neumann, S., Penel, N., Bompas, E., Delcambre, C., Kalbacher, E., Italiano, A., Collard, O., et al. (2019). Efficacy and safety of regorafenib in adult patients with metastatic osteosarcoma: a non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet. Oncol.* *20*, 120–133.
- Dumars, C., Ngyuen, J.-M., Gaultier, A., Lanel, R., Corradini, N., Gouin, F., Heymann, D., and Heymann, M.-F. (2016). Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* *7*, 78343–78354.
- Duncan, R., and Izzo, L. (2005). Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 2215–2237.
- Durfee, R.A., Mohammed, M., and Luu, H.H. (2016). Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatol. Ther.* *3*, 221–243.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017a). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture.

- Physiology (Bethesda). *32*, 266–277.
- Duval, M., Cossart, P., and Lebreton, A. (2017b). Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. *Semin. Cell Dev. Biol.* *65*, 11–19.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* *4*, 721–726.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188–200.
- Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 550–562.
- Errani, C., Longhi, A., Rossi, G., Rimondi, E., Biazzo, A., Toscano, A., Ali, N., Ruggieri, P., Alberghini, M., Picci, P., et al. (2011). Palliative therapy for osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *11*, 217–227.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* *3*, 87–98.
- Evans, H.L., Ayala, A.G., and Romsdahl, M.M. (1977). Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* *40*, 818–831.
- Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 586–593.
- Fang, W., and Bartel, D.P. (2015). The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol. Cell* *60*, 131–145.
- Fang, X., Jiang, C., and Xia, Q. (2015). Effectiveness evaluation of dendritic cell immunotherapy for osteosarcoma on survival rate and in vitro immune response. *Genet. Mol. Res.* *14*, 11763–11770.
- Felgner, S., Pawar, V., Kocijancic, D., Erhardt, M., and Weiss, S. (2017). Tumour-targeting bacteria-based cancer therapies for increased specificity and improved outcome. *Microb. Biotechnol.* *10*, 1074–1078.
- Feng, H., Wang, J., Chen, W., Shan, B., Guo, Y., Xu, J., Wang, L., Guo, P., and Zhang, Y. (2016). Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. Bone Oncol.* *5*, 67–73.
- Ferguson, W.S., and Goorin, A.M. (2001). Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest.* *19*, 292–315.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102–114.
- Fiore, F., Castella, B., Nuschak, B., Bertieri, R., Mariani, S., Bruno, B., Pantaleoni, F., Foglietta, M., Boccadoro, M., and Massaia, M. (2007). Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood* *110*, 921–927.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.
- Flemming, D.J., and Murphey, M.D. (2000). Enchondroma and Chondrosarcoma. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* *Volume 4*, 0059–0072.
- Folkert, I.W., Devalaraja, S., Linette, G.P., Weber, K., and Haldar, M. (2019). Primary Bone Tumors: Challenges and Opportunities for CAR-T Therapies. *J. Bone Miner. Res.* *34*, 1780–1788.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* *1*, 27–31.
- Forbes, N.S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 785–794.
- Forbes, N.S., Coffin, R.S., Deng, L., Evgin, L., Fiering, S., Giacalone, M., Gravekamp, C., Gulley, J.L., Gunn, H., Hoffman, R.M., et al. (2018). White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J. Immunother. Cancer* *6*, 78.
- Fox, M.G., and Trotta, B.M. (2013). Osteosarcoma: review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* *17*, 123–136.
- Fox, E., Aplenc, R., Bagatell, R., Chuk, M.K., Dombi, E., Goodspeed, W., Goodwin, A., Kromplewski, M., Jayaprakash, N., Marotti, M., et al. (2010). A phase I 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 5174–5181.
- Franceschetti, T., Kessler, C.B., Lee, S.-K., and Delany, A.M. (2013). miR-29 Promotes Murine Osteoclastogenesis by Regulating Osteoclast Commitment and Migration. *J. Biol. Chem.* *288*, 33347–33360.
- Franceschini, N., Lam, S.W., Cleton-Jansen, A.-M., and Bovée, J.V.M.G. (2020). What's new in bone forming tumours of the skeleton? *Virchows Arch.* *476*, 147–157.
- Freeman, S.M. (2000). Suicide Gene Therapy. In *Cancer Gene Therapy*, (Boston: Kluwer Academic

- Publishers), pp. 411–422.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fritzsching, B., Fellenberg, J., Moskovszky, L., Sápi, Z., Krenacs, T., Machado, I., Poeschl, J., Lehner, B., Szendrői, M., Bosch, A.L., et al. (2015). CD8(+)/FOXP3(+)-ratio in osteosarcoma microenvironment separates survivors from non-survivors: a multicenter validated retrospective study. *Oncoimmunology* *4*, e990800.
- Fu, W., Chu, L., Han, X., Liu, X., and Ren, D. (2008). Synergistic antitumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in murine tumor models. *J. Gene Med.* *10*, 690–701.
- Fu, X., Jin, L., Wang, X., Luo, A., Hu, J., Zheng, X., Tsark, W.M., Riggs, A.D., Ku, H.T., and Huang, W. (2013). MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 17892–17897.
- Fung, V., Calugaru, V., Bolle, S., Mammar, H., Alapetite, C., Maingon, P., De Marzi, L., Froelich, S., Habrand, J.-L., Dendale, R., et al. (2018). Proton beam therapy for skull base chordomas in 106 patients: A dose adaptive radiation protocol. *Radiother. Oncol.* *128*, 198–202.
- Furumoto, K., Soares, L., Engleman, E.G., and Merad, M. (2004). Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J. Clin. Invest.* *113*, 774–783.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* *5*, e1257.
- Ganai, S., Arenas, R.B., and Forbes, N.S. (2009). Tumor-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice. *Br. J. Cancer* *101*, 1683–1691.
- Gardlik, R., and Fruehauf, J.H. (2010). Bacterial vectors and delivery systems in cancer therapy. *IDrugs* *13*, 701–706.
- Garzon, R., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* *60*, 167–179.
- Garzon, R., Marcucci, G., and Croce, C.M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 775–789.
- Ge, W., Li, J., Fan, W., Xu, D., and Sun, S. (2017). Tim-3 as a diagnostic and prognostic biomarker of osteosarcoma. *Tumour Biol.* *39*, 1010428317715643.
- Geary, R.S., Watanabe, T.A., Truong, L., Freier, S., Lesnik, E.A., Sioufi, N.B., Sasmor, H., Manoharan, M., and Levin, A.A. (2001). Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *296*, 890–897.
- Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2019a). Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 21–37.
- Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2019b). Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 21–37.
- Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C.W., Dijkstra, S.D., van Rijswijk, C.S., Krol, A.D., Taminiou, A.H.M., and Bovee, J.V.M.G. (2008). The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *Oncologist* *13*, 320–329.
- Gelman, A.E., and Turka, L.A. (2003). Autoimmunity heats up. *Nat. Med.* *9*, 1465–1466.
- Germano, G., Frapolli, R., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Pesce, S., Pasqualini, F., Grosso, F., Sanfilippo, R., Casali, P.G., et al. (2010). Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res.* *70*, 2235–2244.
- Goldman, I.D., and Matherly, L.H. (1985). The cellular pharmacology of methotrexate. *Pharmacol. Ther.* *28*, 77–102.
- Gomez-Brouchet, A., Illac, C., Gilhodes, J., Bouvier, C., Aubert, S., Guinebretiere, J.-M., Marie, B., Larousserie, F., Entz-Werlé, N., de Pinieux, G., et al. (2017). CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* *6*, e1331193.
- Gonzalez, H., Hwang, S.J., and Davis, M.E. (1999). New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug. Chem.* *10*, 1068–1074.
- Graham, K., and Unger, E. (2018). Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine Volume 13*, 6049–6058.
- Gregory, R.I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.
- Grignani, G., Palmerini, E., Stacchiotti, S., Boglione, A., Ferraresi, V., Frustaci, S., Comandone, A., Casali, P.G., Ferrari, S., and Aglietta, M. (2011). A

- phase 2 trial of imatinib mesylate in patients with recurrent nonresectable chondrosarcomas expressing platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  or - $\beta$ : An Italian Sarcoma Group study. *Cancer* *117*, 826–831.
- 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. (2012). 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. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 508–516.
- Grignani, G., D'Ambrosio, L., Pignochino, Y., Palmerini, E., Zuchetti, M., Boccone, P., Aliberti, S., Stacchiotti, S., Bertulli, R., Piana, R., et al. (2018). Trabectedin and olaparib in patients with advanced and non-resectable bone and soft-tissue sarcomas (TOMAS): an open-label, phase 1b study from the Italian Sarcoma Group. *Lancet. Oncol.* *19*, 1360–1371.
- Grillot-Courvalin, C. (1999). Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Commentary. Curr. Opin. Biotechnol.* *10*, 477–481.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* *441*, 537–541.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degan, B.M., Rokhsar, D.S., and Bartel, D.P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* *455*, 1193–1197.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* *466*, 835–840.
- Guo, K., Tang, X., Ding, M., Yuan, F., Feng, H., Deng, B., Sun, W., Hou, Y., Gao, L., and Zheng, W. (2016). miR-125b acts as a tumor suppressor in chondrosarcoma cells by the sensitization to doxorubicin through direct targeting the ErbB2-regulated glucose metabolism. *Drug Des. Devel. Ther.* *571*.
- Guo, R., Wang, Y., Shi, W.-Y., Liu, B., Hou, S.-Q., and Liu, L. (2012). MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. *Molecules* *17*, 14733–14747.
- Guo, Y., Tang, C.-Y., Man, X.-F., Tang, H.-N., Tang, J., Zhou, C.-L., Tan, S.-W., Wang, M., Feng, Y.-Z., and Zhou, H.-D. (2017). Insulin-like growth factor-1 promotes osteogenic differentiation and collagen I alpha 2 synthesis via induction of mRNA-binding protein LARP6 expression. *Dev. Growth Differ.* *59*, 94–103.
- Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A.M., Evers, S., Macara, I.G., and Dargemont, C. (2004). Minihelix-containing RNAs Mediate Exportin-5-dependent Nuclear Export of the Double-stranded RNA-binding Protein ILF3. *J. Biol. Chem.* *279*, 884–891.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.
- Ha, I., Wightman, B., and Ruvkun, G. (1996). A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev.* *10*, 3041–3050.
- Hamam, R., Ali, A.M., Alsaleh, K.A., Kassem, M., Alfayez, M., Aldahmash, A., and Alajez, N.M. (2016). microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci. Rep.* *6*, 25997.
- Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016–3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* *125*, 887–901.
- Han, Q., Shi, H., and Liu, F. (2016). CD163 + M2-type tumor-associated macrophage support the suppression of tumor-infiltrating T cells in osteosarcoma. *Int. Immunopharmacol.* *34*, 101–106.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanna, J., Wimberly, H., Kumar, S., Slack, F., Agarwal, S., and Rimm, D. (2012). Quantitative analysis of microRNAs in tissue microarrays by in situ hybridization. *Biotechniques* *52*.
- Hansen, M.F., Seton, M., and Merchant, A. (2006). Osteosarcoma in Paget's Disease of Bone. *J. Bone Miner. Res.* *21*, P58–P63.
- Harris, A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 38–47.
- Hayes, J., Peruzzi, P.P., and Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* *20*, 460–469.
- Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring*

- Harb. *Perspect. Biol.* 8.
- Helpfenstein, A., Frahm, S.O., Krams, M., Drescher, W., Parwaresch, R., and Hassenpflug, J. (2004). Minichromosome Maintenance Protein (MCM6) in Low-Grade Chondrosarcoma: Distinction From Enchondroma and Identification of Progressive Tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 912–918.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., Jünemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 27, 3300–3310.
- Heymann, D., and Rédini, F. (2013). Targeted therapies for bone sarcomas. *Bonekey Rep.* 2, 378.
- Heymann, M., Schiavone, K., and Heymann, D. (2020). Bone sarcomas in the immunotherapy era. *Br. J. Pharmacol.* bph.14999.
- Higuchi, T., Miyake, K., Oshiro, H., Sugisawa, N., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., Igarashi, K., Chawla, S.P., et al. (2019). Trabectedin and irinotecan combination regresses a cisplatin-resistant osteosarcoma in a patient-derived orthotopic xenograft nude-mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 326–331.
- Hirotsu, M., Setoguchi, T., Sasaki, H., Matsunoshita, Y., Gao, H., Nagao, H., Kunigou, O., and Komiya, S. (2010). Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma. *Mol. Cancer* 9, 5.
- Ho, P.Y., and Yu, A.-M. (2016). Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7, 186–197.
- Ho, P.Y., Duan, Z., Batra, N., Jilek, J.L., Tu, M.-J., Qiu, J.-X., Hu, Z., Wun, T., Lara, P.N., De Vere White, R.W., et al. (2018). Bioengineered Noncoding RNAs Selectively Change Cellular miRNome Profiles for Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 365, 494–506.
- Hoang, B.H. (2012). Wnt, osteosarcoma, and future therapy. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 20, 58–59.
- Hou, Z., Qin, X., Hu, Y., Zhang, X., Li, G., Wu, J., Li, J., Sha, J., Chen, J., Xia, J., et al. (2019). Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection. *Circ. Res.* 124, 1386–1400.
- Hsu, C.-J., Wu, M.-H., Chen, C.-Y., Tsai, C.-H., Hsu, H.-C., and Tang, C.-H. (2013). AMP-activated protein kinase activation mediates CCL3-induced cell migration and matrix metalloproteinase-2 expression in human chondrosarcoma. *Cell Commun. Signal.* 11, 68.
- Hua, G., Liu, Y., Li, X., Xu, P., and Luo, Y. (2014). Targeting glucose metabolism in chondrosarcoma cells enhances the sensitivity to doxorubicin through the inhibition of lactate dehydrogenase-A. *Oncol. Rep.* 31, 2727–2734.
- Huang K, Chen J, Yang MS, Tang YJ, Pan F. Inhibition of Src by microRNA-23b increases the cisplatin sensitivity of chondrosarcoma cells. *Cancer Biomark.* 2017;18(3):231-239.
- Hui, J.Y.C. (2016). Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surg. Clin. North Am.* 96, 901–914.
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., et al. (2008). Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One* 3, e3694.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Hutvágner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838.
- Igarashi, K., Murakami, T., Kawaguchi, K., Kiyuna, T., Miyake, K., Zhang, Y., Nelson, S.D., Dry, S.M., Li, Y., Yanagawa, J., et al. (2017). A patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model of a cisplatin-resistant osteosarcoma lung metastasis that was sensitive to temozolomide and trabectedin: implications for precision oncology. *Oncotarget* 8, 62111–62119.
- Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2011). Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development* 138, 1507–1519.
- Inagaki, Y., Hookway, E., Williams, K.A., Hassan, A.B., Oppermann, U., Tanaka, Y., Soilleux, E., and Athanasou, N.A. (2016). Dendritic and mast cell involvement in the inflammatory response to primary malignant bone tumours. *Clin. Sarcoma Res.* 6, 13.
- Inose, H., Ochi, H., Kimura, A., Fujita, K., Xu, R., Sato, S., Iwasaki, M., Sunamura, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., et al. (2009). A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20794–20799.
- Iorio, M. V., and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J. Clin. Oncol.* 27, 5848–5856.
- Iorio, M. V., and Croce, C.M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* 4, 143–159.
- Ipsaro, J.J., and Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-

- interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 20–28.
- Isakoff, M.S., Bielack, S.S., Meltzer, P., and Gorlick, R. (2015). Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol.* *33*, 3029–3035.
- Italiano, A., Le Cesne, A., Bellera, C., Piperno-Neumann, S., Duffaud, F., Penel, N., Cassier, P., Domont, J., Takebe, N., Kind, M., et al. (2013). GDC-0449 in patients with advanced chondrosarcomas: a French Sarcoma Group/US and French National Cancer Institute Single-Arm Phase II Collaborative Study. *Ann. Oncol.* *24*, 2922–2926.
- Iwasaki, S., and Tomari, Y. (2009). Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly (Austin)*. *3*, 204–206.
- Jabeen, S., Holmboe, L., Alnæs, G.I.G., Andersen, A.M., Hall, K.S., and Kristensen, V.N. (2015). Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J.* *15*, 385–390.
- Jain, R.K., and Munn, L.L. (2000). Leaky vessels? Call Ang! *Nat. Med.* *6*, 131–132.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S., and Van Hul, W. (2005). Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* *26*, 743–774.
- Jefferson, T., Formoso, G., Venturelli, F., Vicentini, M., Chiarolla, E., and Ballini, L. (2019). Hadrontherapy for cancer. An overview of HTA reports and ongoing studies. *Recenti Prog. Med.* *110*, 566–586.
- Ji, X., Chen, X., and Yu, X. (2016). MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 349.
- Jia, L.-J., and Hua, Z.-C. (2009). Development of bacterial vectors for tumor-targeted gene therapy. *Methods Mol. Biol.* *542*, 131–154.
- Jiang, D., Zheng, X., Shan, W., and Shan, Y. (2016). The overexpression of miR-30a affects cell proliferation of chondrosarcoma via targeting Runx2. *Tumor Biol.* *37*, 5933–5940.
- Jiang, S.-N., Phan, T.X., Nam, T.-K., Nguyen, V.H., Kim, H.-S., Bom, H.-S., Choy, H.E., Hong, Y., and Min, J.-J. (2010). Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Combination of Escherichia coli – mediated Cytolytic Therapy and Radiotherapy. *Mol. Ther.* *18*, 635–642.
- Jiao, G., Guo, W., Ren, T., Lu, Q., Sun, Y., Liang, W., Ren, C., Yang, K., and Sun, K. (2014). BMPR2 inhibition induced apoptosis and autophagy via destabilization of XIAP in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis.* *5*, e1571–e1571.
- Jin, Y., Elalaf, H., Watanabe, M., Tamaki, S., Hinenno, S., Matsunaga, K., Woltjen, K., Kobayashi, Y., Nagata, S., Ikeya, M., et al. (2015). Mutant IDH1 Dysregulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Association with Gene-Specific Histone Modifications to Cartilage- and Bone-Related Genes. *PLoS One* *10*, e0131998.
- Jo, V.Y., and Doyle, L.A. (2016). Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013 World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* *25*, 621–643.
- Johnston, S., Martin, M., Di Leo, A., Im, S.-A., Awada, A., Forrester, T., Frenzel, M., Hardebeck, M.C., Cox, J., Barriga, S., et al. (2019). MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer* *5*, 5.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 421–433.
- Jones, R.L., Katz, D., Loggers, E.T., Davidson, D., Rodler, E.T., and Pollack, S.M. (2017). Clinical benefit of antiangiogenic therapy in advanced and metastatic chondrosarcoma. *Med. Oncol.* *34*, 167.
- de Jong, Y., van Maldegem, A.M., Marino-Enriquez, A., de Jong, D., Suijker, J., Briaire-de Bruijn, I.H., Kruisselbrink, A.B., Cleton-Jansen, A.-M., Szuhai, K., Gelderblom, H., et al. (2016). Inhibition of Bcl-2 family members sensitizes mesenchymal chondrosarcoma to conventional chemotherapy: report on a novel mesenchymal chondrosarcoma cell line. *Lab. Invest.* *96*, 1128–1137.
- de Jong, Y., Monderer, D., Brandinelli, E., Monchanin, M., van den Akker, B.E., van Oosterwijk, J.G., Blay, J.Y., Dutour, A., and Bovée, J.V.M.G. (2018). Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma. *Oncogenesis* *7*, 74.
- de Jong, Y., Ingola, M., Briaire-de Bruijn, I.H., Kruisselbrink, A.B., Venneker, S., Palubeckaite, I., Heijs, B.P.A.M., Cleton-Jansen, A.-M., Haas, R.L.M., and Bovée, J.V.M.G. (2019). Radiotherapy resistance in chondrosarcoma cells; a possible correlation with alterations in cell cycle related genes. *Clin. Sarcoma Res.* *9*, 9.
- Jopling, C.L. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science (80-. )*. *309*, 1577–1581.
- Juárez, P., and Guise, T.A. (2011). TGF-β in cancer and

- bone: implications for treatment of bone metastases. *Bone* 48, 23–29.
- Kager, L., Pötschger, and Bielack (2010). Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 279.
- Kalariya, N., Brassil, K., and Calin, G. (2017). MicroRNAs: Clinical Trials and Potential Applications. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 21, 554–559.
- Kalinski, T., Sel, S., Kouznetsova, I., Röpke, M., and Roessner, A. (2009). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol. - Res. Pract.* 205, 339–345.
- Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140, 4129–4144.
- Kansara, M., Teng, M.W., Smyth, M.J., and Thomas, D.M. (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* 14, 722–735.
- Kappel, C.C., Velez-Yanguas, M.C., Hirschfeld, S., and Helman, L.J. (1994). Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for in vitro growth. *Cancer Res.* 54, 2803–2807.
- Karakashev, S. V, and Reginato, M.J. (2015). Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy. *Cancer Manag. Res.* 7, 253–264.
- Kasinskas, R.W., and Forbes, N.S. (2007). Salmonella typhimurium Lacking Ribose Chemoreceptors Localize in Tumor Quiescence and Induce Apoptosis. *Cancer Res.* 67, 3201–3209.
- Kaszubiak, A., Holm, P.S., and Lage, H. (2007). Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *Int. J. Oncol.* 31, 419–430.
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *Eur. J. Cancer Care (Engl).* 26.
- Kawashima, A., Okada, Y., Nakanishi, I., Ueda, Y., Iwata, K., and Roessner, A. (1997). Immunolocalization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human chondrosarcomas. *Gen. Diagn. Pathol.* 142, 129–137.
- Kay, A.B. (2001). Allergy and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 344, 30–37.
- Kaya, M., Wada, T., Akatsuka, T., Kawaguchi, S., Nagoya, S., Shindoh, M., Higashino, F., Mezawa, F., Okada, F., and Ishii, S. (2000). Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 572–577.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2011). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017–1026.
- Khan, N., Mironov, G., and Berezovski, M. V. (2016). Direct detection of endogenous MicroRNAs and their post-transcriptional modifications in cancer serum by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2891–2899.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209–216.
- Kim, B.M., Hong, Y., Lee, S., Liu, P., Lim, J.H., Lee, Y.H., Lee, T.H., Chang, K.T., and Hong, Y. (2015). Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26880–26913.
- Kim, D., Kim, K.-O., Shin, M.J., Ha, J., Seo, S., Yang, J., and Lee, F.Y. (2009a). siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol. Cancer* 8, 28.
- Kim, D.W., Seo, S.W., Cho, S.K., Chang, S.S., Lee, H.W., Lee, S.E., Block, J.A., Hei, T.K., and Lee, F.Y. (2007). Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J. Orthop. Res.* 25, 820–828.
- Kim, M., Cho, K., Ayala, A.G., and Ro, J.Y. (2011). Chondrosarcoma: With Updates on Molecular Genetics. *Sarcoma* 2011, 1–15.
- Kim, S.H., Jeong, J.H., Lee, S.H., Kim, S.W., and Park, T.G. (2006). PEG conjugated VEGF siRNA for antiangiogenic gene therapy. *J. Control. Release* 116, 123–129.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139.
- Kingsley, L.A., Fournier, P.G.J., Chirgwin, J.M., and Guise, T.A. (2007). Molecular biology of bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2609–2617.
- Klein, M.J., and Siegal, G.P. (2006). Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 555–581.
- Klenke, F.M., Abdollahi, A., Bertl, E., Gebhard, M.-M., Ewerbeck, V., Huber, P.E., and Skell, A. (2007). Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC Cancer* 7, 49.
- Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37, 364–372.

- Koirala, P., Roth, M.E., Gill, J., Piperdi, S., Chinai, J.M., Geller, D.S., Hoang, B.H., Park, A., Fremed, M.A., Zang, X., et al. (2016). Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* *6*, 30093.
- Kong, W., He, L., Richards, E.J., Challa, S., Xu, C.-X., Permeth-Wey, J., Lancaster, J.M., Coppola, D., Sellers, T.A., Djeu, J.Y., et al. (2014). Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* *33*, 679–689.
- Kostine, M., Cleven, A.H., de Miranda, N.F.C.C., Italiano, A., Cleton-Jansen, A.-M., and Bovée, J.V.M.G. (2016). Analysis of PD-L1, T-cell infiltrate and HLA expression in chondrosarcoma indicates potential for response to immunotherapy specifically in the dedifferentiated subtype. *Mod. Pathol. an Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc* *29*, 1028–1037.
- Kouvaras, E., Christoni, Z., Siasios, I., Malizos, K., Koukoulis, G.K., and Ioannou, M. (2019). Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in cartilage tumors. *Biotech. Histochem.* *94*, 283–289.
- Kovar, H., Bierbaumer, L., and Radic-Sarikas, B. (2020). The YAP/TAZ Pathway in Osteogenesis and Bone Sarcoma Pathogenesis. *Cells* *9*, 972.
- Krishnadas, D.K., Shusterman, S., Bai, F., Diller, L., Sullivan, J.E., Cheerva, A.C., George, R.E., and Lucas, K.G. (2015). 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.* *64*, 1251–1260.
- Kruehn, A., Wang, A., Fruehauf, J.H., and Lage, H. (2009). Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle* *8*, 3349–3354.
- Kubo, T., Sugita, T., Shimose, S., Matsuo, T., Arihiro, K., and Ochi, M. (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* *90*, 364–370.
- Kuchenbauer, F., Mah, S.M., Heuser, M., McPherson, A., Rüschemann, J., Rouhi, A., Berg, T., Bullinger, L., Argiropoulos, B., Morin, R.D., et al. (2011). Comprehensive analysis of mammalian miRNA\* species and their role in myeloid cells. *Blood* *118*, 3350–3358.
- Lage, H., and Fruehauf, J.H. (2011). Research Spotlight: Delivery of therapeutic RNA molecules to cancer cells by bacteria. *Ther. Deliv.* *2*, 441–449.
- Lages, E., Ipas, H., Guttin, A., Nesr, H., Berger, F., and Issartel, J.-P. (2012). MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* *17*, 2508–2540.
- Lagos-Quintana, M. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (80- )*. *294*, 853–858.
- Lakkaraju, A., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* *18*, 199–209.
- Lambert, B., Meryet-Figuère, M., Gauduchon, P., Vigneron, N., Brotin, E., Poulain, L., and Denoyelle, C. (2015). miRNAs as tools for tailoring personalized therapeutic strategies in ovarian carcinoma. *RNA Dis.*
- Lamora, A., Talbot, J., Mullard, M., Brounais-Le Royer, B., Redini, F., and Verrecchia, F. (2016). TGF- $\beta$  Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* *5*, 96.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *373*, 23–34.
- Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., Caffarel, M., Araujo, A., Araiz, M., Fernandez-Mercado, M., et al. (2016). New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 627.
- Lau, N.C. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80- )*. *294*, 858–862.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., et al. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *141*, 672–675.
- Lechler, P., Renkawitz, T., Campean, V., Balakrishnan, S., Tingart, M., Grifka, J., and Schaumburger, J. (2011). The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. *BMC Cancer* *11*, 120.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* *65*, 5309–5319.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80- )*. *294*, 862–864.

- Lee, S., and Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. *3*, 3856–3893.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.
- Lefebvre, V. (2019). Roles and regulation of SOX transcription factors in skeletogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* *133*, 171–193.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* *37*, 646–650.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* *120*, 15–20.
- Li, W., and Ruan, K. (2009). MicroRNA detection by microarray. *Anal. Bioanal. Chem.* *394*, 1117–1124.
- Li, J., Wang, L., Liu, Z., Zu, C., Xing, F., Yang, P., Yang, Y., Dang, X., and Wang, K. (2015a). MicroRNA-494 inhibits cell proliferation and invasion of chondrosarcoma cells in vivo and in vitro by directly targeting SOX9. *Oncotarget* *6*, 26216–26229.
- Li, M.-M., Wang, W.-P., Wu, W.-J., Huang, M., and Yu, A.-M. (2014). Rapid production of novel pre-microRNA agent hsa-mir-27b in *Escherichia coli* using recombinant RNA technology for functional studies in mammalian cells. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 1791–1795.
- Li, M.-M., Addepalli, B., Tu, M.-J., Chen, Q.-X., Wang, W.-P., Limbach, P.A., LaSalle, J.M., Zeng, S., Huang, M., and Yu, A.-M. (2015b). Chimeric MicroRNA-1291 Biosynthesized Efficiently in *Escherichia coli* Is Effective to Reduce Target Gene Expression in Human Carcinoma Cells and Improve Chemosensitivity. *Drug Metab. Dispos.* *43*, 1129–1136.
- Li, Q.-C., Xu, H., Wang, X., Wang, T., and Wu, J. (2017). miR-34a increases cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells in vitro through up-regulation of c-Myc and Bim signal. *Cancer Biomarkers* *21*, 135–144.
- Li, S., Chou, A.P., Chen, W., Chen, R., Deng, Y., Phillips, H.S., Selfridge, J., Zurayk, M., Lou, J.J., Everson, R.G., et al. (2013a). Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro. Oncol.* *15*, 57–68.
- Li, X., Liu, Y., Granberg, K.J., Wang, Q., Moore, L.M., Ji, P., Gumin, J., Sulman, E.P., Calin, G.A., Haapasalo, H., et al. (2015c). Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene* *34*, 1619–1628.
- Li, Y., Fan, L., Liu, S., Liu, W., Zhang, H., Zhou, T., Wu, D., Yang, P., Shen, L., Chen, J., et al. (2013b). The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic–osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials* *34*, 5048–5058.
- Li, Y., Wang, D., and Fang, X. (2019a). In Vitro Generation of Anti-Osteosarcoma Cytotoxic Activity Using Dendritic Cells Loaded with Heat Shock Protein 70-Peptide Complexes. *Fetal Pediatr. Pathol.* *38*, 387–398.
- Li, Y.-S., Liu, Q., Tian, J., He, H.-B., and Luo, W. (2019b). Angiogenesis Process in Osteosarcoma: An Updated Perspective of Pathophysiology and Therapeutics. *Am. J. Med. Sci.* *357*, 280–288.
- Li, Z., Hassan, M.Q., Volinia, S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Croce, C.M., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2008). A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 13906–13911.
- Lie, D.-C., Colamarino, S.A., Song, H.-J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., et al. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* *437*, 1370–1375.
- Lin, Y.-H. (2020). Crosstalk of lncRNA and Cellular Metabolism and Their Regulatory Mechanism in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 2947.
- Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J.A., and Terek, R. (2004). Hypoxia induces HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J. Orthop. Res.* *22*, 1175–1181.
- Lingel, A., and Izaurralde, E. (2004). RNAi: Finding the elusive endonuclease. *RNA* *10*, 1675–1679.
- Link, M.P., Goorin, A.M., Miser, A.W., Green, A.A., Pratt, C.B., Belasco, J.B., Pritchard, J., Malpas, J.S., Baker, A.R., Kirkpatrick, J.A., et al. (1986). The Effect of Adjuvant Chemotherapy on Relapse-Free Survival in Patients with Osteosarcoma of the Extremity. *N. Engl. J. Med.* *314*, 1600–1606.

- Liu, C., Kelnar, K., Liu, B., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Li, H., Patrawala, L., Yan, H., Jeter, C., Honorio, S., et al. (2011). The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat. Med.* *17*, 211–215.
- Liu, G.-T., Huang, Y.-L., Tzeng, H.-E., Tsai, C.-H., Wang, S.-W., and Tang, C.-H. (2015). CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett.* *357*, 476–487.
- Liu, M., Roth, A., Yu, M., Morris, R., Bersani, F., Rivera, M.N., Lu, J., Shioda, T., Vasudevan, S., Ramaswamy, S., et al. (2013). The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev.* *27*, 2543–2548.
- Liu, Q., Song, Y., Duan, X., Chang, Y., and Guo, J. (2018). MiR-92a Inhibits the Progress of Osteosarcoma Cells and Increases the Cisplatin Sensitivity by Targeting Notch1. *Biomed Res. Int.* *2018*, 1–8.
- Liu, Q., Wang, Z., Zhou, X., Tang, M., Tan, W., Sun, T., and Deng, Y. (2019). miR-342-5p inhibits osteosarcoma cell growth, migration, invasion, and sensitivity to Doxorubicin through targeting Wnt7b. *Cell Cycle* *18*, 3325–3336.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.
- Lohberger, B., Steinecker-Frohnwieser, B., Stuendl, N., Kaltenecker, H., Leithner, A., and Rinner, B. (2016). The Proteasome Inhibitor Bortezomib Affects Chondrosarcoma Cells via the Mitochondria-Caspase Dependent Pathway and Enhances Death Receptor Expression and Autophagy. *PLoS One* *11*, e0168193.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., and O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* *25*, 578–585.
- Longhi, A., Errani, C., De Paolis, M., Mercuri, M., and Bacci, G. (2006). Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat. Rev.* *32*, 423–436.
- Lord, C.J., Tutt, A.N.J., and Ashworth, A. (2015). Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors. *Annu. Rev. Med.* *66*, 455–470.
- Lu, C., Venneti, S., Akalin, A., Fang, F., Ward, P.S., Dematteo, R.G., Intlekofer, A.M., Chen, C., Ye, J., Hameed, M., et al. (2013). Induction of sarcomas by mutant IDH2. *Genes Dev.* *27*, 1986–1998.
- Lu, J., Song, G., Tang, Q., Yin, J., Zou, C., Zhao, Z., Xie, X., Xu, H., Huang, G., Wang, J., et al. (2017). MiR-26a inhibits stem cell-like phenotype and tumor growth of osteosarcoma by targeting Jagged1. *Oncogene* *36*, 231–241.
- Lu, N., Lin, T., Wang, L., Qi, M., Liu, Z., Dong, H., Zhang, X., Zhai, C., Wang, Y., Liu, L., et al. (2015). Association of SOX4 regulated by tumor suppressor miR-30a with poor prognosis in low-grade chondrosarcoma. *Tumor Biol.* *36*, 3843–3852.
- Lu, S., Xiao, P., Xue, L., Che, L., Yang, P., Li, Y., and Qiao, H. (2008). Prevalent expression of MHC class I chain-related molecule A in human osteosarcoma. *Neoplasma* *55*, 266–272.
- Lugowska, I., Teterycz, P., Mikula, M., Kulecka, M., Kluska, A., Balabas, A., Piatkowska, M., Wagrodzki, M., Pienkowski, A., Rutkowski, P., et al. (2018). IDH1/2 Mutations Predict Shorter Survival in Chondrosarcoma. *J. Cancer* *9*, 998–1005.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95–98.
- Lv, C., Hao, Y., and Tu, G. (2016). MicroRNA-21 promotes proliferation, invasion and suppresses apoptosis in human osteosarcoma line MG63 through PTEN/Akt pathway. *Tumor Biol.* *37*, 9333–9342.
- Ma, H., Wu, Y., Choi, J.-G., and Wu, H. (2013). Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20687–20692.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* *429*, 318–322.
- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* *434*, 666–670.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* *449*, 682–688.
- MacDiarmid, J.A., Mugridge, N.B., Weiss, J.C., Phillips, L., Burn, A.L., Paulin, R.P., Haasdyk, J.E., Dickson, K.-A., Brahmabhatt, V.N., Pattison, S.T., et al. (2007). Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics. *Cancer Cell* *11*, 431–445.
- Magee, M.S., and Snook, A.E. (2014). Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer. *Discov. Med.* *18*, 265–271.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasmimir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007a). BH3-Only Proteins and BH3 Mimetics Induce Autophagy by Competitively

- Disrupting the Interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X L. *Autophagy* 3, 374–376.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007b). Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26, 2527–2539.
- Majzner, R.G., Simon, J.S., Grosso, J.F., Martinez, D., Pawel, B.R., Santi, M., Merchant, M.S., Geoerger, B., Hezam, I., Marty, V., et al. (2017). Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues. *Cancer* 123, 3807–3815.
- Mak, I.W.Y., Singh, S., Turcotte, R., and Ghert, M. (2015). The epigenetic regulation of SOX9 by miR-145 in human chondrosarcoma. *J. Cell. Biochem.* 116, 37–44.
- Malmgren, R.A., and Flanigan, C.C. (1955). Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* 15, 473–478.
- Mandel, P., and Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 142, 241–243.
- Mandilaras, V., Vernon, M., Meryet-Figuière, M., Karakasis, K., Lambert, B., Poulain, L., Oza, A., Denoyelle, C., and Lheureux, S. (2017). Updates and current challenges in microRNA research for personalized medicine in ovarian cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 927–943.
- Marth, E., and Möse, J.R. (1987). Oncolysis by *clostridium oncolyticum* M55 and subsequent enzymatic determination of sialic acid in serum. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene, Serie A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten, Parasitologie.* 265, 33–44.
- Martinez-Sanchez, A., Dudek, K.A., and Murphy, C.L. (2012). Regulation of Human Chondrocyte Function through Direct Inhibition of Cartilage Master Regulator SOX9 by MicroRNA-145 (miRNA-145). *J. Biol. Chem.* 287, 916–924.
- Matsunobu, A., Imai, R., Kamada, T., Imaizumi, T., Tsuji, H., Tsujii, H., Shioyama, Y., Honda, H., and Tatezaki, S. (2012). Impact of carbon ion radiotherapy for unresectable osteosarcoma of the trunk. *Cancer* 118, 4555–4563.
- Maximov, V. V., Akkawi, R., Khawaled, S., Salah, Z., Jaber, L., Barhoum, A., Or, O., Galasso, M., Kurek, K.C., Yavin, E., et al. (2019). MiR-16-1-3p and miR-16-2-3p possess strong tumor suppressive and antimetastatic properties in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* 145, 3052–3063.
- Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 177–180.
- McEachron, T.A., Triche, T.J., Sorenson, L., Parham, D.M., and Carpten, J.D. (2018). Profiling targetable immune checkpoints in osteosarcoma. *Oncoimmunology* 7, e1475873.
- McGough, R.L., Lin, C., Meitner, P., Aswad, B.I., and Terek, R.M. (2002). Angiogenic Cytokines in Cartilage Tumors. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 397, 62–69.
- Meazza, C., and Scanagatta, P. (2016). Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 16, 543–556.
- Medley, J.C., Panzade, G., and Zinovyeva, A.Y. (2020). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* e1627.
- Meijer, T.W.H., Kaanders, J.H.A.M., Span, P.N., and Bussink, J. (2012). Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin. Cancer Res.* 18, 5585–5594.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197.
- Melo, S., Villanueva, A., Moutinho, C., Davalos, V., Spizzo, R., Ivan, C., Rossi, S., Setien, F., Casanovas, O., Simo-Riudalbas, L., et al. (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4394–4399.
- Meyers, P.A., Heller, G., and Vlavis, V. (1993). Osteosarcoma of the extremities: chemotherapy experience at Memorial Sloan-Kettering. *Cancer Treat. Res.* 62, 309–322.
- 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. (2008). Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 633–638.
- Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* 115, 1531–1543.
- Miralbell, R., Lomax, A., Cella, L., and Schneider, U. (2002). Potential reduction of the incidence of radiation-induced second cancers by using proton beams in the treatment of pediatric tumors. *Int. J. Radiat. Oncol.* 54, 824–829.
- Mirra, J.M., Gold, R., Downs, J., and Eckardt, J.J. (1985). A new histologic approach to the differentiation of enchondroma and chondrosarcoma

- of the bones. A clinicopathologic analysis of 51 cases. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 214–237.
- Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., and Kulidjian, A.A. (2018). Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J* 4, 12.
- Mittal, V. (2018). Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 13, 395–412.
- Miwa, S., Nishida, H., Tanzawa, Y., Takeuchi, A., Hayashi, K., Yamamoto, N., Mizukoshi, E., Nakamoto, Y., Kaneko, S., and Tsuchiya, H. (2017). Phase 1/2 study of immunotherapy with dendritic cells pulsed with autologous tumor lysate in patients with refractory bone and soft tissue sarcoma. *Cancer* 123, 1576–1584.
- Mohseny, A.B., Machado, I., Cai, Y., Schaefer, K.-L., Serra, M., Hogendoorn, P.C.W., Llombart-Bosch, A., and Cleton-Jansen, A.-M. (2011). Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab. Invest.* 91, 1195–1205.
- Molenaar, R.J., Botman, D., Smits, M.A., Hira, V. V., van Lith, S.A., Stap, J., Henneman, P., Khurshed, M., Lenting, K., Mul, A.N., et al. (2015). Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198. *Cancer Res.* 75, 4790–4802.
- Monga, V., Mani, H., Hirbe, A., and Milhem, M. (2020). Non-Conventional Treatments for Conventional Chondrosarcoma. *Cancers (Basel)*. 12.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 16, 495–505.
- Morales, A., Eidinger, D., and Bruce, A.W. (2002). Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 167, 891–894.
- Mori, K., Ando, K., and Heymann, D. (2008). Liposomal muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine: a safe and effective agent against osteosarcoma pulmonary metastases. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8, 151–159.
- Morii, T., Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Mochizuki, K., Yohiyama, A., Aoyagi, T., Hornicek, F.J., and Ichimura, S. (2014). BH3 Mimetics Inhibit Growth of Chondrosarcoma – A Novel Targeted-therapy for Candidate Models. *Anticancer Res.* 34, 6423–6430.
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 902–909.
- Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 637–646.
- Mossé, Y.P., Fox, E., Teachey, D.T., Reid, J.M., Safgren, S.L., Carol, H., Lock, R.B., Houghton, P.J., Smith, M.A., Hall, D., et al. (2019). A Phase II Study of Alisertib in Children with Recurrent/Refractory Solid Tumors or Leukemia: Children’s Oncology Group Phase I and Pilot Consortium (ADVL0921). *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 3229–3238.
- Mott, J.L., Kurita, S., Cazanave, S.C., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., and Fernandez-Zapico, M.E. (2010). Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J. Cell. Biochem.* 110, 1155–1164.
- Moussavi-Harami, F., Mollano, A., Martin, J.A., Ayoob, A., Domann, F.E., Gitelis, S., and Buckwalter, J.A. (2006). Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 379–385.
- Mulligan, M.E. (2019). How to Diagnose Enchondroma, Bone Infarct, and Chondrosarcoma. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 48, 262–273.
- Munzenrider, J.E., and Liebsch, N.J. (1999). Proton therapy for tumors of the skull base. *Strahlenther. Onkol.* 175 Suppl, 57–63.
- Murakami, T., Igarashi, K., Kawaguchi, K., Kiyuna, T., Zhang, Y., Zhao, M., Hiroshima, Y., Nelson, S.D., Dry, S.M., Li, Y., et al. (2017). Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R regresses an osteosarcoma in a patient-derived xenograft model resistant to a molecular-targeting drug. *Oncotarget* 8, 8035–8042.
- Murata, S., Zhang, C., Finch, N., Zhang, K., Campo, L., and Breuer, E.-K. (2016). Predictors and Modulators of Synthetic Lethality: An Update on PARP Inhibitors and Personalized Medicine. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–12.
- Murphey, M.D., Robbin, M.R., McRae, G.A., Flemming, D.J., Temple, H.T., and Kransdorf, M.J. (1997). The many faces of osteosarcoma. *RadioGraphics* 17, 1205–1231.
- Murphey, M.D., Walker, E.A., Wilson, A.J., Kransdorf, M.J., Temple, H.T., and Gannon, F.H. (2003). From the archives of the AFIP: imaging of primary chondrosarcoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 23, 1245–1278.
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., and Azab, A.K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)* 3, 83–92.
- Nagao, H., Ijiri, K., Hirotsu, M., Ishidou, Y., Yamamoto, T., Nagano, S., Takizawa, T., Nakashima, K., Komiya, S., and Setoguchi, T.

- (2011). Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. *J. Pathol.* *224*, 169–179.
- Nair, J.K., Willoughby, J.L.S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M.R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A. V., Milstein, S., et al. (2014). Multivalent N -Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 16958–16961.
- Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C.M. (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 10980–10985.
- Nakano, H., Miyazawa, T., Kinoshita, K., Yamada, Y., and Yoshida, T. (2010). Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* *127*, 1072–1080.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* *2*, 279–289.
- Nardin, A., Lefebvre, M., Labroquere, K., Faure, O., and Abastado, J. (2006). Liposomal Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine: Targeting and Activating Macrophages for Adjuvant Treatment of Osteosarcoma. *Curr. Cancer Drug Targets* *6*, 123–133.
- 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. (2017). A phase II trial evaluating the feasibility of adding bevacizumab to standard osteosarcoma therapy. *Int. J. Cancer* *141*, 1469–1477.
- Nehme, G., and Gordon, N. (2020). Autophagy in Osteosarcoma. pp. 167–175.
- Nelson, P.T., Baldwin, D.A., Kloosterman, W.P., Kauppinen, S., Plasterk, R.H.A., and Mourelatos, Z. (2006). RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA* *12*, 187–191.
- Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* *161*, 1374–1387.
- Nguyen, V.H., Kim, H.-S., Ha, J.-M., Hong, Y., Choy, H.E., and Min, J.-J. (2010). Genetically Engineered Salmonella typhimurium as an Imageable Therapeutic Probe for Cancer. *Cancer Res.* *70*, 18–23.
- Nieth, C., Priebisch, A., Stege, A., and Lage, H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* *545*, 144–150.
- Nota, S.P.F.T., Braun, Y., Schwab, J.H., van Dijk, C.N., and Bramer, J.A.M. (2015). The Identification of Prognostic Factors and Survival Statistics of Conventional Central Chondrosarcoma. *Sarcoma* *2015*, 623746.
- Novello, C., Pazzaglia, L., Cingolani, C., Conti, A., Quattrini, I., Manara, M.C., Tognon, M., Picci, P., and Benassi, M.S. (2013). miRNA expression profile in human osteosarcoma: Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control. *Int. J. Oncol.* *42*, 667–675.
- Nugent, M. (2015). microRNA and Bone Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 201–230.
- Nuyts, S., Theys, J., Landuyt, W., van Mellaert, L., Lambin, P., and Anné, J. (2001). Increasing specificity of anti-tumor therapy: cytotoxic protein delivery by non-pathogenic clostridia under regulation of radio-induced promoters. *Anticancer Res.* *21*, 857–861.
- O'Neal, L.W., and Ackerman, L. V. (1952). Chondrosarcoma of bone. *Cancer* *5*, 511–519.
- O'Neil, N.J., Bailey, M.L., and Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 613–623.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* *18*, 1655–1666.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 354–363.
- Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* *222*, 540–545.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Dev. Biol.* *216*, 671–680.
- Onishi, A.C., Hincker, A.M., and Lee, F.Y. (2011). Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* *2011*, 381564.
- Ooi, C.H., Oh, H.K., Wang, H.Z., Tan, A.L.K., Wu, J., Lee, M., Rha, S.Y., Chung, H.C., Virshup, D.M., and Tan, P. (2011). A Densely Interconnected Genome-Wide Network of MicroRNAs and Oncogenic Pathways Revealed Using Gene Expression Signatures. *PLoS Genet.* *7*, e1002415.
- van Oosterwijk, J.G., Herpers, B., Meijer, D., Briaire-de Bruijn, I.H., Cleton-Jansen, A.M., Gelderblom,

- H., van de Water, B., and Bovée, J.V.M.G. (2012). Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 1617–1626.
- van Oosterwijk, J.G., Plass, J.R.M., Meijer, D., Que, I., Karperien, M., and Bovée, J.V.M.G. (2015). An orthotopic mouse model for chondrosarcoma of bone provides an in vivo tool for drug testing. *Virchows Arch.* *466*, 101–109.
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* *30*, 460–471.
- Ottaviani, G., and Jaffe, N. (2009a). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* *152*, 3–13.
- Ottaviani, G., and Jaffe, N. (2009b). The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* *152*, 15–32.
- Ouyang, Z., Wang, S., Zeng, M., Li, Z., Zhang, Q., Wang, W., and Liu, T. (2019). Therapeutic effect of palbociclib in chondrosarcoma: implication of cyclin-dependent kinase 4 as a potential target. *Cell Commun. Signal.* *17*, 17.
- Palmi, G., Marini, F., and Brandi, M.L. (2017). What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma? *Molecules* *22*.
- Pansuriya, T.C., van Eijk, R., D'Adamo, P., van Ruler, M.A.J.H., Kuijjer, M.L., Oosting, J., Cleton-Jansen, A.-M., van Oosterwijk, J.G., Verbeke, S.L.J., Meijer, D., et al. (2011). Somatic mosaic IDH1 and IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 1256–1261.
- Paolicchi, E., Gemignani, F., Krstic-Demonacos, M., Dedhar, S., Mutti, L., and Landi, S. (2016). Targeting hypoxic response for cancer therapy. *Oncotarget* *7*, 13464–13478.
- Paoluzzi, L., Cacavio, A., Ghesani, M., Karambelkar, A., Rapkiewicz, A., Weber, J., and Rosen, G. (2016). Response to anti-PD1 therapy with nivolumab in metastatic sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* *6*, 24.
- Papaioannou, G., Mirzamohammadi, F., Lisse, T.S., Nishimori, S., Wein, M.N., and Kobayashi, T. (2015). MicroRNA-140 Provides Robustness to the Regulation of Hypertrophic Chondrocyte Differentiation by the PTHrP-HDAC4 Pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *30*, 1044–1052.
- Parafioriti, A., Cifola, I., Gissi, C., Pinatel, E., Vilardo, L., Armiraglio, E., Di Bernardo, A., Daolio, P.A., Felsani, A., D'Agnano, I., et al. (2020). Expression profiling of microRNAs and isomiRs in conventional central chondrosarcoma. *Cell Death Discov.* *6*, 46.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663–666.
- Parsch, D., Brassat, U., Brümmendorf, T.H., and Fellenberg, J. (2008). Consequences of telomerase inhibition by BIBR1532 on proliferation and chemosensitivity of chondrosarcoma cell lines. *Cancer Invest.* *26*, 590–596.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 271–282.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.
- Patiño-García, A., Zalacaín, M., Marrodán, L., San-Julián, M., and Sierrasesúmaga, L. (2009). Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J. Pediatr.* *154*, 688–693.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D.P., Prakash, A., Medhi, B., and Das, B. (2010). Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.* *17*, 21.
- Pawelek, J.M., Low, K.B., and Bermudes, D. (2003). Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol.* *4*, 548–556.
- Peng, S., Gao, D., Gao, C., Wei, P., Niu, M., and Shuai, C. (2016). MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). *Mol. Med. Rep.* *14*, 623–629.
- Pereira, P., Pedro, A.Q., Tomás, J., Maia, C.J., Queiroz, J.A., Figueiras, A., and Sousa, F. (2016). Advances in time course extracellular production of human pre-miR-29b from *Rhodovulum sulfidophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *100*, 3723–3734.
- Pignochino, Y., Capozzi, F., D'Ambrosio, L., Dell'Aglio, C., Basiricò, M., Canta, M., Lorenzato, A., Vignolo Lutati, F., Aliberti, S., Palesandro, E., et al. (2017). PARP1 expression drives the synergistic antitumor activity of trabectedin and PARP1 inhibitors in sarcoma preclinical models. *Mol. Cancer* *16*, 86.

- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., and Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 1608–1613.
- de Planell-Saguer, M., and Rodicio, M.C. (2013). Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin. Biochem.* 46, 869–878.
- Pommier, P., Sunyach, M.-P., Hu, Y., Amsalem, E., Claude, L., Moncort-Boulch, D., Toutenu, P., and Balosso, J. (2010). [Radiotherapy for sarcoma: hadrontherapy, for whom and what for?]. *Bull. Cancer* 97, 657–672.
- Pu, F., Chen, F., and Shao, Z. (2016). MicroRNAs as biomarkers in the diagnosis and treatment of chondrosarcoma. *Tumour Biol.* 37, 15433–15436.
- Pu, M., Chen, J., Tao, Z., Miao, L., Qi, X., Wang, Y., and Ren, J. (2019). Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 441–451.
- Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 9, 677–684.
- Punzalan, M., and Hyden, G. (2009). The role of physical therapy and occupational therapy in the rehabilitation of pediatric and adolescent patients with osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* 152, 367–384.
- Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., Truttmann, A.C., and Clarke, P.G.H. (2009). The two faces of autophagy in the nervous system. *Med. Sci. (Paris)*. 25, 383–390.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123–127.
- Ratti, C., Botti, L., Cancila, V., Galvan, S., Torselli, I., Garofalo, C., Manara, M.C., Bongiovanni, L., Valenti, C.F., Burocchi, A., et al. (2017). Trabectedin Overrides Osteosarcoma Differentiative Block and Reprograms the Tumor Immune Environment Enabling Effective Combination with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 5149–5161.
- Razungles, J., Cavallès, V., Jalaguier, S., and Teyssier, C. (2013). L'effet Warburg. *Médecine/sciences* 29, 1026–1033.
- Reed, M.W., Mullins, A.P., Anderson, G.L., Miller, F.N., and Wieman, T.J. (1989). The effect of photodynamic therapy on tumor oxygenation. *Surgery* 106, 94–99.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.
- Reshetnyak, Y.K., Andreev, O.A., Lehnert, U., and Engelman, D.M. (2006). Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6460–6465.
- Reumann, S., Shogren, K.L., Yaszemski, M.J., and Maran, A. (2016). Inhibition of Autophagy Increases 2-Methoxyestradiol-Induced Cytotoxicity in SW1353 Chondrosarcoma Cells. *J. Cell. Biochem.* 117, 751–759.
- Reuter, U.R.M., Oettmeier, R., and Hobohm, U. (2018). Safety of Therapeutic Fever Induction in Cancer Patients Using Approved PAMP Drugs. *Transl. Oncol.* 11, 330–337.
- Ritchie, W., Rajasekhar, M., Flamant, S., and Rasko, J.E.J. (2009). Conserved Expression Patterns Predict microRNA Targets. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000513.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 35, 5944–5953.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Stutz, F. (2004). Nuclear export of RNA. *Biol. Cell* 96, 639–655.
- van Rooij, E., and Kauppinen, S. (2014). Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* 6, 851–864.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248.
- Van Roosbroeck, K., and Calin, G.A. (2017). Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. pp. 119–149.
- Rosemberg, B., Van Camp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205, 698–699.
- Rosenberg, S.A., Mulé, J.J., Spiess, P.J., Reichert, C.M., and Schwarz, S.L. (1985). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.* 161, 1169–1188.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909–915.

- Rouschop, K.M.A., Ramaekers, C.H.M.A., Schaaf, M.B.E., Keulers, T.G.H., Savelkoul, K.G.M., Lambin, P., Koritzinsky, M., and Wouters, B.G. (2009). Autophagy is required during cycling hypoxia to lower production of reactive oxygen species. *Radiother. Oncol.* *92*, 411–416.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.
- Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 203–222.
- Ryan, R.M., Green, J., and Lewis, C.E. (2006). Use of bacteria in anti-cancer therapies. *Bioessays* *28*, 84–94.
- Ryan, R.M., Green, J., Williams, P.J., Tazzyman, S., Hunt, S., Harme, J.H., Kehoe, S.C., and Lewis, C.E. (2009). Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene Ther.* *16*, 329–339.
- Saif, M.W., and Chu, E. (2010). Biology of Colorectal Cancer. *Cancer J.* *16*, 196–201.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., and Jones, P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* *9*, 435–443.
- Sakimura, R., Tanaka, K., Yamamoto, S., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T., Nakamura, T., Li, Y., and Iwamoto, Y. (2007). The effects of histone deacetylase inhibitors on the induction of differentiation in chondrosarcoma cells. *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 275–282.
- Samuel, A.M., Costa, J., and Lindskog, D.M. (2014). Genetic alterations in chondrosarcomas - keys to targeted therapies? *Cell. Oncol. (Dordr.)* *37*, 95–105.
- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* *44*, 955–972.
- Schmiedel, J.M., Klemm, S.L., Zheng, Y., Sahay, A., Blüthgen, N., Marks, D.S., and van Oudenaarden, A. (2015). MicroRNA control of protein expression noise. *Science (80-. )*. *348*, 128–132.
- Schmittgen, T.D. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res.* *32*, 43e–43.
- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S., and Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* *44*, 31–38.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* *331*, 1565–1570.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Schwinger, W., Klass, V., Benesch, M., Lackner, H., Dornbusch, H.J., Sovinz, P., Moser, A., Schwantzer, G., and Urban, C. (2005). Feasibility of high-dose interleukin-2 in heavily pretreated pediatric cancer patients. *Ann. Oncol.* *16*, 1199–1206.
- Scully, S.P., Ghert, M.A., Zurakowski, D., Thompson, R.C., and Gebhardt, M.C. (2002). Pathologic fracture in osteosarcoma: prognostic importance and treatment implications. *J. Bone Joint Surg. Am.* *84*, 49–57.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* *455*, 58–63.
- Semenza, G.L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* *8*, S62-7.
- Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* *118*, 3835–3837.
- Sermeus, A., Genin, M., Maincent, A., Fransolet, M., Notte, A., Leclere, L., Riquier, H., Arnould, T., and Michiels, C. (2012). Hypoxia-Induced Modulation of Apoptosis and BCL-2 Family Proteins in Different Cancer Cell Types. *PLoS One* *7*, e47519.
- Serra, M., and Hattinger, C.M. (2017). The pharmacogenomics of osteosarcoma. *Pharmacogenomics J.* *17*, 11–20.
- Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condrón, C.M., and Toomey, D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* *29*, 297–307.
- Sharma, S.B., Lin, C.-C., Farrugia, M.K., McLaughlin, S.L., Ellis, E.J., Brundage, K.M., Salkeni, M.A., and Ruppert, J.M. (2014). MicroRNAs 206 and 21 Cooperate To Promote RAS-Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling by Suppressing the Translation of RASA1 and SPRED1. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 4143–4164.
- Shelby, S.J., Angadi, P.S., Zheng, Q.-D., Yao, J., Jia, L., and Zacks, D.N. (2015). Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  contributes to regulation of autophagy in retinal detachment. *Exp. Eye Res.* *137*, 84–93.
- Shen, D.-W., Pouliot, L.M., Hall, M.D., and Gottesman, M.M. (2012). Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from

- multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol. Rev.* *64*, 706–721.
- Shen, S., Huang, K., Wu, Y., Ma, Y., Wang, J., Qin, F., and Ma, J. (2017). A miR-135b-TAZ positive feedback loop promotes epithelial–mesenchymal transition (EMT) and tumorigenesis in osteosarcoma. *Cancer Lett.* *407*, 32–44.
- Shintani, Y., Sawada, Y., Inagaki, T., Kohjimoto, Y., Uekado, Y., and Shinka, T. (2007). Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette–Guérin for superficial bladder cancer: Study of the mechanism of bacillus Calmette–Guérin immunotherapy. *Int. J. Urol.* *14*, 140–146.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* *22*, 7265–7279.
- Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.-C., Palermino, J.-M., Shyu, A.-B., and Gehring, K. (2007). Poly(A) Nuclease Interacts with the C-terminal Domain of Polyadenylate-binding Protein Domain from Poly(A)-binding Protein. *J. Biol. Chem.* *282*, 25067–25075.
- Simon, M.-P., Tournaire, R., and Pouyssegur, J. (2008). The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J. Cell. Physiol.* *217*, 809–818.
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G.I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., et al. (2009). Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene* *28*, 4065–4074.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* (80-). *305*, 1434–1437.
- Soriano, A., Masanas, M., Boloix, A., Masiá, N., París-Coderch, L., Piskareva, O., Jiménez, C., Henrich, K.-O., Roma, J., Westermann, F., et al. (2019). Functional high-throughput screening reveals miR-323a-5p and miR-342-5p as new tumor-suppressive microRNA for neuroblastoma. *Cell. Mol. Life Sci.* *76*, 2231–2243.
- Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y.A., Hao, Z.M., and Chang, E.H. (1993). Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res.* *53*, 4452–4455.
- Stege, A., Priesch, A., Nieth, C., and Lage, H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* *11*, 699–706.
- Stetler-Stevenson, W.G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* *10*, 383–92, x.
- Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y.-T., Scanlan, M.J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., and Old, L.J. (1998). A Survey of the Humoral Immune Response of Cancer Patients to a Panel of Human Tumor Antigens. *J. Exp. Med.* *187*, 1349–1354.
- Su, W.T., Chewning, J., Abramson, S., Rosen, N., Gholizadeh, M., Healey, J., Meyers, P., and La Quaglia, M.P. (2004). Surgical management and outcome of osteosarcoma patients with unilateral pulmonary metastases. *J. Pediatr. Surg.* *39*, 418–23–23.
- Subramanian, S., Bates, S.E., Wright, J.J., Espinoza-Delgado, I., and Piekarz, R.L. (2010). Clinical Toxicities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Pharmaceuticals (Basel)*. *3*, 2751–2767.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H., and Bartel, D.P. (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* *508*, 66–71.
- Sugatani, T., and Hruska, K.A. (2007). MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* *101*, 996–999.
- Sugita, H., Osaka, S., Toriyama, M., Osaka, E., Yoshida, Y., Ryu, J., Sano, M., Sugitani, M., and Nemoto, N. (2004). Correlation between the histological grade of chondrosarcoma and the expression of MMPs, ADAMTSs and TIMPs. *Anticancer Res.* *24*, 4079–4084.
- Sullivan, R., and Graham, C.H. (2007). Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev.* *26*, 319–331.
- Sun, F., Wan, M., Xu, X., Gao, B., Zhou, Y., Sun, J., Cheng, L., Klein, O.D., Zhou, X., and Zheng, L. (2014a). Crosstalk between miR-34a and Notch Signaling Promotes Differentiation in Apical Papilla Stem Cells (SCAPs). *J. Dent. Res.* *93*, 589–595.
- Sun, G., Ding, X., Bi, N., Wang, Z., Wu, L., Zhou, W., Zhao, Z., Wang, J., Zhang, W., Fan, J., et al. (2019). Molecular predictors of brain metastasis-related microRNAs in lung adenocarcinoma. *PLoS Genet.* *15*, e1007888.
- Sun, X., Geng, X., Zhang, J., and Zhang, C. (2015). miRNA-646 suppresses osteosarcoma cell metastasis by downregulating fibroblast growth factor 2 (FGF2). *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 2127–2134.
- Sun, Y., Guo, W., Ren, T., Liang, W., Zhou, W., Lu, Q., Jiao, G., and Yan, T. (2014b). Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis.* *5*, e979.

- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529–533.
- Svobodova, E., Kubikova, J., and Svoboda, P. (2016). Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *468*, 1089–1102.
- Sznol, M., Lin, S.L., Bermudes, D., Zheng, L., and King, I. (2000). Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J. Clin. Invest.* *105*, 1027–1030.
- Takahashi, R., Ishibashi, Y., Hiraoka, K., Matsueda, S., Kawano, K., Kawahara, A., Kage, M., Ohshima, K., Yamanaka, R., Shichijo, S., et al. (2013). Phase II study of personalized peptide vaccination for refractory bone and soft tissue sarcoma patients. *Cancer Sci.* *104*, 1285–1294.
- Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I., and Kunkel, H.G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* *45*, 1732–1740.
- Taniguchi, S., Fujimori, M., Sasaki, T., Tsutsui, H., Shimatani, Y., Seki, K., and Amano, J. (2010). Targeting solid tumors with non-pathogenic obligate anaerobic bacteria. *Cancer Sci.* *101*, 1925–1932.
- Tap, W.D., Villalobos, V.M., Cote, G.M., Burris, H., Janku, F., Mir, O., Beeram, M., Wagner, A.J., Jiang, L., Wu, B., et al. (2020). Phase I Study of the Mutant IDH1 Inhibitor Ivosidenib: Safety and Clinical Activity in Patients With Advanced Chondrosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *38*, 1693–1701.
- Tarpey, P.S., Behjati, S., Cooke, S.L., Van Loo, P., Wedge, D.C., Pillay, N., Marshall, J., O’Meara, S., Davies, H., Nik-Zainal, S., et al. (2013). Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat. Genet.* *45*, 923–926.
- Tawbi, H.A., Burgess, M., Bolejack, V., Van Tine, B.A., Schuetze, S.M., Hu, J., D’Angelo, S., Attia, S., Riedel, R.F., Pribat, D.A., et al. (2017). Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *18*, 1493–1501.
- Taylor, K., Howard, C.B., Jones, M.L., Sedliarou, I., MacDiarmid, J., Brahmabhatt, H., Munro, T.P., and Mahler, S.M. (2015). Nanocell targeting using engineered bispecific antibodies. *MAbs* *7*, 53–65.
- Thanindrarn, P., Dean, D.C., Nelson, S.D., Hornicek, F.J., and Duan, Z. (2019). Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J. Bone Oncol.* *15*, 100221.
- Thariat, J., Habrand, J.L., Lesueur, P., Chaikh, A., Kammerer, E., Lecomte, D., Batalla, A., Balosso, J., and Tessonier, T. (2018). [Why proton therapy? And how?]. *Bull. Cancer* *105*, 315–326.
- Theriault, R.L., and Theriault, R.L. (2012). Biology of Bone Metastases. *Cancer Control* *19*, 92–101.
- Thieulent, C., Hue, E.S., Sutton, G., Fortier, C., Dallemagne, P., Zientara, S., Munier-Lehmann, H., Hans, A., Paillot, R., Vidalain, P.-O., et al. (2020). Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination. *Antiviral Res.* *183*, 104931.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 346–358.
- Thomson, J.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* *20*, 2202–2207.
- Tiet, T.D., Hopyan, S., Nadesan, P., Gokgoz, N., Poon, R., Lin, A.C., Yan, T., Andrulis, I.L., Alman, B.A., and Wunder, J.S. (2006). Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation. *Am. J. Pathol.* *168*, 321–330.
- Tokuhisa, M., Ichikawa, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kosaka, T., Makino, H., Akiyama, H., Kunisaki, C., et al. (2015). Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS One* *10*, e0130472.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* *366*, 2443–2454.
- Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P., and Macleod, K.F. (2007). BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy. *Mol. Cell Biol.* *27*, 6229–6242.
- Trang, P., Wiggins, J.F., Daige, C.L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., Weidhaas, J.B., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2011). Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. *Mol. Ther.* *19*, 1116–1122.
- Treiber, T., Treiber, N., and Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 5–20.
- Tsai, C.-H., Tsai, H.-C., Huang, H.-N., Hung, C.-H., Hsu, C.-J., Fong, Y.-C., Hsu, H.-C., Huang, Y.-L., and Tang, C.-H. (2015). Resistin promotes tumor metastasis by down-regulation of miR-519d through the AMPK/p38 signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget* *6*.
- Tsou, H.-K., Chen, H.-T., Hung, Y.-H., Chang, C.-H.,

- Li, T.-M., Fong, Y.-C., and Tang, C.-H. (2013). HGF and c-Met interaction promotes migration in human chondrosarcoma cells. *PLoS One* 8, e53974.
- Tsukahara, T., Emori, M., Murata, K., Mizushima, E., Shibayama, Y., Kubo, T., Kanaseki, T., Hirohashi, Y., Yamashita, T., Sato, N., et al. (2016). The future of immunotherapy for sarcoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 16, 1049–1057.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233.
- Turchinovich, A., Weiz, L., and Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem. Sci.* 37, 460–465.
- Uehara, T., Fujiwara, T., Takeda, K., Kunisada, T., Ozaki, T., and Udono, H. (2015). Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–11.
- Urdinez, J., Boro, A., Mazumdar, A., Arlt, M.J., Muff, R., Botter, S.M., Bode-Lesniewska, B., Fuchs, B., Snedeker, J.G., and Gvozdenovic, A. (2020). The miR-143/145 Cluster, a Novel Diagnostic Biomarker in Chondrosarcoma, Acts as a Tumor Suppressor and Directly Inhibits Fascin-1. *J. Bone Miner. Res.* 35, 1077–1091.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* (80-. ). 318, 1931–1934.
- Venneker, S., Kruisselbrink, A.B., Briaire-de Bruijn, I.H., de Jong, Y., van Wijnen, A.J., Danen, E.H.J., and Bovée, J.V.M.G. (2019). Inhibition of PARP Sensitizes Chondrosarcoma Cell Lines to Chemo- and Radiotherapy Irrespective of the IDH1 or IDH2 Mutation Status. *Cancers (Basel)*. 11.
- Vernon, M., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Brotin, E., Weiswald, L.-B., Paysant, H., Vigneron, N., Wambecke, A., Abeilard, E., Giffard, F., et al. (2020). Functional miRNA Screening Identifies Wide-ranging Antitumor Properties of miR-3622b-5p and Reveals a New Therapeutic Combination Strategy in Ovarian Tumor Organoids. *Mol. Cancer Ther.* 19, 1506–1519.
- Versleijen-Jonkers, Y.M.H., Vletterie, M., van de Luitgaarden, A.C.M., and van der Graaf, W.T.A. (2014). Anti-angiogenic therapy, a new player in the field of sarcoma treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 91, 172–185.
- Vester, B., and Wengel, J. (2004). LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA †. *Biochemistry* 43, 13233–13241.
- Visone, R., and Croce, C.M. (2009). MiRNAs and Cancer. *Am. J. Pathol.* 174, 1131–1138.
- Wadhwa, N. (2014). Osteosarcoma: Diagnostic dilemmas in histopathology and prognostic factors. *Indian J. Orthop.* 48, 247–254.
- Wagner, M.J., Ricciotti, R.W., Mantilla, J., Loggers, E.T., Pollack, S.M., and Cranmer, L.D. (2018). Response to PD1 inhibition in conventional chondrosarcoma. *J. Immunother. Cancer* 6, 94.
- Wahle, E., and Winkler, G.S. (2013). RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829, 561–570.
- Wallenius, V., Hisaoka, M., Helou, K., Levan, G., Mandahl, N., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., and Jansson, J.O. (2000). Overexpression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor (Met) and presence of a truncated and activated intracellular HGF receptor fragment in locally aggressive/malignant human musculoskeletal tumors. *Am. J. Pathol.* 156, 821–829.
- Waltz, D.A., and Chapman, H.A. (1994). Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J. Biol. Chem.* 269, 14746–14750.
- Wang D, Qian G, Wang J, Wang T, Zhang L, Yang P, Lin F. Visfatin is involved in the cisplatin resistance of osteosarcoma cells via upregulation of Snail and Zeb1. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(7):999-1006.
- Wang, Z. (2011). *The Principles of MiRNA-Masking Antisense Oligonucleotides Technology*. pp. 43–49.
- Wang, C.-Y., Ren, J.-B., Liu, M., and Yu, L. (2016a). Targeting miR-29 induces apoptosis of osteosarcoma MG-63 cells via regulation of TGF-β1/PUMA signal. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 3552–3560.
- Wang, D.-Y., Wu, Y.-N., Huang, J.-Q., Wang, W., Xu, M., Jia, J.-P., Han, G., Mao, B.-B., and Bi, W.-Z. (2016b). Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance. *Chin. J. Cancer* 35, 47.
- Wang, W.-P., Ho, P.Y., Chen, Q.-X., Addepalli, B., Limbach, P.A., Li, M.-M., Wu, W.-J., Jilek, J.L., Qiu, J.-X., Zhang, H.-J., et al. (2015). Bioengineering Novel Chimeric microRNA-34a for Prodrug Cancer Therapy: High-Yield Expression and Purification, and Structural and Functional Characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 131–141.

- Wang, Y., Li, C.-F., Sun, L.-B., and Li, Y.-C. (2020). microRNA-4270-5p inhibits cancer cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting SATB2. *Hum. Cell* 33, 1155–1164.
- Wang, Z.-X., Yang, J.-S., Pan, X., Wang, J.-R., Li, J., Yin, Y.-M., and De, W. (2010). Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone* 47, 445–454.
- Weber, J. (2007). Review: Anti-CTLA-4 Antibody Ipilimumab: Case Studies of Clinical Response and Immune-Related Adverse Events. *Oncologist* 12, 864–872.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., and Lyko, F. (2007). Methylation of Human MicroRNA Genes in Normal and Neoplastic Cells. *Cell Cycle* 6, 1001–1005.
- Weber, D.C., Malyapa, R., Albertini, F., Bolsi, A., Klibsch, U., Walsler, M., Pica, A., Combesure, C., Lomax, A.J., and Schneider, R. (2016). Long term outcomes of patients with skull-base low-grade chondrosarcoma and chordoma patients treated with pencil beam scanning proton therapy. *Radiother. Oncol.* 120, 169–174.
- Wei, M.Q., Mengesha, A., Good, D., and Anné, J. (2008). Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett.* 259, 16–27.
- Wei, R., Cao, G., Deng, Z., Su, J., and Cai, L. (2016). miR-140-5p attenuates chemotherapeutic drug-induced cell death by regulating autophagy through inositol 1,4,5-trisphosphate kinase 2 (IP3k2) in human osteosarcoma cells. *Biosci. Rep.* 36, 440–448.
- Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D.I., Bodary, S.C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., and Chapman, H.A. (1996). Regulation of Integrin Function by the Urokinase Receptor. *Science* (80-. ). 273, 1551–1555.
- Weiler, J., Hunziker, J., and Hall, J. (2006). Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther.* 13, 496–502.
- West, W.H., Tauer, K.W., Yannelli, J.R., Marshall, G.D., Orr, D.W., Thurman, G.B., and Oldham, R.K. (1987). Constant-Infusion Recombinant Interleukin-2 in Adoptive Immunotherapy of Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 316, 898–905.
- Whelan, J.S., and Davis, L.E. (2018). Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Chordoma. *J. Clin. Oncol.* 36, 188–193.
- Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacol. Ther.* 64, 529–564.
- Wigerup, C., Pählman, S., and Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* 164, 152–169.
- Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., and Bader, A.G. (2010). Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34. *Cancer Res.* 70, 5923–5930.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Witkos, T.M., Koscianska, E., and J. Krzyzosiak, W. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* 11, 93–109.
- Wittmann, J., and Jäck, H.-M. (2010). Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1806, 200–207.
- Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 122–133.
- Wu, D., and Rastinejad, F. (2017). Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 43, 1–9.
- Wu, X., Cai, Z., Lou, L., and Zhu, Y. (2012). Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol.* 36, 212–216.
- Wyman, J.J., Hornstein, A.M., Meitner, P.A., Mak, S., Verdier, P., Block, J.A., Pan, J., and Terek, R.M. (1999). Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance. *J. Orthop. Res.* 17, 935–940.
- Xian, L., Wu, X., Pang, L., Lou, M., Rosen, C.J., Qiu, T., Crane, J., Frassica, F., Zhang, L., Rodriguez, J.P., et al. (2012). Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* 18, 1095–1101.
- Xiang, S., Fruehauf, J., and Li, C.J. (2006). Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat. Biotechnol.* 24, 697–702.
- Xiang, W., Jiang, T., Guo, F., Gong, C., Yang, K., Wu, Y., Huang, X., Cheng, W., and Xu, K. (2014). Hedgehog pathway inhibitor-4 suppresses malignant properties of chondrosarcoma cells by disturbing tumor ciliogenesis. *Oncol. Rep.* 32, 1622–1630.

- Xu, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, G., Ding, Y., and Zhao, L. (2014). Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *J. Transl. Med.* *12*, 244.
- Yamamoto, M., and Curiel, D.T. (2005). Cancer Gene Therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* *4*, 315–330.
- Yan, H., Zhang, B., Fang, C., and Chen, L. (2018). miR-340 alleviates chemoresistance of osteosarcoma cells by targeting ZEB1. *Anticancer. Drugs* *29*, 440–448.
- Yang, H., Li, Q., Niu, J., Li, B., Jiang, D., Wan, Z., Yang, Q., Jiang, F., Wei, P., and Bai, S. (2016). microRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget* *7*, 2709–2720.
- Yang, N., Zhu, X., Chen, L., Li, S., and Ren, D. (2008). Oral administration of attenuated *S. typhimurium* carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. *Cancer Biol. Ther.* *7*, 145–151.
- Yang, N., Wang, G., Hu, C., Shi, Y., Liao, L., Shi, S., Cai, Y., Cheng, S., Wang, X., Liu, Y., et al. (2013). Tumor necrosis factor  $\alpha$  suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* *28*, 559–573.
- Yang, X., Zhu, G., Yang, Z., Zeng, K., Liu, F., and Sun, J. (2018). Expression of PD-L1/PD-L2 is associated with high proliferation index of Ki-67 but not with TP53 overexpression in chondrosarcoma. *Int. J. Biol. Markers* *33*, 507–513.
- Yang, X.-Z., Dou, S., Sun, T.-M., Mao, C.-Q., Wang, H.-X., and Wang, J. (2011). Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy. *J. Control. Release* *156*, 203–211.
- Yang, Z., Zhang, M., Xu, K., Liu, L., Hou, W.-K., Cai, Y.-Z., Xu, P., and Yao, J.-F. (2014). Knockdown of YAP1 inhibits the proliferation of osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* *32*, 1265–1272.
- Yang, Z., Wa, Q.-D., Lu, C., Pan, W., Lu, Z.-M., and Ao, J. (2017). miR-328-3p enhances the radiosensitivity of osteosarcoma and regulates apoptosis and cell viability via H2AX. *Oncol. Rep.*
- Yebra, M., Parry, G.C.N., Strömlblad, S., Mackman, N., Rosenberg, S., Mueller, B.M., and Cheresh, D.A. (1996). Requirement of Receptor-bound Urokinase-type Plasminogen Activator for Integrin  $\alpha\beta 5$ -directed Cell Migration. *J. Biol. Chem.* *271*, 29393–29399.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yin, S.J., Wang, W.J., and Zhang, J.Y. (2015). Expression of B7-H3 in cancer tissue during osteosarcoma progression in nude mice. *Genet. Mol. Res.* *14*, 14253–14261.
- Yin, Z., Ding, H., He, E., Chen, J., and Li, M. (2017). Up-regulation of microRNA-491-5p suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP4 in human osteosarcoma. *Cell Prolif.* *50*, e12308.
- Yoon, W.S., Lee, S.S., Chae, Y.S., and Park, Y.K. (2011). Therapeutic effects of recombinant *Salmonella typhimurium* harboring CCL22 miRNA on atopic dermatitis-like skin in mice. *Exp. Mol. Med.* *43*, 63.
- Yoon, W.S., Ryu, S.R., Lee, S.S., Chae, Y.S., Kim, E.J., Choi, J.H., Oh, S., Park, S.H., Choung, J.T., Yoo, Y., et al. (2012). Suppression of inflammation by recombinant *Salmonella typhimurium* harboring CCL22 microRNA. *DNA Cell Biol.* *31*, 290–297.
- Yoshitaka, T., Kawai, A., Miyaki, S., Numoto, K., Kikuta, K., Ozaki, T., Lotz, M., and Asahara, H. (2013). Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* *31*, 1992–1998.
- Yu, F.-X., Zhao, B., and Guan, K.-L. (2015a). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* *163*, 811–828.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M.J. (2004a). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* *304*, 1500–1502.
- Yu, T., Li, J., Yan, M., Liu, L., Lin, H., Zhao, F., Sun, L., Zhang, Y., Cui, Y., Zhang, F., et al. (2015b). MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway. *Oncogene* *34*, 413–423.
- Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentshev, I., Goebel, W., and Szalay, A.A. (2004b). Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat. Biotechnol.* *22*, 313–320.
- Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.-Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Mol. Cell* *19*, 405–419.
- Zahaf, N.I., and Schmidt, G. (2017). Bacterial Toxins for Cancer Therapy. *Toxins (Basel)* *9*, 236.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4776–4785.

- Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S.R., and Wei, Y. (2011). Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* *313*, 129–136.
- Zhang, Y., and Rosenberg, A.E. (2017). Bone-Forming Tumors. *Surg. Pathol. Clin.* *10*, 513–535.
- Zhang, B., Liu, Y., and Zhang, J. (2018). Silencing of miR-19a-3p enhances osteosarcoma cells chemosensitivity by elevating the expression of tumor suppressor PTEN. *Oncol. Lett.*
- Zhang, C., Long, F., Wan, J., Hu, Y., and He, H. (2016). MicroRNA-205 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting RUNX2. *Oncol. Rep.* *35*, 3275–3284.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* *118*, 57–68.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* *283*, 10892–10903.
- Zhang, J., Yu, X.-H., Yan, Y.-G., Wang, C., and Wang, W.-J. (2015). PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin. Chim. Acta* *444*, 182–192.
- Zhang, L., Gao, L., Zhao, L., Guo, B., Ji, K., Tian, Y., Wang, J., Yu, H., Hu, J., Kalvakolanu, D. V., et al. (2007). Intratumoral Delivery and Suppression of Prostate Tumor Growth by Attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium Carrying Plasmid-Based Small Interfering RNAs. *Cancer Res.* *67*, 5859–5864.
- Zhang, Y.-H., Li, B., Shen, L., Shen, Y., and Chen, X.-D. (2013a). The Role and Clinical Significance of Yes-Associated Protein 1 in Human Osteosarcoma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *26*, 157–167.
- Zhang, Y.-X., van Oosterwijk, J.G., Sicinska, E., Moss, S., Remillard, S.P., van Wezel, T., Bühnemann, C., Hassan, A.B., Demetri, G.D., Bovée, J.V.M.G., et al. (2013b). Functional profiling of receptor tyrosine kinases and downstream signaling in human chondrosarcomas identifies pathways for rational targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* *19*, 3796–3807.
- Zhao, Y., Tu, M.-J., Wang, W.-P., Qiu, J.-X., Yu, A.-X., and Yu, A.-M. (2016). Genetically engineered pre-microRNA-34a prodrug suppresses orthotopic osteosarcoma xenograft tumor growth via the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Sci. Rep.* *6*, 26611.
- Zheng, B., Ren, T., Huang, Y., Sun, K., Wang, S., Bao, X., Liu, K., and Guo, W. (2018). PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse. *J. Hematol. Oncol.* *11*, 16.
- Zheng, J., Chen, D., Chan, J., Yu, D., Ko, E., and Pang, S. (2003). Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A. *Cancer Gene Ther.* *10*, 764–770.
- Zheng, W., Xiao, H., Liu, H., and Zhou, Y. (2015). Expression of programmed death 1 is correlated with progression of osteosarcoma. *APMIS* *123*, 102–107.
- Zhu Z, Wang CP, Zhang YF, Nie L. MicroRNA-100 resensitizes resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of mTOR. *Asian Pac J Cancer Prev.*
- Zou, A., Liu, X., Mai, Z., Zhang, J., Liu, Z., Huang, Q., Wu, A., and Zhou, C. (2019). LINC00472 Acts as a Tumor Suppressor in NSCLC through KLLN-Mediated p53-Signaling Pathway via MicroRNA-149-3p and MicroRNA-4270. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *17*, 563–577.
- Zucchini, C., Manara, M.C., Cristalli, C., Carrabotta, M., Greco, S., Pinca, R.S., Ferrari, C., Landuzzi, L., Pasello, M., Lollini, P.-L., et al. (2019). ROCK2 deprivation leads to the inhibition of tumor growth and metastatic potential in osteosarcoma cells through the modulation of YAP activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *38*, 503.
- Zuo, C., Huang, Y., Bajis, R., Sahih, M., Li, Y.-P., Dai, K., and Zhang, X. (2012). Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos. Int.* *23*, 1653–1663.

## **ANNEXES**

---

## Publications scientifiques

---

### **1. Tumor suppressive role of miR-342-5p in human chondrosarcoma cells and 3D organoids**

**Clément Veys**, Abderrahim Benmoussa, Romain Contentin, Amandine Duchemin, Emilie Brotin, Jérôme Lafont, Yannick Saintigny, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle, Magali Demoor, Florence Legendre and Philippe Galéra

**Cell & Bioscience (Soumis en novembre 2020)**

### **2. Tumor suppressive role of miR-342-5p and miR-491-5p in human osteosarcoma cell**

**Clément Veys** *et al.*,

**Soumission en 2021**

### **3. MiR-4270 acts as a tumor suppressor through direct targeting Bcl-xL in human osteosarcoma cells**

**Clément Veys**, *et al.*,

**Soumission en 2021**

## Communication Orale

---

### **Congrès nationaux**

**Use of therapeutic microRNA for the treatment of chondrosarcoma.**

**Clément Veys**, Abderrahim Benmoussa, Romain Contentin, Amandine Duchemin, Emilie Brotin, Yannick Saintigny, Christophe Denoyelle, Magali Demoor, Florence Legendre and Philippe Galéra

XXII<sup>ème</sup> édition des Journées de l'Ecole Doctorale NBISE 497, Caen, France – 21 et 22 mars 2019.

## Communications Affichées

---

### **Congrès internationaux**

**Use of therapeutic microRNA for the treatment of chondrosarcoma.**

**Clément Veys**, Abderrahim Benmoussa, Romain Contentin, Amandine Duchemin, Emilie Brotin, Yannick Saintigny, Christophe Denoyelle, Magali Demoor, Florence Legendre and Philippe Galéra

3rd International Conference on the Long and the Short of Non-Coding RNAs, Chania, Crète, Grèce – 18 au 22 Juin 2019.

### **Congrès nationaux**

**Use of therapeutic microRNA for the treatment of chondrosarcoma.**

**Clément Veys**, Abderrahim Benmoussa, Romain Contentin, Amandine Duchemin, Emilie Brotin, Yannick Saintigny, Christophe Denoyelle, Magali Demoor, Florence Legendre and Philippe Galéra

Journées Normandes de Recherche Biomédicales, Caen, France – 19 Novembre 2019.

## Activités d'Enseignements

---

Avenant au contrat doctoral :

2017 – 2018 et 2018 – 2019 : Encadrement des séances de travaux pratiques (TP - Total : 70 heures) et travaux dirigés (TD - Total : 16 heures) – IUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques Caen (UE Culture cellulaire et méthodes alternatives à l'expérimentation animale) – Etudiants de 2<sup>ème</sup> année.

2017 – 2018 : Encadrement des séances de travaux dirigés (TD - Total : 8 heures) - IUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques Caen (UE Initiation à la biologie moléculaire) – Etudiants de 1<sup>ère</sup> année.

## Encadrement de Stagiaires

---

Co-encadrement de deux étudiants de Master 1 en 2019 :

- Pierre Cambier (2 mois) encadrement : Pr. Philippe Galéra et Dr. Florence Legendre, sujet du Stage : Validation de l'effet tueur et/ou chimiosensibilisateur de micro-ARNs sur deux lignées d'ostéosarcomes.
- Manon Jammes (2 mois) encadrement : Pr. Philippe Galéra et Dr. Florence Legendre, sujet du stage : Validation de l'effet tueur et/ou chimiosensibilisateur de micro-ARNs sur des lignées de chondrosarcome.

Co-encadrement d'une étudiante de Master 2 en 2020 (5 mois, Manon Jammes) : Pr. Philippe Galéra et Dr. Florence Legendre. Sujet : Validation de l'effet tueur et/ou chimiosensibilisateur de micro-ARNs sur des lignées de sarcomes osseux.

Formation aux différentes techniques expérimentales lors de son année de recherche au sein du laboratoire (1 an, Flavie Boulouard) – Sujet du stage : Validation de l'effet tueur et/ou chimiosensibilisateur de miRNAs sur une lignée de chondrosarcome. Encadrement : Pr. Philippe Galéra et Dr Nicolas Gruchy.

# Formations

---

## Formations mutualisées proposées par le collège des écoles doctorales de la ComUE Normandie Université

- Module Communication et savoir être :

Intégrité Scientifique (4 h)

- Modules pédagogiques de l'ESPE (Ecole supérieure du professorat et de l'éducation) :

Sociologie des publics étudiants (3 h)

Nouvelles formes d'apprentissage et numérique (3 h)

Voix, corps et communication professionnelle (6 h)

Evaluation et formation des étudiants (3 h)

Structure et fonctionnement de l'enseignement Supérieur et de la Recherche (3 h)

- Parcours entreprises

Intelligence économique et stratégique (6 h)

Création d'entreprises innovantes (6 h)

- Module d'accompagnement du devenir professionnel

De la thèse à l'emploi : construire son projet professionnel (12 h)

Valoriser son doctorat pour trouver un emploi dans les institutions européennes et les organisations (3 h)

## Formations proposées par l'école doctorale Normande Biologie intégrative, Santé, Environnement (edNBISE)

- Formation Microscopie / Imageries (12 h)
- Séquençage (6 h)
- Participation aux doctoriales mars 2020 (30 h) (événement annulé)

## Utilisation de miRNAs thérapeutiques pour traiter les chondrosarcomes et les ostéosarcomes

**Résumé :** Les ostéosarcomes (OS) et les chondrosarcomes (CS) sont les tumeurs osseuses malignes les plus répandues. Le pronostic est souvent sombre lorsque ces tumeurs ne sont pas résectables ou sont métastasées. Pour le CS, l'abondante matrice extracellulaire cartilagineuse produite et son microenvironnement hypoxique contribuent à sa résistance aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie conventionnels. Les microARNs (miRNAs) sont de petits ARNs non codants qui agissent comme des régulateurs post-transcriptionnels des ARNm. Ces miRNAs représentent une alternative thérapeutique intéressante. Un criblage fonctionnel à haut débit par mesure d'impédance réalisé pour la première fois chez le CS a permis d'identifier plusieurs miRNAs possédant des effets potentiellement cytotoxiques ou chimiosensibilisateurs. Dans cette thèse, les effets cytotoxiques du miR-491-5p et miR-342-5p sont confirmés sur 3 lignées de CS et 3 lignées d'OS. Ces 2 miRNAs induisent l'apoptose des cellules cultivées en monocouche. Seul le miR-342-5p a un effet cytotoxique sur des cellules de CS SW1353 cultivées dans un modèle 3D d'organoïde en hypoxie, mimant le microenvironnement physiopathologique du CS. Le miR-342-5p induit également l'autophagie chez des cellules de CS. Le miR-4270, quant à lui, a un effet cytotoxique et induit l'apoptose uniquement sur 2 lignées d'OS. L'étude des cibles moléculaires des miRNAs montre que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle important dans leurs effets. Les 3 miRNAs ciblent directement l'ARNm du facteur anti-apoptotique Bcl-xL et préviennent son expression protéique. Le miR-342-5p inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le CS et l'OS. Il ciblerait toutefois significativement l'ARNm de Bcl-2 uniquement dans le CS. Le miR-4270 diminue l'expression protéique du facteur anti-apoptotique Mcl-1 dans l'OS. De plus, excepté pour le miR-342-5p dans le CS, les 3 miRNAs favorisent l'expression de la protéine pro-apoptotique Bak. Par ailleurs, le miR-491-5p prévient également l'expression de l'EGFR. Le mode d'administration des miRNAs est un obstacle pour leur utilisation en thérapie. Les bactéries sont pressenties comme des candidates pertinentes pour leur vectorisation, d'autant plus que certaines d'entre elles sont capables de coloniser spécifiquement les tumeurs. Une souche bactérienne non pathogène, colonisatrice de xénotransplantes de CS et d'OS, a été modifiée pour exprimer le pré-miR-342. Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité du pré-miR-342 produit par la bactérie dans des cellules de CS. Malgré les effets cytostatiques et cytotoxiques inhérents aux petits ARNs bactériens et le faible rendement de purification du pré-miR-342, nous avons pu mettre en évidence que notre construction bactérienne est fonctionnelle chez le CS. L'ensemble de ces résultats offre des perspectives encourageantes pour la mise en place de thérapies alternatives dans le traitement des sarcomes osseux.

**Mots clés :** chondrosarcome, ostéosarcome, miR-342-5p, miR-491-5p, miR-4270, apoptose, autophagie, Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, vectorisation, bactérie.

### Use of therapeutic miRNAs to treat chondrosarcomas and osteosarcomas

**Abstract:** Chondrosarcomas (CS) and osteosarcomas (OS) are the most common malignant bone tumors. These tumors have a poor prognosis when unresectable or metastasized. For CS, the abundant extracellular matrix of cartilaginous nature and the hypoxic microenvironment contribute to their resistance to conventional chemotherapy and radiotherapy. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs, which act as post-transcriptional regulators of mRNAs. The use of miRNAs may represent an interesting therapeutic alternative. A high throughput functional screening by impedancemetry, performed for the first time on CS, allowed us to identify several miRNAs with potential cytotoxic or chemosensitive effects. In this thesis, the cytotoxic effects of miR-491-5p and miR-342-5p were confirmed on 3 CS and 3 OS cell lines. These miRNAs induced apoptosis of cells cultured as monolayers, but only miR-342-5p was cytotoxic on a relevant 3D CS organoid model in hypoxia that mimics the physiopathological microenvironment. MiR-342-5p also activated autophagy on CS cells. Regarding miR-4270, it had a cytotoxic effect and induced apoptosis only on 2 OS cell lines. The study of molecular targets of miRNAs showed that proteins of the Bcl-2 family play an important role in their effects. The three miRNAs directly targeted anti-apoptotic Bcl-xL mRNA and blocked its protein expression. MiR-342-5p inhibited the protein expression of the anti-apoptotic member Bcl-2 in CS and OS. However, it would significantly target Bcl-2 mRNA only in CS. MiR-4270 reduced expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 in OS. In addition, except for miR-342-5p in CS, the three miRNAs promoted the protein expression of the pro-apoptotic Bak. Otherwise, miR-491-5p also inhibited EGFR expression. The administration of miRNAs is an obstacle to their use in therapy. Bacteria have been identified as interesting candidates for miRNAs vectorization, especially since some of them are able to specifically colonize tumors. A non-pathogenic bacterial strain, colonizing CS and OS xenografts, was modified to express the pre-miR-342. We then verified the functionality of the pre-miR-342 produced by the bacteria in CS cells. Despite cytostatic and cytotoxic effects of small bacterial RNAs and the low purification yield for the pre-miR-342, we were able to demonstrate that our bacterial construct is functional on CS cells. Taken together, these results offer encouraging prospects for the development of alternative therapies in the treatment of bone sarcomas.

**Keywords:** chondrosarcoma, osteosarcoma, miR-342, miR-491, miR-4270, apoptosis, autophagy, Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, vectorization, bacteria.