

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE

IMPLICATION D'ADAM12 DANS LA PATHOGENESE DES OSTEOSARCOMES

THESE DE DOCTORAT

Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

Steven GEORGES

Le 23 octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M. CARLE Georges Directeur de Recherche CNRS, Nice
Mme REVERDIAU Pascale Professeur des Universités, Tours

Examineurs

M. HORNEBECK William Directeur de Recherche CNRS, Reims
Mme REDINI Françoise Directrice de Recherche INSERM, Nantes
M. VERRECCHIA Franck Directeur de Recherche INSERM, Nantes

Membre invité

M. DINTINGER Thierry Maître de Conférences des Universités, Nantes

Directeur de thèse

M. FORTUN Yannick Maître de Conférences des Universités, Angers

Ce travail a été réalisé dans le :

Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs

Osseuses Primitives - INSERM UMR-S 957



Je tiens à remercier particulièrement:

Monsieur **Marc Padrines**, pour avoir dirigé ce travail durant 3 années, puis pour ses qualités exceptionnelles : sa disponibilité, sa confiance, sa patience, son dynamisme et sa jovialité qui nous manque à tous ... Merci pour tout Marc !

Monsieur **Yannick Fortun** pour m'avoir aidé durant cette dernière année et notamment lors de la rédaction de cette thèse.

Monsieur **Dominique Heymann** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour la qualité de ses conseils et sa disponibilité.

Madame **Pascale Reverdiau** et Monsieur **Georges Carle** qui me font un grand honneur en acceptant d'être rapporteurs de ce travail.

Monsieur **William Hornebeck** pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Monsieur **Thierry Dintinger** pour m'avoir permis d'enseigner et pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Madame **Françoise Rédini** et Monsieur **Franck Verrecchia** pour m'avoir aidé lors de cette rédaction et pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Merci tout d'abord à **Carmen** pour m'avoir aidé (et encadré) lors de mon arrivée au laboratoire (t'inquiètes pas je comprenais ce que tu disais, tu sais bien que ton accent est parfait), pour ne pas avoir eu trop peur de mes cheveux longs et de mon piercing et puis bien sûr pour nous avoir accueilli à San Diego (et avoir forcé Pierre à mettre autre chose que des Nike aux pieds).

Pierrot, mon poto du bureau et d'en dehors, l'homme qui chambre plus vite que son ombre et qui a développé une excroissance reliée à un téléphone portable, un skieur pour qui le sens du mot virage reste à définir. Merci pour avoir su m'accepter malgré mes différences (et oui un roux motard, campagnard, « égorgueur de chèvre », « rennais » et « majordome démoniaque », je sais que ça fait beaucoup pour une seule personne). Merci aussi pour t'être transformé en agence de voyage avec formule « all inclusive » (je referai appeler tes services). Bon vent à UCLA avec l'amour de ta vie (gatien hein, pas jihane, enfin fais gaffe de pas te tromper quoi !).

Gatineau, mon seul et unique pote du Havre, un grand footballeur (même si tu n'as jamais franchi le milieu de terrain, enfin de ce que j'en ai vu). Grâce à toi mes tympans ont saigné à plusieurs reprises, non seulement dans les salles de manip' mais également dans la Berton. Merci pour nos parties de franches rigolades et pour tes gatinades qui resteront dans l'histoire à tout jamais (notamment grâce au « Petit Gatineau »). Merci aussi pour les vacances au ski et à L.A. qui resteront des supers souvenirs (mais t'inquiètes pas je compte revenir te voir c'est sûuuuuuur).

Régis, dont le mot « non » n'existe pas dans son vocabulaire et qui est sans doute le vendéen le plus serviable (mais aussi sans doute le plus susceptible) de toute la région ligérienne. Merci pour l'aide que tu m'as apporté lors de cette thèse (ton sens de la correction est sans doute plus aiguisé que ton sens de la rédaction) mais aussi pour les nombreuses soirées qui ne m'ont pas coûté un rond. A l'inverse de Pierre, tu n'es pas l'homme qui chambre plus vite que son ombre (malgré de nombreuses tentatives certes louables mais avec un résultat qu'on peut qualifier de mitigé) mais l'homme qui maigrit plus vite que son ombre.

Julien, pour avoir trouvé une oreille réceptive à mes débats foot (aux dépens de pas mal de gens qu'on a pu gonfler le midi et certains soirs). Ton goût immodéré pour les losers (tu vois de qui je parle) forcent le respect (ou la consternation) et t'as permis de ne pas passer

du côté obscur de la footixerie en continuant à supporter ton club de campagnard. Tu es malgré tout un homme de goût car tu as su apprécier la Brière à sa juste valeur. Merci pour ton aide (certes petite mais au combien importante) et t'inquiètes pas, Gasquet finira par devenir un grand joueur...un jour...enfin peut être...enfin sans doute pas faut être honnête.

Merci à **Romain**, un gars qui fait de la politique avec un très grand « P ». Merci d'avoir complété ma culture générale, notamment en m'ayant initié aux guerres napoléoniennes et au maréchal Ney (il faut bien dire que Masséna et Moncet ne lui arrivent pas à la cheville). Ton soutien indéfectible à Jean-Louis est louable mais je te prierai d'éviter d'enrôler mon frangin (il n'est pas encore prêt pour la Grande Log...non ne parlons pas de ces choses-là). Bon courage pour ta thèse qui débute. « Soldat, visez droit au cœur. ».

Julie, la princesse du LPRO, qui n'a pas peur de se lever à 4h du mat' pour faire le taxi (moyennant un ipod nano, rose cela va de soit). Merci pour ton aide et pour avoir fait de moi un champion de l'histo (enfin presque). Sans toi il me manquerait certainement quelques phalanges aujourd'hui. Même si on a peu communiqué à ton arrivée (il y a de ça quelques années déjà), j'espère que je me suis bien rattrapé depuis.

Lidia, la deuxième et dernière espagnole de cette liste et voisine de bureau, qui a appris le français à la vitesse d'un TGV (enfin certains n'en sont pas encore convaincus). Merci d'avoir essayer de m'apprendre à dire deux mots d'espagnol et à rouler les « r » (avec plus ou moins de succès). Et non le temps à Nantes n'est pas si pourri, il fait beau au moins une fois par jour...Joder !!!

Luis, merci de nous avoir tenu à l'œil dans le bureau, sans toi va savoir comment ce serait passé cette année. Et vive la Boliv..., euh le Chili pardon.

Julien (le deuxième dans cette liste), que je remercie pour ne pas avoir piqué mon iphone, c'est vraiment sympa. Merci également pour ta discrétion dans le bureau.

Audrey, à qui j'ai fait l'immense honneur de prendre une figure (qui est juste magnifique). Non ne me remercie pas ! Merci pour ce week-end à l'Ile-aux-moines même si t'as dû y laisser un pied dans l'affaire. Bon courage pour ta thèse qui commence (et non Audrey tu n'es pas grosse).

Marco, le gossbo de pharmaco du LPRO. Le seul qui connaît le cours de la sole et de la morue en temps réel et qui va voir les concerts de l'ONPL. Le spécialiste de la cagette et des sketches de Coluche. Même si tu changes de club comme de chemise tel un footix des temps modernes, tu m'auras quand même bien fait marrer grand chbeb.

Ben, le futur Patrick Edlinger sans aucune discussion possible (il te manque peut-être encore un peu de biceps). Grâce à toi j'ai pu mater un match de foot sur un écran de 12m de diagonale et rien que pour ça je te remercie (je t'excuse même d'être fan de NOFX et de Pennywise, personne n'est parfait). Merci aussi pour tes conseils sur l'hygiène, je reconnais que nettoyer les canettes de Coca avant de les boire, je n'y avais pas pensé.

François, l'homme mi-chercheur mi-marchand de tapis, toujours à l'affût de la bonne combine. La seule personne que je connaisse qui est capable de traverser la France pour acheter un scoot'. Je te remercie surtout de ne pas m'avoir péter la cheville lors de nos nombreux « urban foot ».

J'associe à ces remerciements tous les membres présents ou passés du **LPRO** pour leur aide quotidienne technique ou scientifique. Merci à Anne-Laure, Annie, Aude (pour son amour du rock'n roll), Audrey R, Béné (la patronne), Benoit, Bérengère (qu'on aime bien même si elle est du mauvais côté de la Loire), Camille, Céline, David, Elise, Eric, Fanny, Florian, Fred B, Fred L, Gaëlle, Gilles, Guillaume, Gwénola, Jérôme, Jimmy, Julie R, Julie T (pour ton rire qui traversait les couloirs), Kosei, Laurent, Manue (la deuxième briéronne du labo), Marguerite, Marie-Astrid, Marie-Françoise, Marie-Hélène, Martine, Mathias, Meadhbh, Nathalie, Olivier (le deuxième grand chbeb du labo), Pierre A, Pierre L, Sandrine M, Sandrine L, Séverine, Soizic (merci à la vendéenne pour ton aide précieuse), Sophie, Stéphane, Thomas, Valérie, Verena. J'espère n'avoir oublié personne.

A ma binôme de toujours **Anne-Claire**, sans qui je n'aurai pas traversé toutes ces années de fac sans encombre (ou presque). Merci pour tes cours hauts en couleur. La seule fille pour qui le 2 est bleu et le 6 est vert (grâce à toi ma mère est aussi consciente de son handicap). Merci pour toutes ces soirées sur Nantes et à Paris (et peut-être bientôt à New-York).

Erwann, mon éternel coloc', que je ne remercie pas pour son sens du rangement et du ménage, mais avec qui on s'est bien marrer durant ses 6 ou 7 années (je ne sais plus très

bien). Tes histoires deviendront des légendes urbaines qui se transmettront de génération en génération à la fac des Sciences. Vive la Brière libre.

Enfin, merci à tous **mes amis de Brière et de Navarre**, à **mes parents** et à **mon frère** pour leur soutien sans faille durant ces nombreuses années d'études !

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
LE TISSU OSSEUX : un tissu vivant et dynamique	2
A. Organisation du tissu osseux	3
1) Organisation générale	3
2) Organisation macroscopique	4
B. Les constituants du tissu osseux	6
1) La matrice extracellulaire	6
2) L'ostéoblaste	8
3) L'ostéoclaste	11
C. Le remodelage osseux	13
L'OSTEOSARCOME : une tumeur osseuse primitive maligne	16
A. Généralités sur l'ostéosarcome	17
1) Epidémiologie	19
2) Localisations des ostéosarcomes	20
3) Diagnostic	20
B. Etiologie de l'ostéosarcome	21
1) Ostéosarcome et croissance	21
2) Développement d'ostéosarcome lié à différentes pathologies	22
3) Anomalies cytogénétiques et épigénétiques	22
C. Le traitement médical des ostéosarcomes	24
1) Le traitement actuel	25
2) Les nouvelles approches thérapeutiques	26
LES METALLOPROTEASES : un rôle dans l'os et le cancer	30
A. Généralités sur les protéases	31
1) Les protéases à sérine	31
2) Les cathepsines à cystéine	34
3) Les métalloprotéases	36
B. Le rôle des protéases dans la physiologie osseuse	45
1) Protéases et matrice osseuse	45
2) Protéases, facteurs de croissance et cytokine	48
C. Le rôle des métalloprotéases lors du développement tumoral	51
1) La prolifération tumorale	52
2) L'angiogenèse	52
3) L'inflammation	53
4) Le processus invasif et métastatique	54
5) Les métalloprotéases comme cible thérapeutique	56
D. Le rôle des protéases dans le développement tumoral en site osseux	58
1) Dans l'ostéolyse associée à la tumeur	59
2) Dans l'ostéosarcome	60
Objectifs de la thèse :	62

1^{ère} Partie: INFLUENCE D'ADAM12 DANS LE DEVELOPPEMENT DES OSTEOSARCOMES ET SON CARACTERE OSTEOLYTIQUE

INTRODUCTION	65
A. Structure et fonctions d'ADAM12	66
1) Structure.....	66
2) L'activité protéasique d'ADAM12.....	67
3) Les différentes fonctions cellulaires d'ADAM12.....	67
4) Régulation de l'expression d'ADAM12.....	69
B. Rôle physiologique d'ADAM12	70
C. L'influence d'ADAM12 sur la cancérogenèse	71
Objectifs de la thèse :	75
MATERIELS ET METHODES	76
A. Culture cellulaire	77
1) Lignées cellulaire.....	77
2) Conditions de culture cellulaire.....	77
B. Modèles d'ostéosarcome murin <i>in vivo</i>	78
C. Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes	79
1) Extraction d'ARN.....	79
2) Reverse Transcription.....	80
3) PCR quantitative.....	80
D. Production des lignées modifiées	82
1) Clonage des cassettes d'ADN codant pour des shRNAs ciblant l'ARNm ADAM12.....	82
2) Production des cellules K7M2 sous-exprimant ADAM12.....	86
3) Production de lignées MOS-J surexprimant ADAM12.....	88
E. Prolifération cellulaire	89
F. Etudes <i>in vivo</i> du rôle d'ADAM12	89
1) Mesure du volume tumoral.....	89
2) Analyse de la microarchitecture osseuse par microscanner.....	89
3) Analyse histologique.....	90
G. Analyse statistique	92
RESULTATS	93
A. Analyse de l'expression de protéases et de leurs inhibiteurs dans des modèles d'ostéosarcome murin	94
B. Etudes <i>in vitro</i> de l'effet d'ADAM12 sur les cellules d'ostéosarcome	97
1) Expression d'ADAM12 dans les lignées MOS-J et K7M2 modifiées.....	97
2) Effet d'ADAM12 sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.....	98
C. Etudes <i>in vivo</i> du rôle d'ADAM12 dans le développement des ostéosarcomes	99
1) Effets d'ADAM12 sur la croissance tumorale.....	99
2) Analyse de l'effet d'ADAM12 sur la microarchitecture osseuse.....	103
3) Analyse histologique.....	107
DISCUSSION	111

2^{ème} Partie: ADAM12 POTENTIALISE L'ACTIVITE DE LA VOIE DE SIGNALISATION TGF- β PAR LES SMADS DANS LES CELLULES D'OSTEOSARCOME

INTRODUCTION	118
A. Le rôle du TGF-β dans l'homéostasie osseuse	122
B. Le TGF-β dans la pathologie tumorale	123
1) Les fonctions anti- ou pro-tumorales du TGF- β	123
2) Le rôle du TGF- β dans le développement tumoral en site osseux	125
Objectifs de la thèse:	128
MATERIELS ET METHODES	129
A. Etude du contrôle de l'expression d'ADAM12 par différents facteurs impliqués dans la physiopathologie osseuse	130
B. Activation d'un promoteur artificiel cible du TGF-β	130
1) Construction plasmidique	130
2) Transfection transitoire et détection de l'activité luciférase	131
C. Western Blot	131
D. Prolifération cellulaire	132
E. Etude du cycle cellulaire	132
F. Migration cellulaire	133
G. Analyse statistique	133
RESULTATS	134
A. Etude du contrôle de l'expression d'ADAM12 par des facteurs impliqués dans la physiopathologie osseuse	135
B. Rôle d'ADAM12 sur la sensibilité des cellules d'ostéosarcome au TGF-β1	138
1) Etude de l'activation de la voie Smad3/4 par le TGF- β 1	138
2) Effet du TGF- β 1 sur la viabilité cellulaire en fonction d'ADAM12	141
3) Effet du TGF- β 1 sur la migration cellulaire en fonction d'ADAM12.....	145
DISCUSSION	147
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152
BIBLIOGRAPHIE	161
ANNEXES	179

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADAM: A disintegrin and metalloproteinase	FGF: Fibroblast growth factor
ADAM-TS: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif	GFP: Green fluorescent protein
ADN: Acide désoxyribonucléique	GPI: Glycosylphosphatidylinositol
AP-1: Activator protein-1	HB-EGF: Heparin binding- epidermal growth factor
ARN: Acide ribonucléique	IGF: Insulin-like growth factor
ARTS-1: Aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding	IGFBP: Insulin-like growth factor binding protein
ATP: Adénosine triphosphate	IL: Interleukin
BMP: Bone morphogenetic protein	IL-R: Interleukin receptor
BV/TV: Bone volume / Total volume	JAK: Janus kinases
CCL: Chemokine (C-C motif) ligand	LB: Luria-Bertoni
CD: Cluster of differentiation	MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
CDK: Cyclin-dependent kinase	M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
CFU-GM: Colony forming unit granulocyte macrophage	MDM: Murine double minute
CKI: Cathepsin K inhibitor	MEC: Matrice extracellulaire
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité	MH1: MAD homology
CSM: Cellules souches mésenchymateuses	MMP: Matrix metalloproteinase
CTR: Calcitonine Receptor	MMPI: Matrix metalloproteinase inhibitor
CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand	MP: Métalloprotéase
DAPK: Death associated protein kinase	MT-MMP: Membrane-type matrix metalloproteinase
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium	NK: Natural killer
DMP-1: Dentin matrix protein 1	OPG: Ostéoprotégérine
EDTA: Ethylène diamine tétraacétique	OSM: Oncostatine M
EGF: Epidermal growth factor	PAI: Plasminogen activator inhibitor
	PAR-1: Proteinase-activated receptor 1

PBS: Phosphate buffered saline

pH: Potentiel hydrogène

PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase

P-LAP: Placental leucine aminopeptidase

PPAR: Peroxisome proliferation-activated receptor

PTH: Hormone parathyroïdienne

PTHrP: Parathyroid hormone related protein

RANK: Receptor activator of NFκB

RANKL: Receptor activator of NFκB ligand

Rb: Retinoblastoma

RECK: Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RUNX2: Runt-related transcription factor

SARA: Smad anchor for receptor activation

shRNA: Small hairpin ribonucleic acid

siRNA: Small interfering ribonucleic acid

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

SVF: Sérum de veau foetal

SVMP: Snake venom metalloproteinases

TACE: TNF-alpha converting enzyme

TEM: Transition épithéliomésenchymateuse

TGF: Transforming growth factor

TIMP: Tissue inhibitors of metalloproteinases

TNF: Tumor necrosis factor

TNFR: Tumor necrosis factor receptor

tPA: Tissue plasminogen activator

TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase

TβRI: Récepteur de type I du transforming growth factor-β

TβRII: Récepteur de type II du transforming growth factor-β

uPA: Urokinase plasminogen activator

uPAR: Urokinase-type plasminogen activator receptor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

INTRODUCTION GENERALE

Chapitre I

LE TISSU OSSEUX : un tissu vivant et dynamique

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, d'origine mésenchymateuse composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

L'os assure différentes fonctions au sein de l'organisme :

- *une fonction mécanique* : l'os constitue une véritable « charpente » de l'organisme qui assure la protection des organes vitaux et constitue un point d'ancrage au système musculaire.
- *une fonction métabolique* : l'os participe au maintien de l'homéostasie phosphocalcique et cellulaire en étant le principal réservoir métabolique des éléments minéraux (en particulier de calcium et de phosphore).
- *une fonction hématopoïétique* : les os renferment dans leurs espaces médullaires la moelle hématopoïétique à l'origine des cellules du sang.

A. Organisation du tissu osseux

1) Organisation générale

Le squelette humain est composé de trois types d'os : les os longs (humérus, fémur, tibia), les os courts (vertèbres, phalanges) et les os plats (sternum, omoplate).

L'os long chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée *diaphyse* et de deux extrémités élargies et arrondies appelées *épiphyse*, recouvertes de cartilage articulaire (**Figure 1**). Des régions coniques, appelées *métaphyses*, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme et la structure particulières des os longs leur confèrent la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement.

Histologiquement, deux types de structure osseuse sont distinguables : l'os cortical (ou compact) et l'os trabéculaire (ou spongieux). L'ensemble est entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le *périoste*, excepté au niveau du cartilage articulaire et des insertions des tendons et des ligaments. Cette enveloppe joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et en circonférence de l'os. Elle est constituée de deux couches, une

couche superficielle fibreuse vascularisée et une couche profonde contenant des cellules souches et des pré-ostéoblastes ¹.

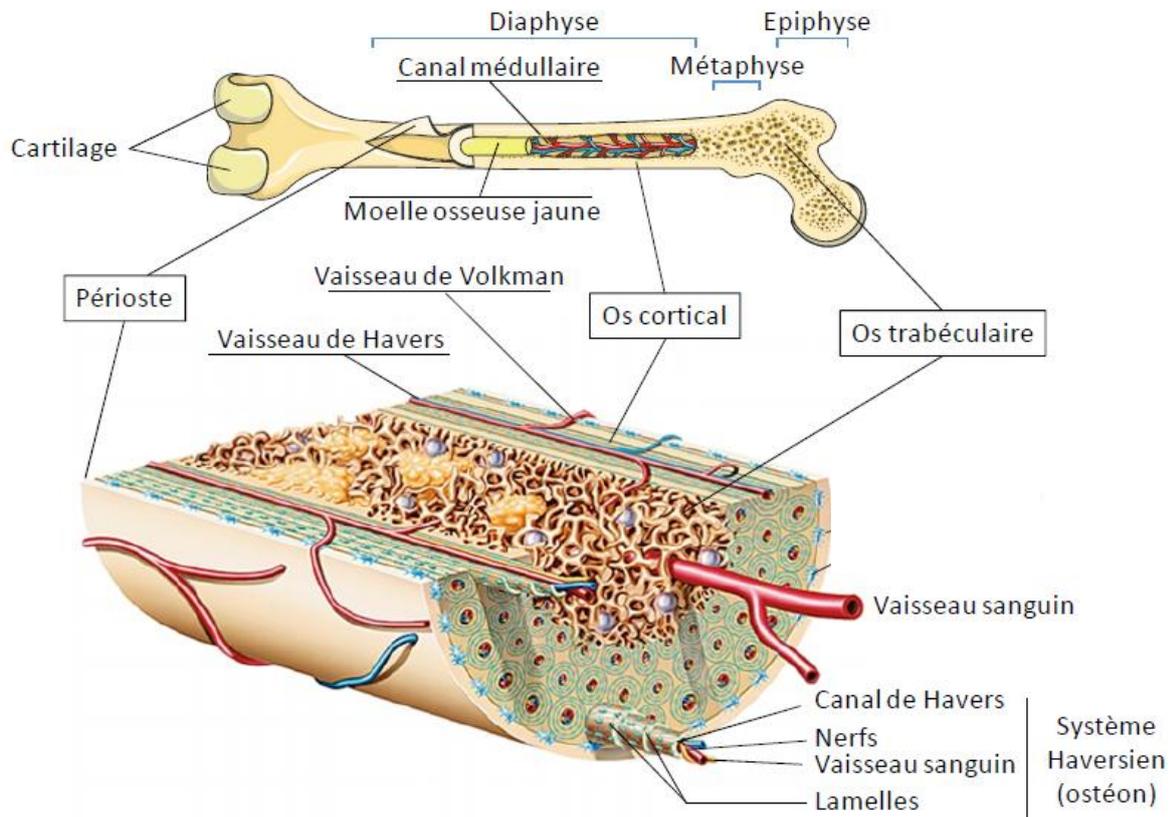


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long (Servier Medical Art)

2) Organisation macroscopique

L'os cortical, dont le degré de porosité est de 5 à 30%, constitue les parois de la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts. Il représente 80-85% du tissu osseux et se présente sous la forme d'une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300 μm de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Chaque ostéon (qui correspond à l'unité structurale de l'os cortical) est composé de lamelles concentriques de substance organique. Cette substance organique est principalement composée de fibres de collagène qui forment des hélicoïdes autour du canal et qui sont organisées parallèlement les unes aux autres de façon à conférer au tissu cortical une résistance mécanique optimale. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50 μm , permet le passage de vaisseaux et de fibres nerveuses amyéliniques autour duquel se

positionnent cinq à quinze lamelles osseuses concentriques. Largement ouvert dans les ostéons primaires, le canal de Havers est délimité par les cellules ostéoprogénitrices (cellules peu différenciées ne synthétisant pas encore de substance osseuse) et les ostéoblastes. Ces cellules (ostéoblastes matures) se retrouvent emmurées dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons et deviennent alors des ostéocytes, conduisant au comblement partiel du canal. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits de Volkmann qui permettent la communication entre la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle osseuse (**Figure 2**).

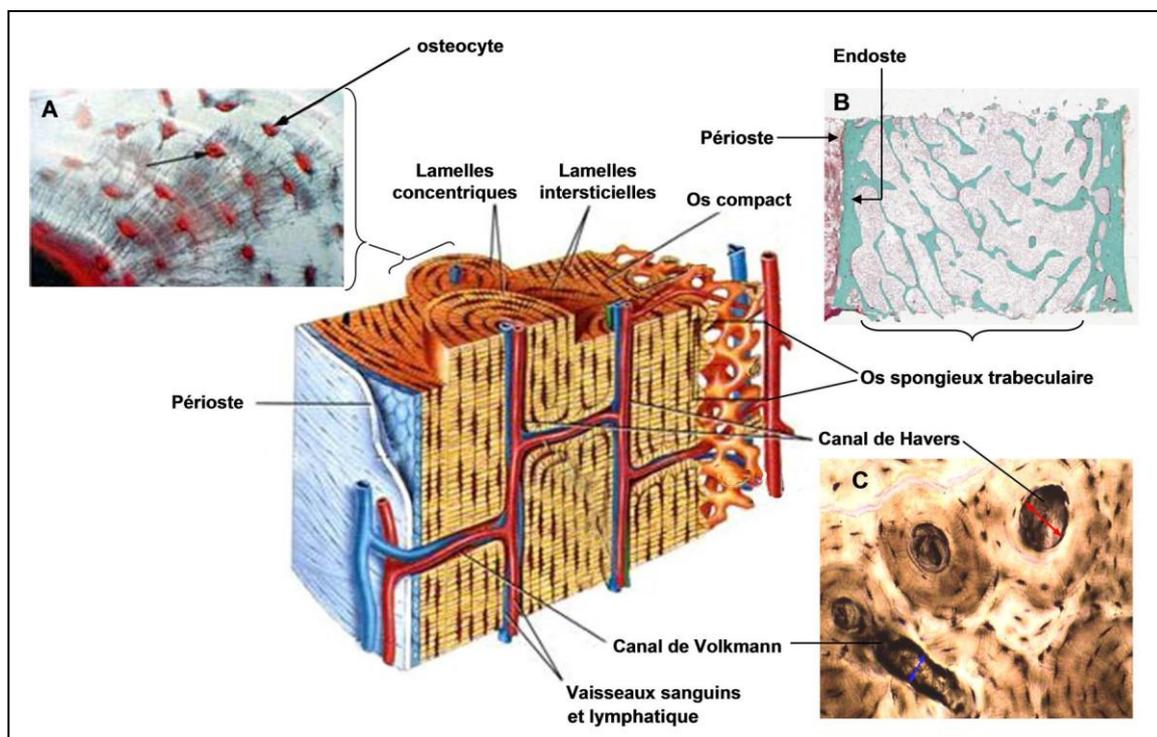


Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien ². **A**) Coloration d'ostéocytes piégés dans des lacunes appelées ostéoplastes positionnées dans les différentes lamelles concentriques d'un ostéon. **B**) Réseau trabéculaire tendu entre l'os cortical composé d'os compact. Chaque os cortical est limité sur sa face interne d'endoste et sur sa face externe de périoste. Coloration au trichrome de Goldner. **C**) Canal de Havers et canal de Volkmann vue en coupe longitudinale (Laboratoire de Physiopathologie de la résorption osseuse, INSERM UMR-S 957).

L'os trabéculaire (ou os spongieux) a un degré de porosité de 30 à 90% et est situé au centre de la diaphyse, dans les régions métaphysaires et diaphysaires ainsi que dans les os courts et plats. Il est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches (**Figure 3**). Entre les travées osseuses se trouve la moelle hématopoïétique représentant environ 75% du volume total de l'os spongieux. De par sa structure, l'os trabéculaire dispose d'une large surface d'échange avec la moelle

osseuse, lui permettant ainsi de remplir au mieux ses fonctions hématopoïétiques. Les cellules ostéoblastiques se trouvant à l'interface de la moelle osseuse et du tissu minéralisé jouent un rôle essentiel dans les échanges entrepris entre ces deux structures.

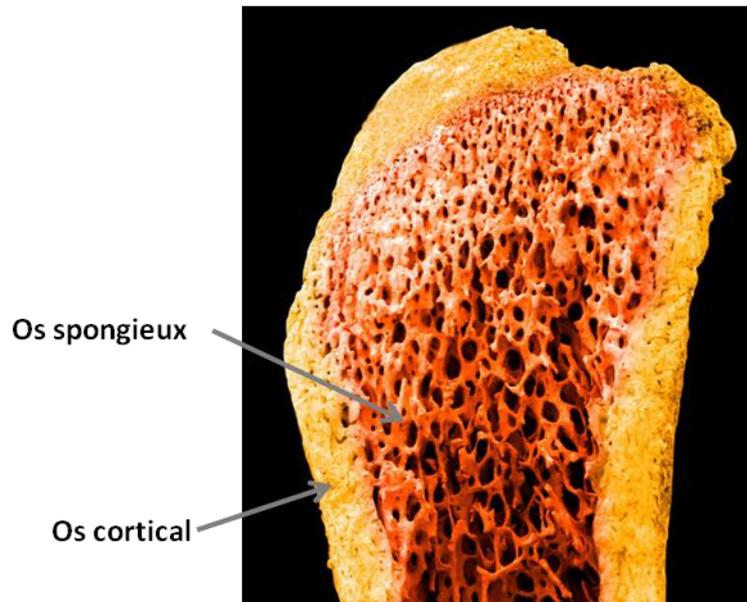


Figure 3 : Jonction entre os spongieux et os cortical (d'après www.visualsunlimited.com).

B. Les constituants du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué de plusieurs types de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire qui occupe entre 92 et 95% du volume tissulaire.

1) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire peut être subdivisée en deux phases, une phase organique et une phase minérale. Sa teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

La fraction organique, qui représente 30% de l'os sec et dégraissé, est composée essentiellement de fibres de collagène de type I entourées d'une substance fondamentale

interfibrillaire. Dans le tissu osseux lamellaire, les fibres de collagène sont disposées de façon parallèle au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation varie d'une lamelle à l'autre. La substance interfibrillaire est composée de différents constituants tels que :

- des *glycoprotéines* comme l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse qui contiennent une séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (séquence RGD) caractéristique des protéines d'adhérence cellulaire. Cette séquence est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines ³. Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettent leur attachement à la matrice extracellulaire.
- des *protéines* contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé. Parmi elles, l'ostéocalcine est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20%) et est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle joue un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation ^{4,5}.
- des *protéoglycanes et des glycosaminoglycanes* : ils permettent la rétention d'eau et la diffusion des nutriments.
- des *cytokines et des facteurs de croissance* (Transforming Growth factor ou TGF, Insulin-like Growth Factor ou IGF, interleukines (IL), Bone Morphogenetic Proteins ou BMP,...) : ces facteurs protéiques, également présents en petites quantités dans la matrice osseuse ⁶, jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire ainsi que dans le couplage entre formation et résorption osseuse.

La phase minérale, qui constitue 70% de la matrice osseuse, confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique et représente la plus importante réserve minérale de l'organisme. En effet, environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire (tissu osseux résistant après résorption par les ostéoclastes du tissu osseux primaire) succédant à la minéralisation primaire (tissu osseux fibreux réticulé peu résistant) qui elle-même suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes.

2) L'ostéoblaste

D'origine mésodermique, les *progéniteurs ostéoblastiques* sont des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ⁷, essentiellement présentes chez l'adulte dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules souches pluripotentes sont communes aux ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et adipocytes. La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression de facteurs de transcription spécifiques (**Figure 4**) :

-*Sox-9* gouverne la voie chondroblastique.

-*Myo-D* permet la différenciation des CSM vers la voie myoblastique.

-*RUNX2* (Runt-related transcription factor 2) et *Ostérix* conduisent vers la voie ostéoblastique.

-*PPAR γ 2* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2) induit la voie adipocytaire ⁸

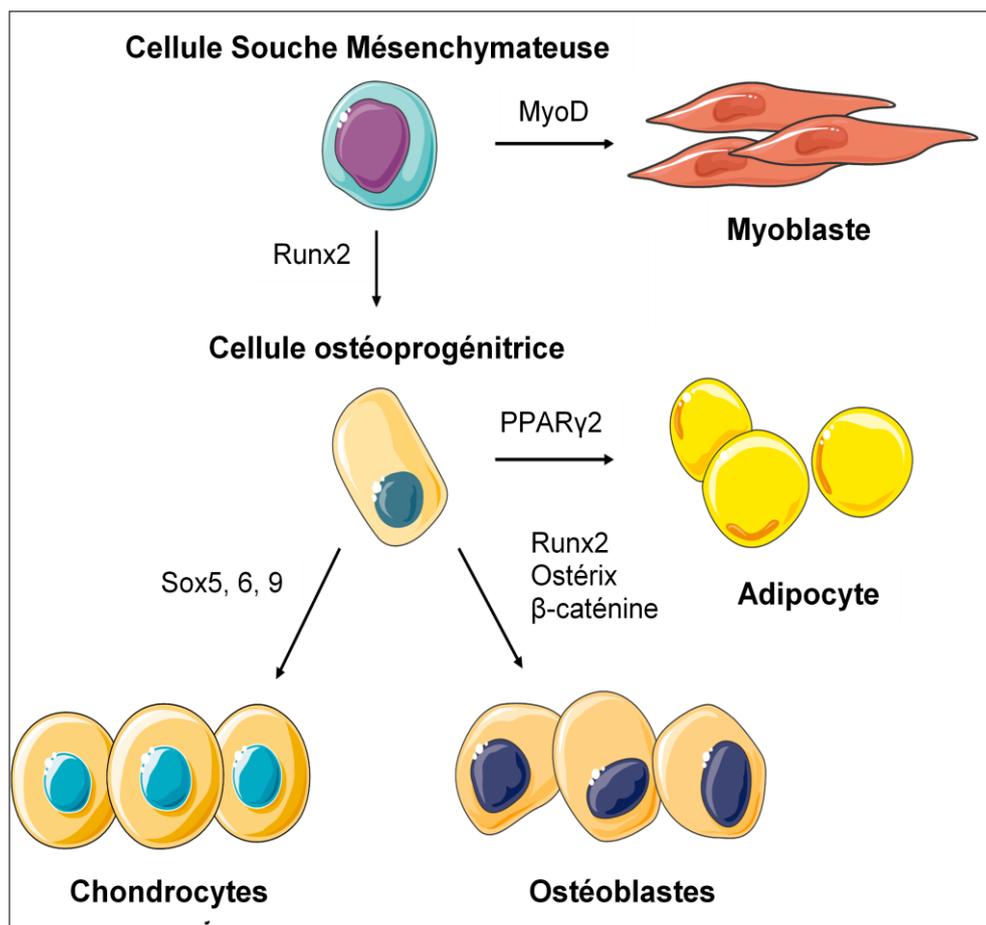


Figure 4 : Les ostéoblastes sont issus de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sous l'action de facteurs de transcription spécifiques ⁸

L'engagement des cellules précurseurs vers la voie ostéoblastique implique également de nombreux autres facteurs de transcription. Ainsi, l'importance du complexe AP-1 [Activator Protein-1] (constitué d'homo ou hétérodimères de facteurs de transcription de la famille Jun/Fos) dans le développement du tissu osseux a été mise en évidence chez des souris présentant une surexpression de c-Fos, caractérisées par la transformation des ostéoblastes et l'apparition d'ostéosarcomes^{9,10}. Au contraire, des souris fos -/- présentent un retard de croissance, une ostéopétrose (maladie métabolique osseuse autosomique provoquée par une anomalie fonctionnelle des ostéoclastes à l'origine de la persistance de cartilage calcifié dans l'os trabéculaire) ainsi que des défauts dans le remodelage osseux et une hématopoïèse altérée¹¹. Enfin, différentes cytokines dirigent également la différenciation des CSM vers la voie ostéoblastique. C'est le cas par exemple de l'OSM (Oncostatine M), une protéine de la famille de l'IL-6. Cette cytokine, produite notamment par les macrophages, facilite la différenciation des CSM en ostéoblastes matures et donc le processus de minéralisation. Ainsi, une surexpression locale de l'OSM dans des modèles murins (au niveau du tibia) induit une augmentation du volume osseux trabéculaire¹².

Les *ostéoblastes différenciés* sont des cellules mononucléées de forme cuboïdale disposées en couches monocellulaires sur la surface osseuse et ont pour fonction principale la synthèse de la matrice osseuse. Ils sécrètent notamment des protéines constituant la matrice organique (collagène de type I, ostéocalcine). Du fait de cette activité de synthèse élevée, les mitochondries, l'appareil de Golgi et un ergastoplasme rugueux très développé se trouvent à la partie apicale des cytoplasmes. De plus, le cytoplasme renferme des vésicules de calcium qui permettront la minéralisation de la matrice préalablement synthétisée (chez l'homme en moyenne 10-20 jours après la déposition de la matrice). La régulation de la formation osseuse fait intervenir la PTH (Parathyroid Hormone) et les hormones sexuelles. A l'issue de la période de formation osseuse, les glucocorticoïdes en excès induisent l'apoptose de la majorité des ostéoblastes (65%). Dans le cas contraire, les ostéoblastes peuvent devenir des cellules bordantes ou subir une différenciation terminale en ostéocytes.

Les *cellules bordantes* sont des ostéoblastes inactivés, ou quiescents, et forment une monocouche de cellules aplaties ou fusiformes contenant peu de cytoplasme et peu d'organites ce qui traduit une activité de synthèse réduite. Ces cellules communiquent par l'intermédiaire de fins et courts prolongements cytoplasmiques à l'extrémité desquels se positionnent des systèmes de jonctions communicantes.

Les *ostéocytes* proviennent de la différenciation terminale de la lignée ostéoblastique, sous l'action notamment de la Matrix Metalloproteinase de type 2 (MMP-2), de la Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1) ¹³ et de OSM ¹⁴. Ils sont enfermés dans la matrice organique minéralisée au sein d'une lacune dénommée ostéoplaste. Suite à l'activation des ostéoblastes, certains d'entre eux vont peu à peu s'enfouir dans la matrice organique qu'ils ont synthétisée. La matrice organique ainsi formée va alors progressivement se minéraliser, entourant les cellules qui vont y être piégées et se différencier en ostéocytes. Les ostéocytes sont caractérisés par de fins et longs prolongements cytoplasmiques traversant la matrice organique minéralisée dans de fins canicules (**Figure 5**). Ils possèdent un réticulum plasmique granulaire et un appareil de Golgi réduit par rapport à celui des ostéoblastes actifs, ce qui marque une capacité moindre de synthèse protéique. Chaque ostéocyte établit d'étroits contacts avec ses voisins par l'intermédiaire d'un système de jonctions communicantes. Les ostéocytes jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie phosphocalcique et, en restant en contact avec les ostéoblastes participent à l'harmonisation du remodelage osseux. Ils interagissent avec les fibres de collagène tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrine (intégrine β_1) et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques. Les ostéocytes sont également capables de synthétiser des facteurs solubles, comme la sclérostine, inhibant la synthèse de matrice organique par les ostéoblastes ainsi que leur différenciation.



Figure 5 : Ostéocyte dans son ostéoplaste colorisée en microscopie électronique à balayage (x4000)

3) L'ostéoclaste

Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique et monocytaire ^{15,16} (**Figure 6**).

Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux *cellules mononucléées* appelées CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage). Le M-CSF (Macrophage-monocyte Colony Stimulating Factor) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte/macrophage. Ces cellules sont considérées comme les précurseurs des ostéoclastes et sont caractérisées par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques, la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) et le récepteur à la calcitonine (CTR).

Les *précurseurs mononucléés* sont ensuite attirés vers un site de résorption par chimiotactisme ^{17,18} puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand), en *ostéoclastes mononucléés* exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des *cellules multinucléées* qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse ^{19,20}.

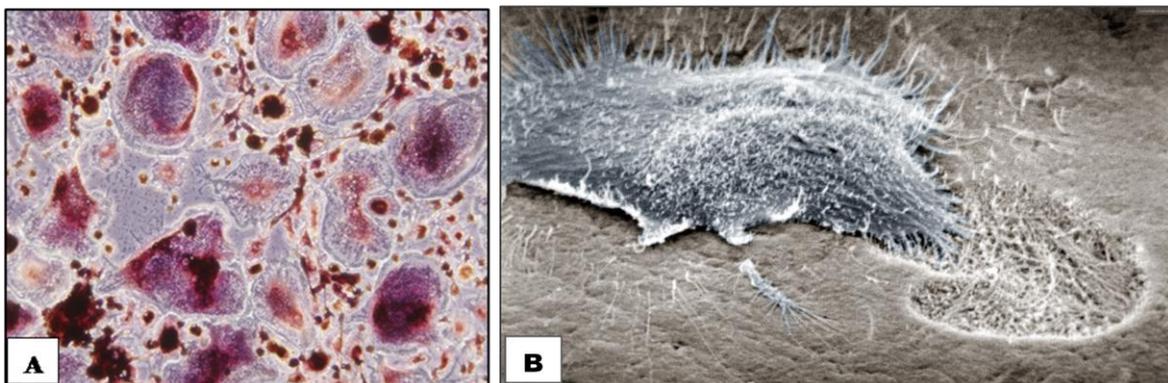


Figure 6 : **A**) Ostéoclastes obtenus par différenciation de monocytes CD14⁺ (Cluster Differentiation) en présence de RANKL (100 ng/mL) et de M-CSF (25 ng/mL) pendant 12 jours ; marquage cytochrome révélant l'activité TRAP des ostéoclastes (grossissement original : $\times 40$). **B**) Ostéoclaste en cours de résorption observé au microscope électronique à transmission.

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (de 50 à 100µm de diamètre) et multinucléées (contenant le plus souvent 10 à 20 noyaux). Ils dégradent la matrice osseuse et sont donc les acteurs principaux de la résorption osseuse. Ils possèdent pour cela un grand nombre de lysosomes, contenant des enzymes (dont TRAP), et de mitochondries permettant de fournir l'énergie nécessaire ainsi que de nombreuses pompes à protons situées au niveau de la bordure en brosse (**Figure 7**). Ces pompes à protons membranaires ATP-dépendantes (Adénosine Triphosphate) sont essentielles dans le processus de résorption osseuse. Elles permettent la libération de protons produits sous l'action d'une anhydrase carbonique de type II ²¹. La libération de ces protons fait chuter le pH (Potentiel Hydrogène) de l'environnement sous-ostéoclastique ce qui induit la dissolution des phases minérales du tissu osseux et constitue un environnement optimal pour l'activité des enzymes acides comme la cathepsine K, une protéase impliquée dans la résorption osseuse. L'ostéoclaste libère alors de nombreuses enzymes lysosomiales qui dégradent les éléments de la matrice organique, formant alors une lacune de Howship. Parmi les ions libérés, le calcium induit une dépolarisation des filaments d'actine de la zone claire et un détachement des ostéoclastes, qui se déplacent alors à la surface du tissu osseux pour résorber une nouvelle zone ²².

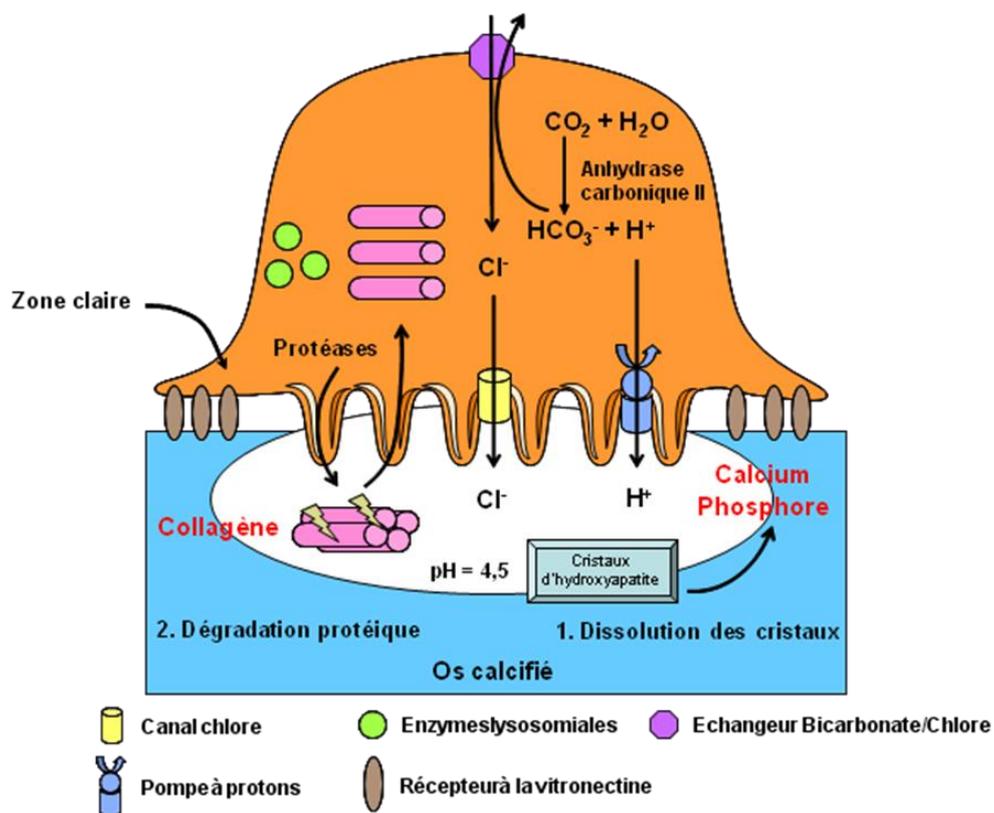


Figure 7 : Schéma d'un ostéoclaste actif ²³

C. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en perpétuel remaniement et passe par des phases dynamiques de formation et de résorption. Ce processus physiologique qui permet le renouvellement du tissu osseux correspond au remodelage osseux et fait intervenir principalement les ostéoclastes, qui dégradent la matrice extracellulaire et dissolvent le minéral, ainsi que les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice et induisent sa minéralisation⁷. L'équilibre entre l'activité ostéoblastique et l'activité ostéoclastique permet le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et de la masse osseuse au cours de la vie²⁴. A l'inverse, tout dérèglement de l'équilibre entre apposition et résorption osseuse provoque l'apparition de pathologies ostéocondensantes (ostéopétrose) ou ostéolytiques, pouvant être métaboliques (ostéoporose) ou tumorales (ostéosarcome).

Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois et se déroule selon une chronologie bien précise (**Figure 8**) :

- Dans un premier temps (*phase d'activation*), les cellules bordantes perçoivent un signal d'initiation, dont la nature exacte reste encore inconnue. Ce signal pourrait être hormonal (diminution de la quantité d'œstrogène), cytokinique ou encore mécanique (fracture)²⁵. Ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. En effet, les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3 et prostaglandine E2,...), les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice.

- Ces précurseurs ostéoclastiques vont alors se différencier et s'activer en ostéoclastes matures. C'est la *phase de résorption*. L'activité ostéoclastique est modulée par des facteurs libérés par les ostéoblastes tels que l'interleukine 6 (IL-6), le M-CSF et RANKL. RANKL est un facteur membranaire ou soluble induisant l'ostéoclastogenèse en se fixant sur son récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) exprimé à la surface des précurseurs ostéoclastiques mononucléés. A l'inverse, l'ostéoprotégérine (OPG), facteur

soluble également produit par les cellules ostéoblastiques agit comme un antagoniste de RANKL^{19,26}. Une fois ancré à la matrice osseuse, l'ostéoclaste crée un microenvironnement acide qui permet la dissolution de la phase inorganique qui précède la dégradation de la fraction protéique de la matrice osseuse grâce à l'équipement enzymatique de l'ostéoclaste²⁷.

- Cette phase de résorption est suivie d'une **phase d'inversion**. En effet, la dégradation de la matrice osseuse entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes ce qui provoque une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste qui mourra par apoptose. Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que des facteurs favorisant la formation osseuse comme le TGF β , le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), des BMPs ou encore des IGFs soient intégrés dans la matrice osseuse et libérés durant la phase de résorption.

- La **phase de formation** débute alors par la prolifération des cellules pré-ostéoblastiques et leur différenciation en ostéoblastes matures au niveau des lacunes de Howship. Une nouvelle matrice osseuse est alors synthétisée²⁸ et des cristaux d'hydroxyapatite se déposent ensuite entre les fibres de collagène. Cette phase de minéralisation dure entre 10 et 15 jours.

- Une fois la phase de formation achevée débute la **phase quiescente**. Une partie des ostéoblastes meurent par apoptose. Les ostéoblastes restants sont soit emmurés dans la matrice osseuse sous forme d'ostéocytes, soit transformés en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation des ostéoclastes.

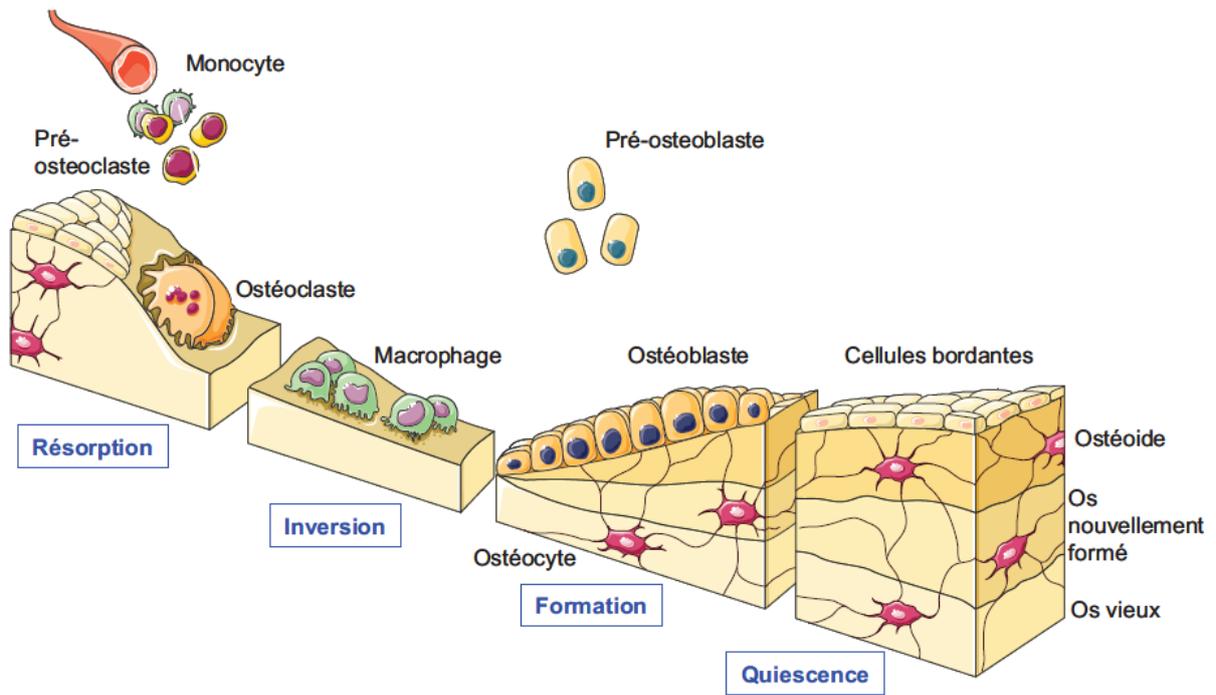


Figure 8 : Les différentes étapes du remodelage osseux ²⁹

Chapitre II

L'OSTEOSARCOME : une tumeur osseuse primitive maligne

Les tumeurs osseuses primitives sont considérées comme des pathologies rares et peuvent être divisées en deux groupes : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

Les tumeurs osseuses primitives bénignes sont les plus fréquentes et peuvent s'observer à tout âge avec une prédilection chez l'enfant et l'adulte jeune. Elles sont classées selon la nature du tissu produit par la tumeur :

- les tumeurs produisant du tissu osseux : ostéome ostéoïde
- les tumeurs cartilagineuses : chondrome, ostéochondrome, chondroblastome
- les tumeurs synthétisant du tissu conjonctif indifférencié : fibrome non ossifiant
- les dystrophies osseuses : kystes
- les tumeurs à cellules géantes

Les tumeurs osseuses primitives malignes représentent moins de 1% des cancers et environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune. Ces tumeurs touchent majoritairement une population jeune. Cependant, un second pic d'incidence se situe vers 60 ans avec des tumeurs osseuses primitives qui surviennent à la suite de pathologies du remodelage osseux telles que la maladie de Paget. Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle des tumeurs osseuses primitives chez les moins de 20 ans est estimée à 8,7 nouveaux cas par an par million d'habitants. La nature du tissu formé permet de les classer :

- *les tumeurs produisant du tissu osseux* : l'ostéosarcome
- *les tumeurs cartilagineuses* : le chondrosarcome
- *les tumeurs synthétisant du tissu conjonctif indifférencié* : le fibrosarcome
- *les tumeurs produisant des cellules dérivées de la moelle osseuse* : le sarcome d'Ewing, le lymphome de Parker, le myélome

L'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing représentent environ 90% des tumeurs osseuses primitives³⁰.

A. Généralités sur l'ostéosarcome

Les premiers cas d'ostéosarcomes ont été décrits sur des momies datant de l'Égypte ancienne il y a plus de 5000 ans³¹ avec la possibilité d'une intervention chirurgicale sous

forme d'amputation. Un cas également bien documenté d'ostéosarcome, ayant le profil radiologique typique en « feu d'herbes », a été observé sur le fémur d'un jeune péruvien datant de 1100 après JC (**Figure 9**).

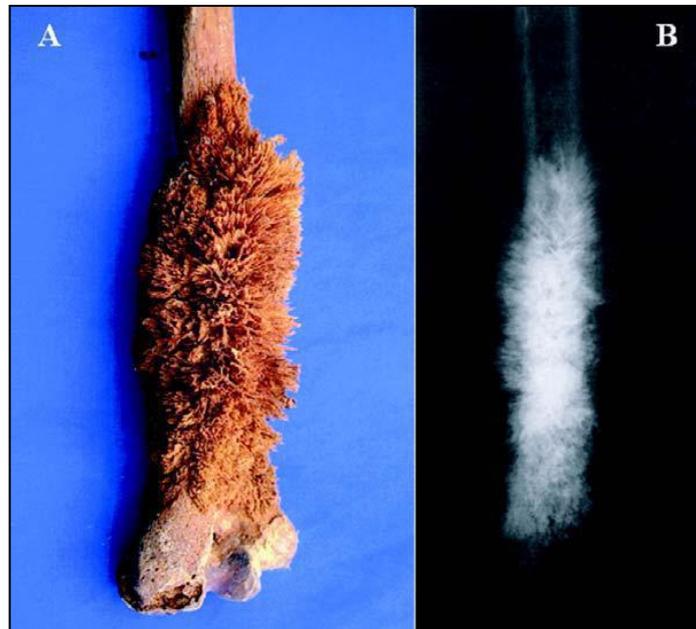


Figure 9 : A) Ostéosarcome du fémur chez un jeune péruvien datant de 1100 après JC. B) Profil radiologique typique en « feu d'herbes »³¹

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales. Il dérive du mésoderme et est issue des CSM³². L'ostéosarcome résulterait d'une dérégulation du programme de différenciation de ces CSM. Les cellules ostéosarcomateuses peuvent donc être plus ou moins différenciées selon le stade de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale. De manière générale, il semble apparaître qu'il existe une corrélation inverse entre différenciation et agressivité des tumeurs³³.

Il existe 3 sous-types d'ostéosarcome (**Figure 10**):

- *l'ostéosarcome ostéoblastique* : il est le plus fréquent des ostéosarcomes avec des cellules tumorales de type ostéoblastique produisant une matrice ostéoïde formant un complexe trabéculaire.

- *l'ostéosarcome fibroblastique* : il est formé de cellules indifférenciées de morphologie fibroblastique.
- *l'ostéosarcome chondroblastique* : il est caractérisé par des amas de cellules peu différenciées produisant une matrice cartilagineuse, rappelant l'ossification endochondrale.

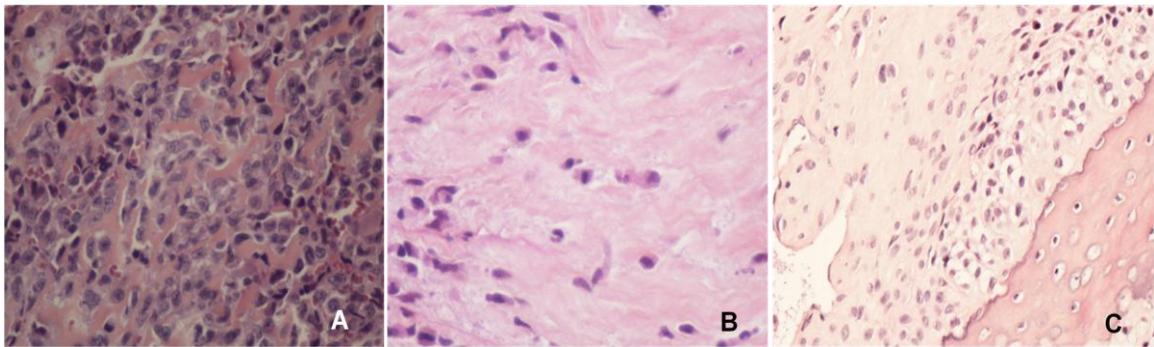


Figure 10 : Préparations histologiques d'ostéosarcomes ; **A**) Aspect typique d'un ostéosarcome ostéogénique (grossissement x 40). **B**) Ostéosarcome fibroblastique (grossissement x 20). **C**) Ostéosarcome chondroblastique (grossissement x20) (Dr MF Heymann, CHU de Nantes, INSERM U957).

1) Epidémiologie

L'ostéosarcome représente la moitié des cas des tumeurs osseuses primitives diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes). Il est donc la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes, si l'on exclut les myélomes et les lymphomes, avec une incidence annuelle d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux USA ³⁴ et 3,6 nouveaux cas par million d'enfant de moins de 15 ans en France ³⁰. L'ostéosarcome survient généralement sur une population jeune, avec un pic d'incidence observé à l'âge de 18 ans avec une relative prédominance masculine (ratio moyen de 1,4 : 1). Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé. L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire et la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes.

2) Localisations des ostéosarcomes

L'ostéosarcome touche dans 90% des cas la métaphyse des os longs. Il est principalement localisé au niveau du genou à savoir : l'extrémité inférieure du fémur (40 %), l'extrémité supérieure du tibia (15 %), mais également à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %). Ces sites correspondent aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Moins de 10% surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares tout comme celles des os plats ou des os courts. Cependant, des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (petits os situés près des articulations).

Trois groupes sont identifiés selon leur localisation au sein de l'os :

- *les ostéosarcomes de surface* : ils sont généralement de bon pronostic.
- *les ostéosarcomes intracorticaux* : ils sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées.
- *les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux* : ils sont les plus fréquents et regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité.

Le site métastatique préférentiel des ostéosarcomes est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient et la présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients. Plus rarement, des métastases osseuses peuvent être retrouvées ³⁵.

3) Diagnostic

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome est la douleur au niveau du site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. Une masse sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation apparaît plus tardivement. Les signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles à un stade avancé de la maladie. Le diagnostic repose essentiellement sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie ainsi que sur l'imagerie médicale (**Figure 11**). La radiographie conventionnelle révèle les lésions ostéolytiques ou ostéocondensantes et la scintigraphie osseuse permet la visualisation de

lésions multiples. L'imagerie en coupe de type résonance magnétique (IRM) ou tomodensitométrie (TDM) sont quant à elles utiles pour déterminer la nature précise de la tumeur, son extension locale et la présence de métastases, pulmonaires ou osseuses.

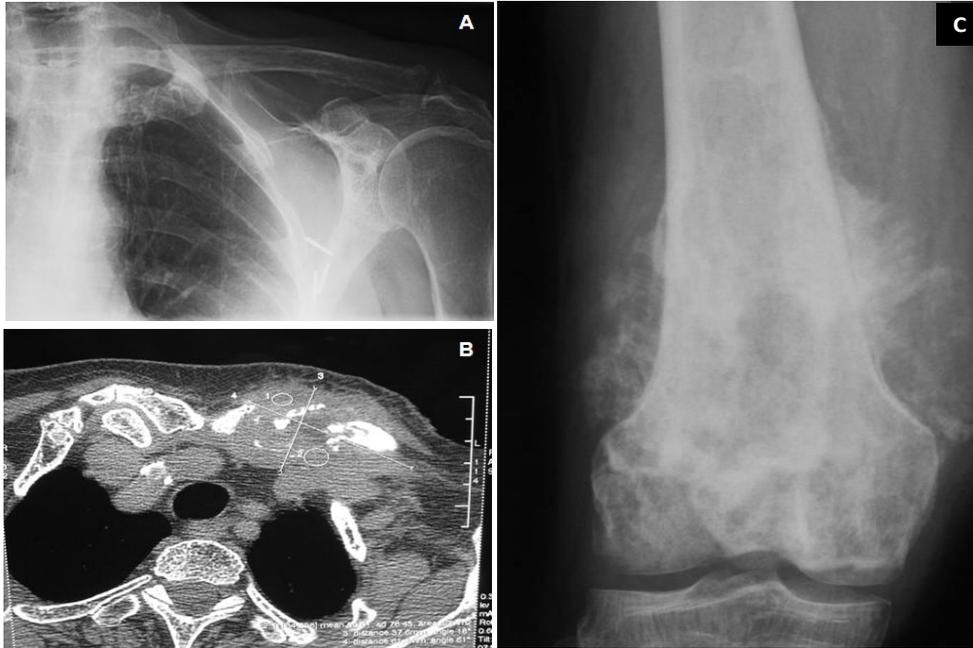


Figure 11 : **A**) Ostéosarcome radique claviculaire peu visible en radiologie. **B**) IRM (coupe horizontale) améliorant l'observation de cet ostéosarcome. **C**) Radiographie d'un ostéosarcome avec des ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse fémorale, ostéolyse corticale, ostéogénèse dans les parties molles (Pr François Gouin, CHU de Nantes, INSERM U 957)

B. Etiologie de l'ostéosarcome

L'étiologie précise de l'ostéosarcome reste encore largement inconnue actuellement. Cependant, un certain nombre de théories sur les causes et les facteurs de risque ont été émises à partir d'observations expérimentales et cliniques.

1) Ostéosarcome et croissance

Une plus grande fréquence de développement d'ostéosarcome chez les sujets de grande taille, un pic d'incidence au moment de la poussée de croissance pubertaire ainsi qu'une localisation souvent métaphysaire suggèrent fortement une corrélation entre croissance osseuse et ostéosarcome.

2) Développement d'ostéosarcome lié à différentes pathologies

Un certain nombre de pathologies favorisent dans un second temps le développement d'un ostéosarcome :

- *le rétinoblastome* : tumeur maligne de la rétine liée à une mutation sur les 2 allèles du gène *Rb* (Rétinoblastome). Lors d'un développement d'un second cancer, il s'agit dans 50% des cas d'un ostéosarcome³⁶. Les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans le reste de la population.
- *la maladie de Paget* : ostéopathie localisée (à un ou plusieurs os), caractérisée par un remodelage osseux excessif aboutissant à une hypertrophie progressive des pièces osseuses et à d'importantes anomalies de la microarchitecture osseuse.
- *le syndrome de Li-Fraumeni* : dû à une mutation d'un des allèles du gène *p53* aboutissant au développement de nombreuses tumeurs³⁷ dont des ostéosarcomes³⁸.
- *le syndrome de Rothmund-Thomson* : lié à une mutation du gène *RECQL4* situé sur le chromosome 8 et caractérisé par des troubles cutanés, des anomalies osseuses congénitales et un risque accru d'ostéosarcome.
- *la dysplasie fibreuse des os* : affection osseuse bénigne congénitale mais non héréditaire, où l'os normal est remplacé par un tissu pseudofibreux renfermant une ostéogenèse immature
- *la tumeur à cellules géantes* : tumeur généralement bénigne des os touchant le plus souvent la région métaphysoépiphysaire des os longs

3) Anomalies cytogénétiques et épigénétiques

L'analyse des caryotypes des ostéosarcomes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques ainsi que des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a pas permis d'identifier des spécificités. Cependant, des altérations génétiques récurrentes touchant des gènes impliqués dans le contrôle de la transition G1-S du cycle cellulaire ont été observées³⁹ (**Figure 12**). Les mutations les plus courantes touchent les gènes *Rb* (dans environ 70% des cas)^{40,41}, et *p53* (dans 50% des cas)⁴². Certains gènes sont amplifiés comme *MDM2* [Murine Double Minute 2] (un inhibiteur de p53) et *CDK4* (Cycline Dependante Kinase 4) qui permettent la transition G1-S. Un certain nombre de proto-oncogènes peuvent être également surexprimés : C-MYC⁴³, AP-1⁴⁴ et C-

KIT. La présence de ces différentes altérations génétiques est corrélée avec l'agressivité des tumeurs et la survie des patients. Ces gènes représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes.

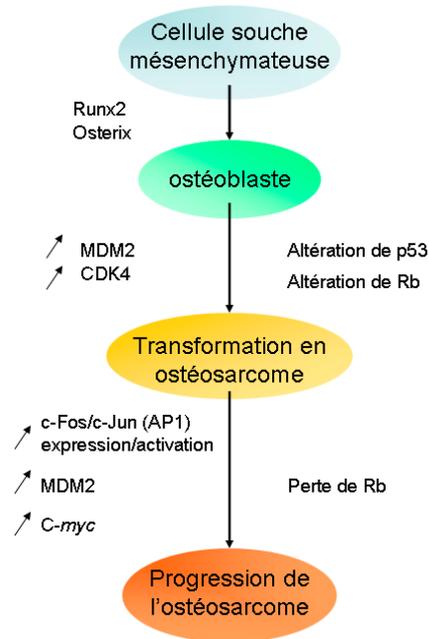


Figure 12 : Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement et la progression des ostéosarcomes.

En plus des altérations chromosomiques et génétiques, de nombreuses modifications épigénétiques ont également été observées dans l'ostéosarcome. En effet, des études ont montré que l'hyperméthylation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) au niveau des promoteurs entraîne une baisse importante de l'expression du gène associé (**Tableau I**)⁴⁵. Ces gènes sont impliqués dans différents processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la transduction de signal, la différenciation et la prolifération. Cette hyperméthylation de l'ADN joue un rôle dans la progression de l'ostéosarcome et dans son pouvoir métastatique.

Genes	Common names	Genes ID	Functions
<i>CDK4</i>	Cyclin-dependent kinase 4	1019	Amplification and cell cycle apoptosis
<i>ChM-1</i>	Chondromodulin-1	162840	Growth arrest
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor	1956	Amplifications
<i>GADD45A</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	13197	Apoptosis
<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor 2	3481	Signal transduction
<i>INK4A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	1029	Cell cycle regulation
<i>P53</i>	p53 tumor suppressor homologue	1E+08	Cell cycle regulation and apoptosis
<i>RASSF1A</i>	RAS association domain family protein 1A	11186	Signal transduction
<i>RECQL4</i>	RecQ protein-like 4	9401	Mutations
<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2	367218	Signal transduction
<i>WIF-1</i>	WNT inhibitory factor 1	11197	Proliferation and differentiation

Tableau I : Les gènes hyperméthylés dans l'ostéosarcome ¹⁴²

A l'inverse, certains gènes peuvent être hypométhylés (**Tableau II**). L'hypométhylation de l'ADN est un autre type de d'aberration épigénétique présente dans les tumeurs malignes, incluant l'ostéosarcome. Ce processus est catalysé par des déméthylases et induit des altérations fonctionnelles et structurelles du génome. Certains gènes, normalement réprimés, sont alors réexprimés. Ce phénomène peut alors favoriser la cancérogenèse.

Genes	Common names	Genes ID	Functions
FOS	FBJ osteosarcoma oncogene	314322	Amplifications
H19	H19, imprinted maternally expressed transcript	283120	Growth arrest
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue	4609	Amplifications
PHLDA2	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	22113	Apoptosis

Tableau II : Les gènes hypométhylés dans l'ostéosarcome ¹⁴²

C. Le traitement médical des ostéosarcomes

Le traitement de l'ostéosarcome a considérablement évolué au cours de ces dernières décennies. En effet, jusqu'aux années 70, le traitement était uniquement chirurgical. L'amputation du membre représentait alors le traitement radical de la tumeur primitive mais n'empêchait pas la survenue de métastases chez 80% des patients dans les mois suivants. La survie à 5 ans était alors seulement de 12% et trois patients sur quatre décédaient dans les deux ans suivant le diagnostic. Depuis 30 ans, l'apparition de nouvelles molécules de chimiothérapie a permis d'améliorer la prise en charge des patients.

1) Le traitement actuel

Actuellement, le traitement de l'ostéosarcome s'effectue généralement en trois étapes. La première est *une chimiothérapie néoadjuvante* d'une durée de trois mois. Cette étape permet un traitement prophylactique précoce des métastases, une diminution de la taille de la tumeur primitive et la possibilité d'évaluer la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire sur la pièce de résection et ainsi d'ajuster la chimiothérapie adjuvante. La seconde est *une résection chirurgicale de la tumeur*. La conservation du membre est possible dans 90% des cas mais l'amputation est nécessaire en cas de tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants. Enfin, le traitement se termine par *une chimiothérapie adjuvante* pendant six mois.

En France, les cinq molécules les plus fréquemment utilisées en chimiothérapie néoadjuvante et/ou adjuvante sont ⁴⁶ :

- *le méthotrexate* (utilisé chez les jeunes patients) : agent cytotoxique anti-métabolite qui agit en inhibant une enzyme-clé de la synthèse de la thymidine, la dihydrofolate réductase.
- *la doxorubicine* : agent cytotoxique considéré initialement comme un agent intercalant, qui agit également en inhibant des enzymes impliquées dans le désenroulement de l'acide désoxyribonucléique (ADN), les topo-isomérases de type II.
- *le cisplatine* : agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de ponts inter- et intrabins dans les chaînes d'ADN.
- *l'ifosfamide* : agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de ponts interbins en se fixant sur le N7 des guanines.
- *l'étoposide* : inhibiteur de la topoisomérase II.

La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'ostéosarcome. De plus, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie néoadjuvante est déterminée au moment de l'exérèse de la tumeur par l'appréciation de la nécrose tumorale qui quantifie le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce de résection (grade de HUVOS). Un patient est considéré comme « bon

répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection. Ceci permet par la suite d'adapter la chimiothérapie postopératoire.

Cette approche associant à la fois chimiothérapie et chirurgie a permis une amélioration considérable du pronostic ⁴⁷. La survie des patients à 5 ans est actuellement de 60 à 70 % pour les formes localisées mais chute à 30 % lorsque des métastases pulmonaires sont présentes lors du diagnostic (30% des patients présentent déjà des métastases au diagnostic). Cependant, une absence de réponse aux drogues anticancéreuses, conduisant au développement de métastases puis au décès, est souvent observée et reste donc un problème majeur. De plus, les séquences de traitement répétées, les hospitalisations et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement lourd et difficile à supporter pour les patients. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies anti-ostéosarcomateuses.

2) Les nouvelles approches thérapeutiques

a. Le cercle vicieux : une cible thérapeutique ?

La problématique biologique de l'ostéosarcome est complexe et repose en partie sur l'existence d'un cercle vicieux qui s'établit entre la phase de croissance tumorale et la phase de résorption osseuse (**Figure 13**).

En effet, le développement d'un ostéosarcome entraîne la formation de substance ostéoïde mais est également régulièrement associé à une ostéolyse maligne. Ce processus résulte d'une hyperactivité ostéoclastique, consécutive à la sécrétion de cytokines d'origine tumorale, telles que l'IL-1, l'IL-6, les TNF- α et β (Tumor Necrosis Factor), le Parathormone related peptide (PTHrP), certains facteurs de croissance comme le TGF- β ⁴⁸ mais également des facteurs pro-ostéoblastiques tels que les BMPs, IGF et Wnts. Tous ces facteurs agissent alors soit directement sur l'ostéoclaste, soit indirectement en induisant la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes. La balance entre résorption et formation osseuse est alors déséquilibrée et penche en faveur de la résorption. Des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire osseuse, tels que le TGF- β et l'IGF-1, sont alors libérés et stimulent

la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales. Un cercle vicieux s'installe alors entre la prolifération tumorale et l'ostéolyse associée.

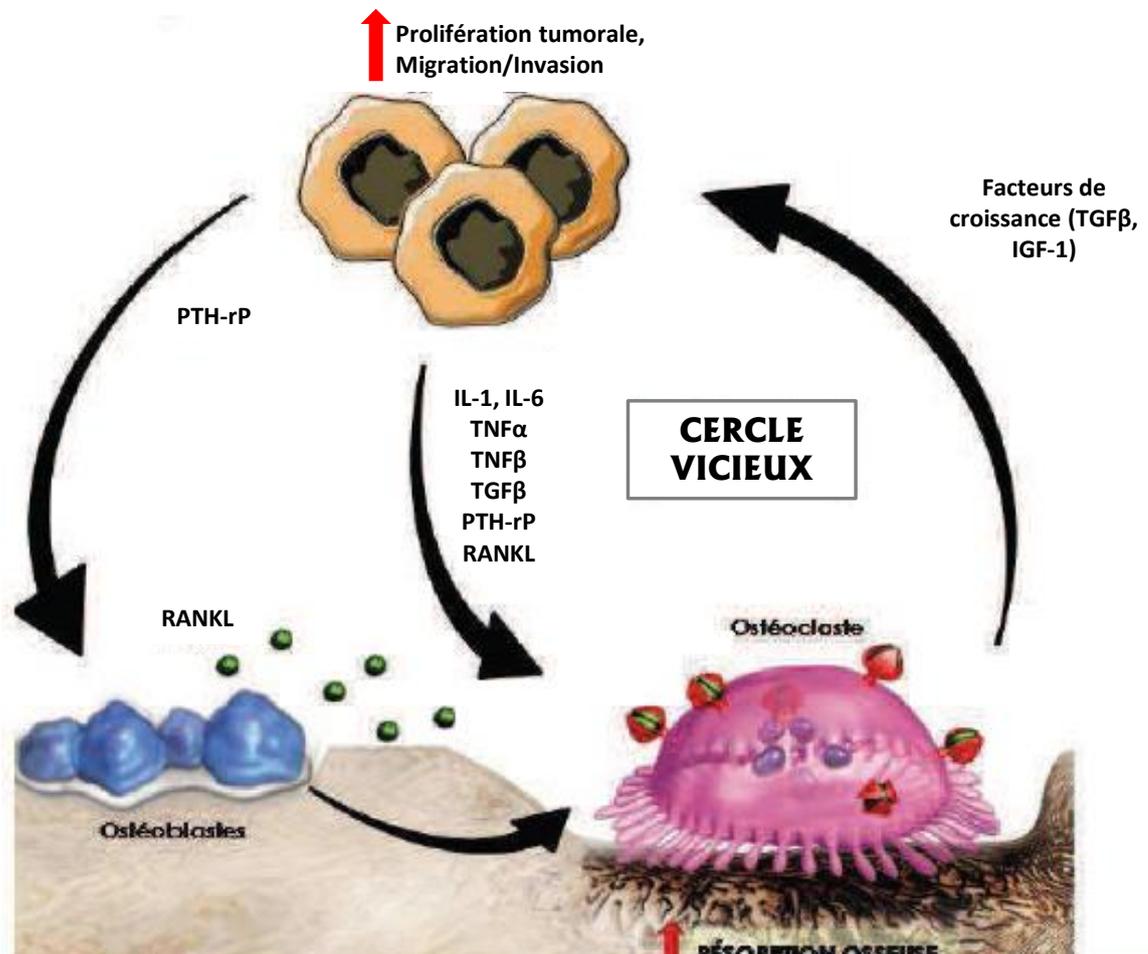


Figure 13 : Mise en place d'un cercle vicieux entre croissance tumorale et résorption osseuse (d'après Amgen ¹⁴⁹)

De nouvelles stratégies thérapeutiques consistent à empêcher la mise en place de ce cercle vicieux et donc de cibler à la fois les cellules tumorales et la résorption osseuse.

Parmi celles-ci, l'utilisation des *bisphosphonates*, connus pour leur action inhibitrice de la résorption osseuse et utilisés comme traitement de l'ostéoporose, est l'une des approches envisagées dans le traitement des tumeurs osseuses primitives ⁴⁹. Les bisphosphonates sont déjà utilisés dans le traitement palliatif des métastases osseuses par certains cliniciens ⁵⁰. Dans ce contexte, une étude multicentrique (protocole « OS 2006 ») est actuellement en cours avec pour objectif d'étudier l'intérêt thérapeutique de l'acide zolédronique en association avec la chimiothérapie conventionnelle.

Une autre voie d'investigation est de cibler la triade moléculaire RANK/RANKL/OPG, régulateurs essentiels de l'activité ostéoclastique, notamment en neutralisant la fixation de RANKL sur son récepteur RANK. A cette fin, différentes études ont été réalisées :

- L'utilisation de l'*OPG*, récepteur leurre de RANKL et donc facteur anti-résorptif, a montré son potentiel thérapeutique dans des études précliniques par sa capacité à prévenir les lésions ostéolytiques et à inhiber indirectement la progression tumorale en site osseux augmentant ainsi la survie des animaux ⁵¹.

- *RANK-Fc* (qui correspond à la fusion du domaine extracellulaire de RANK murin avec la région constante de l'immunoglobuline G1 humaine) a été utilisé comme outil thérapeutique pour les pathologies osseuses malignes dans une étude préclinique. RANK-Fc joue alors le rôle de récepteur leurre, à l'instar de l'*OPG*, mais possède cependant une plus grande spécificité pour RANKL. RANK-Fc a montré des propriétés anti-tumorales intéressantes chez des modèles murins non pas en ciblant directement les cellules tumorales mais en inhibant l'ostéolyse ⁵².

- Une thérapie combinatoire associant des *siRNAs* (Small Interfering Ribonucleic acid) inhibant l'expression de RANKL et l'ifosfamide a permis le ralentissement de la croissance tumorale dans des modèles d'ostéosarcomes murins ⁵³.

- L'utilisation de l'anticorps anti-RANKL (Denosumab) est actuellement testée dans des études cliniques dans le cadre des métastases osseuses. Une étude multicentrique randomisée en double aveugle de phase II ⁵⁴ avait montré l'efficacité du Denosumab (AMG 162). En effet, une seule dose de Denosumab administrée en sous-cutané à des patients présentant un myélome multiple ou des métastases osseuses secondaire à un cancer du sein diminue de manière dose-dépendante et durable la résorption osseuse.

Ces différentes molécules anti-résorption doivent être associées à des molécules anticancéreuses dans le cadre des traitements des ostéosarcomes, le but étant d'obtenir un effet additif voire synergique. De plus, une étude a montré que l'utilisation combinée de l'acide zolédronique et d'un dérivé de la rapamycine, RAD001 [un inhibiteur de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)], avait un effet anti-tumoral chez certains modèles d'ostéosarcome murins *in vitro* et *in vivo* ⁵⁵. Cette association de molécules a permis non seulement d'obtenir un effet synergique mais également de lever les résistances au RAD001 ouvrant alors de nouvelles perspectives dans les stratégies thérapeutiques

ciblées combinatoires. Une stratégie combinatoire permettrait alors de potentialiser l'effet anti-tumoral des drogues mais également d'éviter les phénomènes de résistance.

b. Les essais cliniques en cours

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de molécules anticancéreuses est un enjeu important, notamment dans le cadre de l'ostéosarcome. De nombreux essais cliniques de phase I, II et III sont donc en cours actuellement (**Figure 14**). Ces essais cliniques ciblent différents processus biologiques tels que : l'angiogenèse, le processus métastatique, la mort cellulaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire, le microenvironnement tumoral et le contrôle de l'apoptose. Un large panel d'agents thérapeutiques va ainsi permettre de développer des thérapies ciblées et individualisées et donc d'adapter le traitement à chaque patient en fonction par exemple des mutations détectées dans les cellules tumorales.

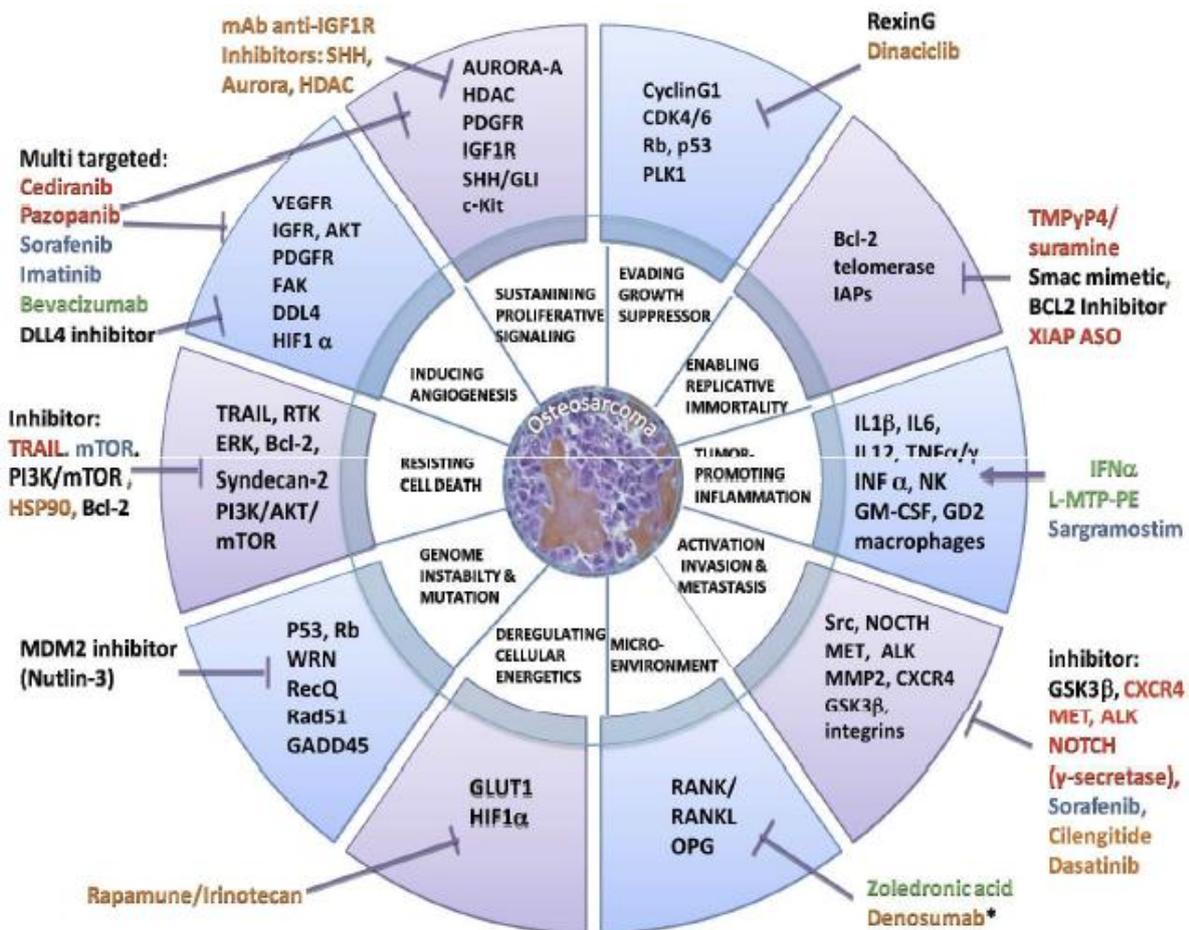


Figure 14 : Récapitulatif des différents essais cliniques en cours et des cibles moléculaires (en orange : phase I, en bleu : phase II, en vert : phase III, en noir : phase I et II uniquement chez l'adulte) (Dr Nadège Corradini, CHU Nantes, UMR 957)

Chapitre III

LES METALLOPROTEASES : un rôle dans l'os et le cancer

A. Généralités sur les protéases

Les protéases (ou peptidases) sont des enzymes hydrolysant de manière irréversible les liaisons peptidiques. Elles possèdent un site actif, qui assure la catalyse enzymatique, et un site de reconnaissance du substrat, qui donne une relative spécificité aux protéases. Les protéases, en fonction de leur séquence en acides aminés mais également en fonction du mode d'action du site catalytique, sont classées en plusieurs familles dont les protéases à sérine, les protéases à cystéine et les métalloprotéases. Ces différentes protéases sont produites sous une forme inactive, dépourvue d'activité enzymatique, appelée *zymogène*. Cette forme possède un prodomaine qui, une fois clivé, libère le site actif. Ce processus représente ainsi une voie de régulation importante de l'activité protéasique. Par ailleurs, du fait de la très grande variété de substrats, les fonctions biologiques des protéases sont extrêmement variées. Elles jouent par exemple un rôle important dans la maturation des protéines, l'apoptose, l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire ou encore la dégradation des protéines.

1) Les protéases à sérine

Les protéases à sérine sont des endopeptidases et se caractérisent par la composition de leur site catalytique. Celui-ci est constitué d'une histidine, d'un acide aspartique et d'une sérine. Cette famille de protéase se subdivise en trois sous-groupes selon leur site de reconnaissance :

- *Les « chymotrypsine-like »* : elles clivent après certains acides aminés hydrophobes (tyrosine, phénylalanine, leucine).
- *les « trypsin-like »* : elles hydrolysent les liaisons peptidiques après des acides aminés basiques, donc chargés positivement à pH physiologique (arginine, lysine)
- *les « elastase-like »* : elles clivent après de petits acides aminés comme la valine, la glycine ou encore l'alanine.

Les protéases à sérine jouent un rôle important dans la digestion, la coagulation ainsi que dans l'activation du système du complément (**Tableau III**).

Enzyme	Origine	Fonction
Trypsine	Pancréas	Digestion des protéines
Chymotrypsine	Pancréas	Digestion des protéines
Elastase	Pancréas	Digestion des protéines
Thrombine	Sérum de vertébrés	Coagulation du sang
Plasmine	Sérum de vertébrés	Dissolution des caillots sanguins
Kallikréine	Sang et tissus	Contrôle du flux sanguin
Complément C1	Sérum	Lyse cellulaire dans la réponse immunitaire
Protéase de l'acrosome	Acrosome du spermatozoïde	Pénétration dans l'ovule
Protéase lysosomiale	Cellules animales	Turnover des protéines cellulaires

Tableau III : Exemple de protéases à sérine ²⁷

Parmi les protéases à sérine, le système plasminogène/plasmine a un fonctionnement complexe et joue sur différents processus.

La *plasmine* est une protéase à sérine présente dans le sang dont la principale fonction est de dégrader la fibrine des caillots ⁵⁶. En condition extravasculaire, le rôle de cette protéase est multiple. Elle peut hydrolyser des protéines de la MEC [Matrice Extracellulaire] (fibronectine, vitronectine, aggrecane), libérer des facteurs de croissance ou encore activer des métalloprotéases par clivage de leur prodomaine ^{57,58}. La plasmine est produite par les hépatocytes sous sa forme inactive, le *plasminogène*. L'activation de cette protéase est un système protéolytique complexe qui nécessite l'intervention de plusieurs acteurs (**Figure 15**). Le plasminogène est notamment clivé par deux protéases à sérine : le tPA (tissue Plasminogen Activator) et l'uPA (urokinase Plasminogen Activator).

Le *tPA* est principalement sécrétée par les cellules endothéliales. Il est l'activateur circulant majoritaire de la plasmine et son activité est fibrine-dépendante. Il joue donc un rôle majeur dans la thrombolyse, un processus physiologique de dégradation des caillots sanguins ⁵⁹.

L'uPA est sécrétée par une grande variété de types cellulaires sous une forme inactive, la *pro-uPA*^{60,61,62}. L'activation de cette proenzyme est contrôlée par diverses voies enzymatiques, dont la plus importante est la voie passant par la plasmine elle-même. La plasmine active la pro-uPA en enzyme active^{63,64} qui en retour peut activer spécifiquement la plasmine, permettant de ce fait l'enclenchement d'une boucle d'amplification autonome des activités protéolytiques^{65,66}. D'autres protéases, telles les cathepsines B, L, (protéases à cystéine) ainsi que des kallikréines (protéases à sérine), peuvent activer le proenzyme uPA en enzyme actif^{67,68,69}. Cependant, pour que cette activation soit efficace, le pro-uPA doit tout d'abord être fixé à son récepteur membranaire, l'uPAR (urokinase-type Plasminogen Activator Receptor). Le complexe uPA-uPAR peut alors activer le plasminogène⁷⁰.

Afin de contrôler l'action de la plasmine, l'activité uPA (ainsi que le tPA) est régulée par des inhibiteurs spécifiques appelés serpins tels que le PAI1 et le PAI2 (Plasminogen Activator Inhibitor). Le *PAI-1* est l'inhibiteur physiologique principal chez l'homme et est synthétisé par un grand nombre de types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les adipocytes, les hépatocytes et les mégacaryocytes^{71,72}. Le PAI-1 est une glycoprotéine possédant un site réactif du côté C-terminal d'environ 20 acides aminés⁷³. Ce site réactif agit comme un pseudosubstrat pour l'uPA (et le tPA) en mimant le site spécifique de la plasmine⁷⁴. Le complexe uPA/uPAR/PAI-1 interagit alors avec le récepteur α 2MR/LRP (α 2 Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein receptor-related protein)⁷⁵ et est internalisé. L'uPA et le PAI1 sont dégradés, tandis que l'uPAR est recyclé à la surface cellulaire^{76,77}.

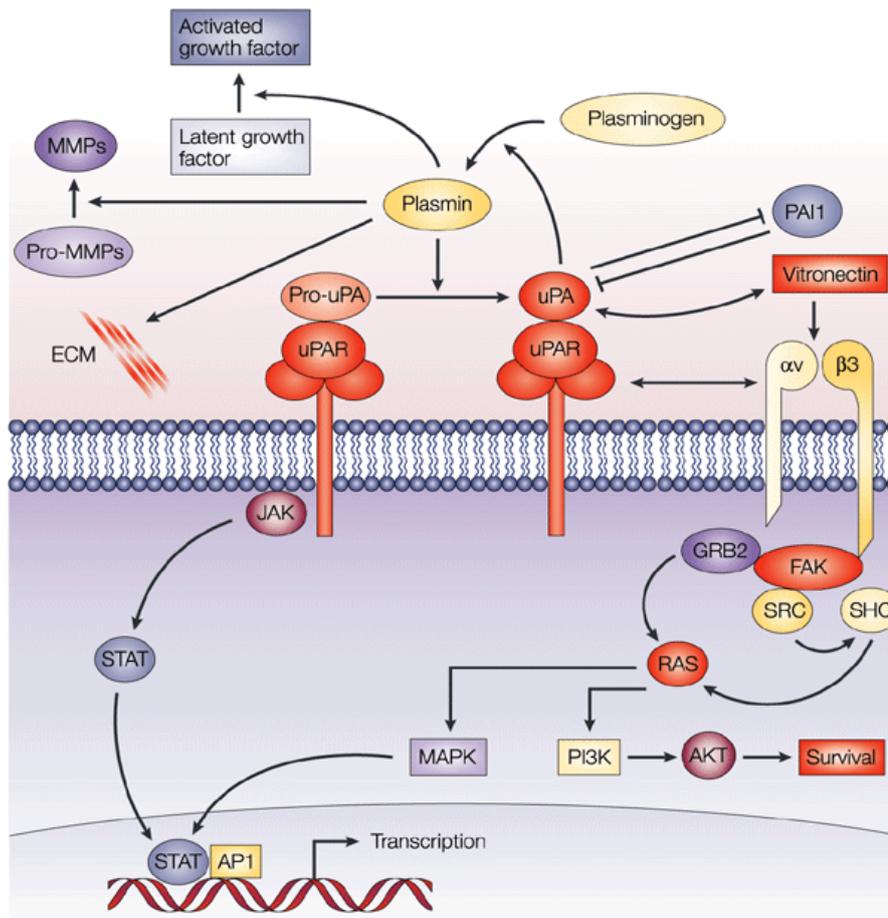


Figure 15 : Représentation schématique du système plasminogène/plasmine⁵⁰

2) Les cathepsines à cystéine

Les cathepsines à cystéine sont une famille d'enzymes possédant une cystéine au niveau du site catalytique. Elles sont au nombre de 11 : les cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, X et W. Ce sont généralement des endopeptidases intracellulaires actives à pH acide^{78,79} localisées dans les endolysosomes. A l'exception de la cathepsine S⁸⁰, elles sont inactivées de manière irréversible à pH neutre.

Ces protéases sont synthétisées sous forme d'une proenzyme contenant un peptide signal. Le clivage de ce peptide en position N-terminale se produit lors du passage dans le réticulum endoplasmique. La forme zymogène libérée est ensuite activée par :

- des endopeptidases comme la pepsine
- la cathepsine D ou différentes protéases à cystéine^{81,82}

- une autocatalyse dans des conditions de pH acide^{83,84}

La plupart des cathepsines sont ubiquitaires chez l'homme (**Tableau IV**). Cependant, l'expression des cathepsines K, W et S est propre à certaines cellules ou certains tissus, montrant ainsi un rôle plus spécifique. Ainsi, la cathepsine K est fortement exprimée par les ostéoclastes et joue un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice osseuse⁸⁵. La cathepsine W, essentiellement exprimée par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK (Natural Killer)^{86,87} est impliquée dans la réponse immunitaire et la régulation de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques. Enfin, la cathepsine S est exprimée par les cellules présentatrices d'antigène et dégrade les protéines antigéniques en peptides. Les fragments peptidiques générés vont être ensuite présentés à la surface des cellules par les molécules du CMH de classe II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).

Name	Synonym	Cleavage specificity	Tissue expression	Function
Cathepsin B	Cathepsin B1, APP secretase	Endopeptidase; peptidyl-dipeptidase	Ubiquitous	Lysosomal, extracellular; proteolytic processing of APP tumor invasion and metastasis
Cathepsin C ^a	DPP I, cathepsin J, dipeptidyl-transferase	Peptidyl-dipeptidase, tripeptidyl-peptidase; endopeptidase	Ubiquitous	Lysosomal; activates granulocyte serine proteases, factor XIII neuraminidases
Cathepsin F	SmCF	Endopeptidase	Heart, skeletal muscle, brain, testis, ovary	Lysosomal; role in tumor invasion and metastasis
Cathepsin H	Cathepsin B/3, BANA hydrolase	Endopeptidase, aminopeptidase	Brain, kidney, liver; inflamed tonsil	Lysosomal; invariant chain (Ii) degradation
Cathepsin K ^b	Cathepsin O(1), cathepsin O2, cathepsin X	Endopeptidase	Predominantly in bone (osteoclasts); present in most epithelial tissues	Lysosomal, extracellular; osteoclastic bone resorption; fibrinogen and ECM degradation
Cathepsin L	SPase, cathepsin L1	Endopeptidase	Ubiquitous	Lysosomal, extracellular, nuclear (truncated); antigen presentation (AP), Ii degradation, cell cycle regulation
Cathepsin O	—	Endopeptidase (pending)	Widely expressed	Lysosomal; protein turnover (pending)
Cathepsin S	—	Endopeptidase	Alveolar macrophages, spleen, testis, epithelial cells; CD4+ T-cells	Lysosomal, extracellular; Ii degradation, arterogenesis, AP, angiogenesis, elastolytic activity
Cathepsin V	Cathepsin L2, cathepsin U	Endopeptidase	Predominantly in thymus, testis; present in brain, corneal epithelium, skin	Lysosomal (potential); AP, Ii degradation
Cathepsin W	Lymphopain	Pending	Spleen, natural killer and cytotoxic T-cells	Immune response, regulation of T-cell cytotoxic activity
Cathepsin X	Cathepsin B2, cathepsin P, cathepsin Z	Carboxymono-peptidase, carboxydipeptidase	Widely expressed; ubiquitously in primary tumors and cancer cell lines	Lysosomal; non-proteolytic in cell adhesion

Tableau IV : Fonctions et localisations tissulaires des différentes cathepsines à cystéine⁶¹.

Originellement, le rôle de ces protéases était exclusivement attribué à la dégradation des protéines durant la mort cellulaire par nécrose ou par autophagie. Cependant, il est bien établi actuellement que les cathepsines à cystéine interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que la présentation de l'antigène aux molécules de classe II du CMH, le remodelage osseux, la différenciation des kératinocytes, l'angiogenèse et l'activation des prohormones^{79,88}. Certaines cathepsines sécrétées sont, en outre, impliquées dans le remodelage de la MEC en dégradant des protéines tels que le collagène ou l'élastine^{89,90}.

L'activité des cathepsines à cystéine peut être régulée par différentes familles d'inhibiteur:

- les stéfines (cystatine de type I) : protéines synthétisées sans peptide signal et qui sont intracellulaires⁹¹. Elles sont composées de trois membres, les stéfines A, B et C.
- les cystatines (cystatine de type II) : protéines comportant un peptide signal permettant sa localisation extracellulaire. Sept membres ont été identifiés.
- les kininogènes (cystatine de type III) : protéines présentes dans le sang clivées par des kallicroïnes.
- les serpins : famille de protéines extracellulaires composée de 36 membres chez l'homme

3) Les métalloprotéases

Les métalloprotéases (MP) constituent une famille d'enzyme de la classe des peptidases, appelées ainsi en raison de la présence dans leur site actif d'un ion métallique, généralement un ion zinc, qui participe à la coupure de la liaison peptidique dans les protéines. On distingue trois familles principales : les MMPs (Matrix MetalloProteinase), les ADAMs (A Disintegrin And MetalloProteinase) et les ADAM-TSs (A Disintegrin And MetalloProteinase with ThromboSpondin type I motif). L'activité protéasique est finement régulée par le contrôle de l'expression des différentes MP, par l'activation des formes zymogéniques mais également par l'action d'inhibiteurs protéiques. Ainsi, l'activité enzymatique des MP est principalement inhibée par une famille de protéines, les TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases), qui sont au nombre de quatre : TIMP-1, -2, -3 et -4.

a. Les MMPs

Les MMPs représentent une famille d'endopeptidases, possédant un atome de zinc dans leur site actif, et comptant 23 membres chez l'homme. Elles sont toutes composées d'au moins trois domaines conservés : un *peptide signal* (qui permet l'acheminement de la protéine à la surface cellulaire) suivi d'un *prodomaine* (rendant l'enzyme inactive) et enfin d'un *site catalytique* composé d'un motif capable de capter un ion zinc et assurant l'activité protéolytique. D'autres domaines sont également susceptibles de constituer la structure de ces endopeptidases :

- un *domaine hémapexine* : situé à l'extrémité C-terminale, il est impliqué dans les interactions avec les substrats et les inhibiteurs.
- un *domaine transmembranaire* : il permet la localisation membranaire de la protéase.
- un *domaine fibronectine de type II* : situé au milieu du site catalytique, il permet la fixation de la protéase au collagène de type IV, à la gélatine et à la laminine ⁹².
- une *région charnière* (Hinge region) : située entre le site catalytique et le domaine hémapexine.

En fonction de leurs caractéristiques structurales, les MMPs ont été divisées en plusieurs sous-groupes (**Figure 16**). *Les matrilysines* (MMP-7 et 26) sont les plus simples structurellement du fait qu'elles sont dépourvues du domaine hémapexine. *Les stromélysines* (MMP-3,10 et 11) et *les collagénases* (MMP-1, 8 et 13) ont une organisation structurale proche et possèdent le domaine hémapexine alors que *les gélatinases* regroupent quant à elles deux protéases, la MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B), qui possèdent un domaine fibronectine de type II. Enfin, *les MMPs membranaires* (ou Membrane Type-MMP) possèdent différents types de domaines permettant l'ancrage à la surface des cellules. Par exemple, les MMP-14, 15, 16 et 24, également appelées MT1-, MT2-, MT3- et MT5-MMP, possèdent un domaine transmembranaire de type I suivi d'un petit domaine C-terminal cytoplasmique. Les MMP-17 et 25 (MT4- et MT6-MMP) présentent une région hydrophobe de type GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) alors que la MMP-23 est ancrée à la membrane par sa séquence N-terminale du prodomaine ^{93,94}.

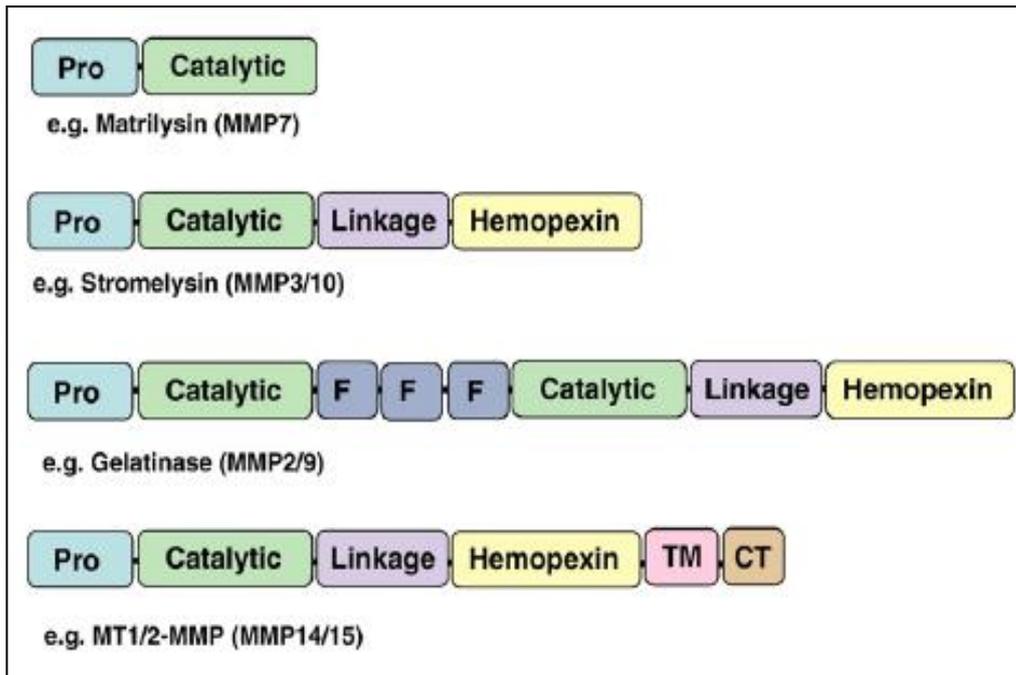


Figure 16 : Représentation schématique des différents types de structures des MMPs (Pro : prodomaine, F : domaine fibronectine de type II, TM : domaine transmembranaire, CT : domaine cytoplasmique) ⁶⁹.

Les MMPs ont un spectre protéolytique large (**Tableau V**) et jouent donc un rôle dans de nombreux processus physiologiques. Les cibles préférentielles de ces protéases sont les protéines de la MEC faisant de ces protéases des acteurs majeurs de la migration, de l'invasion cellulaire et du remodelage tissulaire.

Elles sont également responsables du relargage d'un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance. Par exemple, la MMP-7 clive le RANKL membranaire ⁹⁵, libérant la partie extracellulaire et produisant ainsi une forme soluble de RANKL. Outre d'intervenir dans le remodelage osseux, la MMP-7 peut également avoir un effet anti-apoptotique en clivant le Fas Ligand membranaire, le rendant alors inactif ⁹⁶. Les MMP-2 et MMP-9 clivent quant à elles le précurseur du TGF β , le pro-TGF β , qu'il soit membranaire ou emprisonné dans la MEC ⁹⁷.

Une autre fonction de ces protéases est l'activation d'un certain nombre de précurseurs protéolytiques. La pro-MMP2 peut ainsi être clivée par la plupart des MT-MMP comme les MT1-, 2-, 3-, 5- et 6-MMP ^{93,98}. De plus, les gélatinases (MMP-2 et -9), la MMP-7 et la

MMP-12 intervient dans le système plasminogène/plasmine en activant la plasmine qui, en retour, clive le prodomaine des MMP-2 et 9.

Enzymes	ECM substrates	Non-ECM substrates
Secreted-type MMP		
Collagenases		
Interstitial collagenase (MMP-1)	Collagens I, II, III, VII and X; gelatins; aggrecan; link protein; entactin; tenascin; perlecan	α 2-M; α 1-PI; α 1-antichymotrypsin; IGFBP-2, 3, 5; proIL-1 β ; CTGF
Neutrophil collagenase (MMP-8)	Collagens I, II and III; gelatins; aggrecan; link protein	α 1-PI
Collagenase-3 (MMP-13)	Collagens I, II, III, IV, IX, X and XIV; aggrecan; Fn; tenascin; osteonectin; Ln; Perlecan	CTGF; ProTGF- β ; MCP-3; α 1-antichymotrypsin
Gelatinases		
Gelatinase A (MMP-2)	Gelatins; collagens IV, V, VII, X and XI; Ln; Fn; elastin; aggrecan; link protein	ProTGF- β ; FGF receptor I; MCP-3; IGFBP-5; proIL-1 β ; galectin-3; plasminogen
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatins; collagens III, IV and V; aggrecan; elastin; entactin; link protein, vitronectin; N-telopeptide of collagen I	ProTGF- β ; IL-2 receptor α ; Kit-L; IGFBP-3; proIL-1 β ; ICAM-1; α 1-PI; galectin-3; plasminogen
Stromelysins		
Stromelysin-1 (MMP-3)	Aggrecan; decorin; gelatins; Fn; Ln; collagens III, IV, IX and X; tenascin; link protein; perlecan	IGFBP-3; proIL-1 β ; HB-EGF; CTGF; E-cadherin; α 1-antichymotrypsin; α 1-PI; α 2-M; plasminogen; uPA; proMMP-1, 7, 8, 9, 13
Stromelysin-2 (MMP-10)	Aggrecan; Fn; Ln; collagens III, IV and V; link protein	Pro1, 8, 10
Matrilysins		
Matrilysin-1 (MMP-7)	Aggrecan; gelatins; Fn; Ln; elastin; entactin; collagen IV; tenascin; decorin; link protein	Pro α -defensin; Fas-L; β 4 integrin; E-cadherin; proTNF α ; CTGF; HB-EGF; RANKL; IGFBP-3; plasminogen
Matrilysin-2 (MMP-26)	Gelatin; collagen IV; Fn; fibrinogen; vitronectin	ProMMP-9; α 1-PI
Furin-activated MMP		
Stromelysin-3 (MMP-11)	Fn; Ln; aggrecan; gelatins	α 1-PI; α 2-M; IGFBP-1
Epilysin (MMP-28)	Unknown	Casein
Other secreted-type MMP		
Metalloelastase (MMP-12)	Elastin; aggrecan; Fn; collagen IV; osteonectin; Ln; nidogen	Plasminogen; apolipoprotein(a)
RASI-1 (MMP-19)	Collagen IV; gelatin; Fn; tenascin; aggrecan; COMP; Ln; nidogen	IGFBP-3
Enamelysin (MMP-20)	Amelogenin; aggrecan; gelatin; COMP	Unknown
MMP-21	Unknown	Unknown
MMP-27	Unknown	Unknown
Membrane-anchored MMP		
Type I transmembrane-type MMP		
MT1-MMP (MMP-14)	Collagens I, II and III; gelatins; aggrecan; Fn; Ln; fibrin; Ln-5	ProMMP-2; proMMP-13; CD44; MCP-3; tissue transglutaminase
MT2-MMP (MMP-15)	Fn; tenascin; nidogen; aggrecan; perlecan; Ln	ProMMP-2; tissue transglutaminase
MT3-MMP (MMP-16)	Collagen III; Fn; gelatin	ProMMP-2; tissue transglutaminase
MT5-MMP (MMP-24)	PG	ProMMP-2
GPI-linked MMP		
MT4-MMP (MMP-17)	Gelatin; fibrinogen	Unknown
MT6-MMP (MMP-25)	Gelatin; collagen IV; fibrin; Fn; Ln	ProMMP-2
Type II transmembrane-type MMP		
MMP-23	Gelatin	Unknown

Tableau V : Listes des MMP humaines et de leurs substrats ⁷⁴

b. Les ADAMs

Les ADAMs sont des protéases transmembranaires de type I appartenant à la sous-famille des adamalysines. La famille des ADAMs compte seulement dix-neuf membres ayant une activité protéolytique. Leur structure se distingue de celles des MMPs par l'absence du domaine hémapexine et par l'ajout de trois domaines : *un domaine riche en cystéine*, *un domaine EGF-like* (Epidermal Growth Factor) et *un domaine disintégrine* (**Figure 17**).



Figure 17 : Représentation schématique de la structure des ADAM (Pro : prodomaine, Metalloproteinase : site catalytique, Disintegrin : domaine disintégrine, Cys R : domaine riche en cystéine, EGF : domaine EGF-like, TM : domaine transmembranaire, CT : domaine cytoplasmique) ⁶⁹.

Le domaine disintégrine des ADAMs permet l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice notamment en se liant aux intégrines. La principale intégrine impliquée dans ces processus est l'intégrine $\alpha 9 \beta 1$ qui se fixe sur une séquence conservée $R(X)_6DEVF$ ⁹⁹. Les ADAMs peuvent également interagir avec certains constituants de la MEC indépendamment de l'interaction disintégrine-intégrine. Ainsi le domaine riche en cystéine se lie à des protéoglycanes de la famille des heparanes sulfates, tels les syndecans qui interagissent avec ADAM12 ¹⁰⁰.

Le domaine intracytoplasmique des ADAMs est de longueur variable (de 40 à 250 acides aminés) mais contient généralement des sites de liaison pour les protéines de signalisation possédant un domaine SH3 (Src-homology 3), comme Src et Grb. Les ADAMs sont donc capables d'activer certaines voies de signalisation. De plus, certaines ADAMs possèdent dans ce domaine des sites de phosphorylation pour des sérine-thréonine kinases et des tyrosine kinases.

L'activité protéolytique des ADAMs se fait via un site catalytique très largement conservé chez l'ensemble des MP. Les substrats sont variés et concernent aussi bien des protéines de la MEC que des protéines membranaires (**Tableau VI**). Les ADAMs

permettent donc la libération dans le milieu extracellulaire de protéines biologiquement actives. Cette fonction a été décrite pour la première fois simultanément par deux groupes en 1997^{101,102}. Ils ont identifié une métalloprotéase contenant un domaine disintégrine capable de produire du TNF α . La protéase responsable de ce phénomène fut nommée TACE (TNF-Alpha Converting Enzyme), puis par la suite ADAM17. Depuis, de nombreuses autres protéines libérées par l'action d'ADAMs ont été identifiées. Par exemple, ADAM17 peut cliver RANKL¹⁰³ ou encore le proTGF α ¹⁰⁴ alors que ADAM9 et ADAM12 sont impliqués dans la libération du proHB-EGF (Heparin Binding-EGF)¹⁰⁵.

ADAM	Other names	Proteinase-type (P) or non-proteinase type (NP) and splice variants (isoforms)	Potential functions	Substrates
ADAM1	PH-30 α , Fertilin- α	Pseudogene	ND	Unknown
ADAM2	PH-30 β , Fertilin- β	NP	ND	Sperm/egg binding /fusion
ADAM3	Cyritestin, tMDC, CYRN	Pseudogene	ND	Unknown
ADAM5	tMDC II	Pseudogene	ND	Unknown
ADAM6	tMDC IV	Pseudogene	ND	Unknown
ADAM7	EAP I, GP-83	NP	ND	Unknown
ADAM8	MS2 (CD156)	P	Sheddase, neutrophil infiltration	CD23, proTNF α , RANKL
ADAM9	MDC9, MCMP, Meltrin- γ	P, Secreted form	Sheddase, cell migration	ProHB-EGF, TNF-p75 receptor, APP, fibronectin, gelatin,
ADAM10	MDAM, Kuzbanian	P	Sheddase, development, angiogenesis	ProTNF- α , collagen IV, gelatin Myelin basic protein, Delta, APP, L1, CD44, proHB-EGF, Notch, Delta-like 1, Jagged, N-cadherin, E-cadherin, VE-cadherin, Ephrin A2, Ephrin A5 Fas-L, IL6R
ADAM11	MDC	NP, Secreted form	Tumor suppressor gene?	Unknown
ADAM12	Meltrin- α , MCMP, MLTN, MLTNA	P, Secreted form	Sheddase, myogenesis, adipogenesis	ProHB-EGF, IGFBP-3 and 5, pro-epiregulin collagen IV, gelatin, fibronectin
ADAM15	Metargidin, MDC15, AD56, CR II-7	P, Cytoplasmic form	Arteriosclerosis, angiogenesis	Collagen IV, gelatin
ADAM17	TACE, cSVP	P	Sheddase, heart development	ProTNF- α , proTGF- α , TNF-p75 receptor, ErbB4, TRANCE, proHB-EGF, proamphiregulin, proepiregulin, APP, IL6R, CD44, L-selectin
ADAM18	ADAM27, tMDC III	NP	ND	Unknown
ADAM19	Meltrin- β , FKSG34	P, N-terminal form	Sheddase, formation of neuron and cardiovascular organs	Proneuregulin, RANKL
ADAM20	P	P	Formation of sperm	Unknown
ADAM21	ADAM31	NP	ND	Unknown
ADAM22	MDC2	NP, Cytoplasmic form	ND	Unknown
ADAM23	MDC3	NP	ND	Unknown
ADAM28	e-MDC II, MDC-Lm, MDC-Ls	P, Secreted form	Growth factor metabolism	Myelin basic protein, IGFBP-3, CD23
ADAM29	svph 1	NP	ND	Unknown
ADAM30	svph 4	P	ND	Unknown
ADAM32	AJ131563	NP	ND	Unknown
ADAM33	NA	P	Genetically related to bronchial asthma	APP, KL-1, insulin B chain
ADAMDEC1	NA	P	ND	Unknown

Tableau VI : Listes des ADAMs et de leurs substrats⁷⁴

c. Les ADAMTSs

Les ADAMTSs sont une famille de métalloprotéases appartenant à la superfamille des metzincines et comptent vingt membres. Du fait qu'elles ne contiennent pas de domaine transmembranaire, ces métalloprotéases sont sécrétées et n'ont donc par extension que des substrats extracellulaires.

Toutes les enzymes de la famille des ADAMTSs partagent une organisation commune (**Figure 18**) : un *prodomaine*, un *site catalytique*, un *domaine disintégrine*, un ou des *domaine(s) thrombospondine*, un *domaine riche en cystéine* et un *domaine espaceur*. Le site catalytique est composé d'une séquence consensus HEBxHxBGBxH où les trois histidines permettent le recrutement de l'ion zinc. La région thrombospondine est unique dans la famille des métalloprotéases et interagit avec la MEC et les glycosaminoglycanes sulfatés, comme l'héparine et les aggrecanes^{106,107}. Elle joue donc un rôle important dans la localisation de ces protéases.

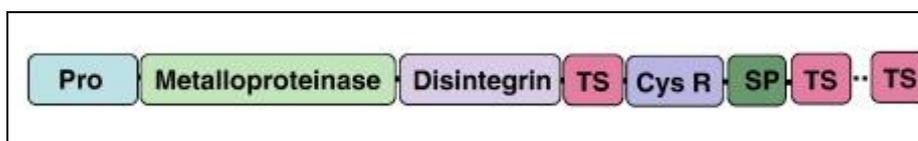


Figure 18 : Représentation schématique de la structure des ADAMTSs(Pro : prodomaine, Metalloprotease : site catalytique, Disintegrin : domaine disintégrine, TS : motif thrombospondine, Cys R : domaine riche en cystéine, SP : domaine espaceur)⁶⁹

A l'instar des MMPs et des ADAMs, les ADAMTSs ont de nombreux substrats (**Tableau VII**), et notamment des protéines de la MEC comme le versicane ou l'aggrecane. Les ADAMTS-4 et -5, également nommées aggrecanase 1 et 2, montrent l'activité aggrecanase la plus importante¹⁰⁸. Les ADAMTS-2, -3, et -14 participent quant à elles à la maturation du collagène en clivant l'extrémité N-terminale des procollagènes. ADAMTS-13 a été identifiée comme la protéase clivant une glycoprotéine multimérique, le facteur de Von Willebrand¹⁰⁹. Cette protéine joue un rôle essentiel dans le processus de coagulation en étant le transporteur du facteur VIII.

ADAMTS	Other names	Demonstration of proteinase activity	Functions and biochemical features
ADAMTS 1	C3-C5, METH1, KIAA1346	+	Binding to heparin, Presence of RRKR sequence, Digestion of aggrecan and versican
ADAMTS 2	Procollagen N-proteinase, hPCPNI, PCINP	+	Processing of procollagen I, II and III N-propeptides
ADAMTS 3	KIAA 0366	+	Processing of procollagen II N-propeptides
ADAMTS 4	KIAA0688, Aggrecanase-1, ADMP-1	+	Digestion of aggrecan, brevican and versican, fibronectin, decorin
ADAMTS 5	ADAMTS11, Aggrecanase-2, ADMP-2	+	Digestion of aggrecan, versican and brevican
ADAMTS 6	NA	ND	ND
ADAMTS 7	NA	+	Digestion of cartilage oligomeric protein
ADAMTS 8	METH-2	+	Digestion of aggrecan , Inhibition of angiogenesis
ADAMTS 9	KIAA1312	+	Digestion of aggrecan
ADAMTS 10	NA	ND	ND
ADAMTS 12	NA	ND	ND
ADAMTS 13	vWFCP, C9orf8	+	Cleavage of von Willebrand factor
ADAMTS 14	NA	+	Processing of procollagen I N-propeptides
ADAMTS 15	NA	+	Digestion of aggrecan
ADAMTS 16	+	ND	Digestion of aggrecan
ADAMTS 17	FLJ32769, LOC123271	ND	ND
ADAMTS 18	ADAMTS21, HGNC:16662	+	Digestion of aggrecan
ADAMTS 19	NA	ND	ND
ADAMTS 20	NA	+	Digestion of versican and (aggrecan)

NA, not applicable; ND, no data; +, positive.

Tableau VII : Listes des ADAMTSs et de leurs substrats ⁷⁴

d. Les TIMPs

Les TIMPs sont des protéines extracellulaires, à l'exception de TIMP-3 qui est localisé à la membrane. Elles forment un complexe réversible avec les métalloprotéases (avec un rapport stœchiométrique de 1 :1) inhibant ainsi leur activité enzymatique (**Tableau VIII**). En effet, l'extrémité C-terminale des TIMP interagit avec le domaine hémopexine des métalloprotéases pendant que l'extrémité N-terminale se fixe au site catalytique.

Les TIMPs ont été tout d'abord caractérisés comme des inhibiteurs spécifiques des MMPs. Ils agissent sur l'ensemble des MMPs avec des affinités variables, excepté TIMP-1 qui n'inhibe pas les MMPs membranaires. Ainsi, TIMP-1 inhibe plus fortement la MMP-3 et la MMP-7 que TIMP-2 et TIMP-3 ¹¹⁰. Cependant, l'action inhibitrice des TIMPs ne se cantonne pas aux MMPs. Cette activité régulatrice est retrouvée également pour les familles des ADAMs et des ADAMTSs. La première inhibition par un TIMP d'une métalloprotéase

non-MMP fut décrite en 1998 par une étude qui montrait la capacité de TIMP-3 à inhiber ADAM17 ¹¹¹. Parmi les quatre TIMPs, TIMP-3 a le spectre d'inhibition le plus large notamment en bloquant l'activité de la plupart des ADAMs et de certaines ADAMTSs ¹¹².

Indépendamment de leur activité inhibitrice, les TIMPs interviennent dans différentes activités biologiques telles que la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou encore l'apoptose. Ils peuvent également jouer un rôle dans l'activation des zymogènes des MMPs. TIMP-2, en interagissant avec la pro-MMP-2, participe à l'activation de la MMP-2 alors que TIMP-1 facilite l'activation de la MMP-9.

Property	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Glycosylation	Yes	No	Partial	No
pI	8.47	6.48	9.14	7.21
No. of residues ^a	184	194	188	194
M _r ^b	20,709	21,755	21,690	22,329
MMP inhibition	Weak for MMP-14 -16, -19, and -24	All	All	Most
Other MMP inhibition	ADAM10	ADAM12	ADAM10, 12, 17, 28 and 33; ADAMTS-1, -4, and -5, ADAMTS-2 (weak)	ADAM17 ^d and 28, ADAM33 (weak)
Pro-MMP interactions	Pro-MMP-9	Pro-MMP-2	Pro-MMP-9 and pro-MMP-2	Pro-MMP-2
Other partners	CD63 and LRP-1 (MMP-9 complex)	α ₃ β ₁ integrin LRP-1	EFEMP1, VEGFR2 and Angiotensin II receptor	
Apoptotic effects	Negative	Positive Negative	Positive	
Angiogenesis	Negative	Negative	Negative	Negative
Chromosomal location: human	X11p11.23–11.4	17q23–25	22q12.1–q13.2	3p25
Mouse	X A1.3	11 E2	10C1–D1	6 E3
Synapsin gene ^c	I	None	III	II
Genetic disorder			Sorsby fundus dystrophy	

Tableau VIII : Résumé des propriétés générales des quatre TIMPs humaines ⁸⁴

B. Le rôle des protéases dans la physiologie osseuse

Les protéases sont impliquées dans le remodelage des différents tissus de l'organisme et notamment du tissu osseux. En effet, grâce à leur activité catalytique, elles participent activement à la dégradation de la matrice osseuse. Les protéases activent également de nombreux facteurs ostéogéniques, permettant ainsi une régulation fine de l'ostéoformation et de l'ostéolyse. L'homéostasie du tissu osseux est donc en partie sous le contrôle de l'activité des protéases.

1) Protéases et matrice osseuse

a. La cathepsine K

Les ostéoclastes sont les acteurs majeurs de la résorption osseuse. Au sein des lacunes de résorption, ils sécrètent des protons via leur bordure en brosse. Cette acidification du milieu solubilise l'os minéralisé et rend ainsi la matrice organique, composée de 90% de collagène de type I, accessible aux protéases. Parmi ces protéases, la cathepsine K, sécrétée en grande quantité par les ostéoclastes, est localisée au niveau des lysosomes et de la bordure en brosse¹¹³. Sa localisation au sein de la lacune de résorption et sa capacité à dégrader le collagène de type I à pH acide font de la cathepsine K un acteur important de la résorption osseuse.

L'implication des protéases à cystéine dans la résorption osseuse induite par les ostéoclastes fut initialement démontrée par l'utilisation de leupeptine et E64, deux inhibiteurs des cathepsines. En effet, ces deux agents inhibent la résorption osseuse *in vitro*. L'importance de la cathepsine K fut observée dans la pycnodysostose, maladie génétique lysosomale caractérisée par une ostéosclérose du squelette, une petite taille et une fragilité osseuse, due à une mutation du gène de la cathepsine K¹¹⁴. Ce phénotype ostéopérotique est reproduit chez des souris déficientes pour la cathepsine K. A l'inverse, une surexpression de la cathepsine K aboutit chez la souris à un phénotype ostéoporotique¹¹⁵.

L'activité collagénique de la cathepsine K est liée à la formation d'un complexe spécifique de l'enzyme avec les chondroïtines sulfates. Ce complexe est un oligomère

constitué de cinq cathepsines K et de cinq chondroïtine sulfates qui peut dégrader les triples hélices de collagène. Sous sa forme monomérique, la cathepsine K clive uniquement des substrats non-collagéniques ¹¹⁶.

Plusieurs des facteurs induisant ou inhibant la formation et l'activation des ostéoclastes régulent l'expression de la cathepsine K. RANKL active la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) en se fixant sur son récepteur RANK, exprimé à la surface des ostéoclastes, ce qui induit la transcription du gène de la cathepsine K (**Figure 19**). Tous les agents stimulant (vitamine D, hormone parathyroïdienne) ou inhibant (œstrogènes, OPG) RANKL exercent donc indirectement un effet sur l'expression de la cathepsine K.

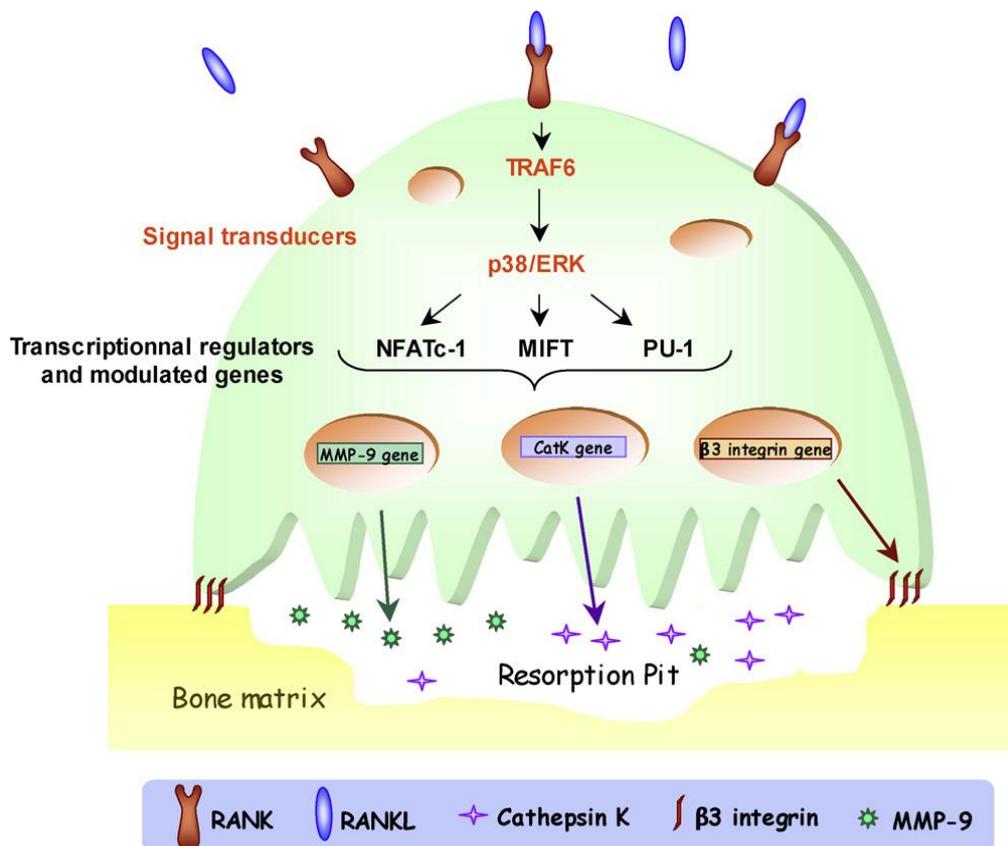


Figure 19 : Cascade de signalisation induite par la fixation de RANKL sur RANK dans les ostéoclastes ⁸⁴

b. Les métalloprotéases

Les métalloprotéases jouent un rôle important dans la physiologie osseuse. En effet, l'étude de souris KO pour des MMPs et de maladies génétiques humaines ont attiré l'attention sur leur importance au cours du développement squelettique ¹¹⁷. Ainsi, la MMP-13 participe à la dégradation du collagène au sein des lacunes de Howship à la fin du cycle de résorption. En effet, suite à l'action de la cathepsine K, le relargage de calcium augmente le pH de la lacune qui devient alors favorable à l'activité de la MMP-13. Ce processus est un pré-requis pour la déposition d'une nouvelle matrice osseuse.

Les MMPS sont également impliquées dans la migration des ostéoclastes. Un acteur majeur de ce processus est la MT1-MMP exprimée à la surface des ostéoclastes ¹¹⁸. Son activité collagénase participe au déplacement des ostéoclastes à travers la matrice de collagène. L'inactivation de la MT1-MMP aboutit à différents défauts du squelette, parmi lesquels un dimorphisme craniofacial, une ostéopénie, de l'arthrite, un nanisme, et une fibrose des tissus mous due à une réduction de l'activité collagénique essentielle au modelage des tissus conjonctifs squelettiques et extrasquelettiques ¹¹⁹. La MT1-MMP est donc impliquée dans le métabolisme et le modelage de la matrice, processus essentiels au développement des tissus osseux du squelette.

La MMP-9 joue également un rôle dans la résorption osseuse en facilitant la migration des cellules ostéoclastiques le long de la surface osseuse à travers la matrice riche en protéoglycanes avec cependant aucun effet sur l'activité ostéolytique ¹²⁰. Une mutation sur le gène de la MMP-9 aboutit à un défaut très spécifique de la formation de l'os endochondral. Des souris avec ce défaut montrent une hypertrophie du cartilage des zones de croissance squelettique ¹²¹.

ADAMTS-1 est exprimée spécifiquement par les ostéoblastes différenciés. Cette protéine multifonctionnelle est impliquée dans la formation de nodules minéralisés et la formation osseuse ¹²². L'expression d'ADAMTS-1 est induite par des agents ostéotropiques tels que la PTH et PTHrP suggérant une implication de cette protéase dans l'initiation du processus de minéralisation ¹²³. De plus, ADAMTS-1 pourrait contribuer à la prolifération ostéoblastique en dégradant la matrice collagénique, libérant ainsi des facteurs de croissance tels que le TGF- β ¹²⁴.

Parmi les sept aggrecanases, ADAMTS-4 est principalement exprimé au sein du cartilage ostéoarthritique. ADAMTS-4 pourrait donc jouer un rôle important dans la dégradation de l'aggrecane de ce cartilage ¹²⁵. L'utilisation de siRNAs inhibant son expression a montré une diminution de la dégradation de l'aggrecane au sein de ce cartilage. Une observation similaire a été faite en inhibant l'expression d'une autre aggrecanase, ADAMTS-5 ¹²⁶. ADAMTS-4 et ADAMTS-5 contribuent donc aux dommages structurels caractéristiques des ostéoarthrites.

La régulation par les ADAMs de l'activité des intégrines joue un rôle dans l'ostéoclastogenèse. En effet, les intégrines sont des récepteurs matriciels qui transmettent des signaux venant de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule. Les ostéoclastes expriment très fortement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui régule l'activité ostéolytique. De plus, Rao *et al.* ont montré que l'intégrine $\alpha_9\beta_1$ contrôlait la formation et la fonction des ostéoclastes ¹²⁷. Certaines ADAMs, qui possèdent un domaine de liaison aux intégrines, régulent leur activité. Par exemple, l'inhibition ou la surexpression d'ADAM8 au sein des progéniteurs ostéoclastiques augmente la maturation des ostéoclastes. Cette métalloprotéase pourrait favoriser donc la destruction osseuse dans des cas d'arthrite rhumatoïde ¹²⁸. L'observation de l'interaction d'ADAM8 avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble suggérer que ces deux protéines jouent un rôle commun dans l'ostéoclastogenèse, en particulier au cours de la maturation finale et de l'activité ostéolytique. Enfin, l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ exprimée par les ostéoblastes lie ADAM9, ce qui induit la production d'IL-6, une cytokine impliquée dans l'ostéoclastogenèse ¹²⁹.

2) Protéases, facteurs de croissance et cytokines

Outre leur capacité à dégrader les composants de la MEC, les métalloprotéases ont pour substrats différents facteurs impliqués dans la physiologie osseuse (**Figure 20**).

RANKL est une glycoprotéine transmembranaire qui joue un rôle essentiel dans l'ostéoclastogenèse. Son domaine extracellulaire peut être clivé afin de produire du RANKL soluble. La MMP-7, la cathepsine G et ADAM17 ont été décrits comme clivant RANKL ^{130,131,132}. Cette libération de RANKL est également observée après un clivage protéolytique de la MT1-MMP. Ainsi, l'inhibition au sein d'ostéoblastes murins de cette MMP provoque

une accumulation de RANKL à la surface de ces cellules. Ceci est associée *in vitro* (par des cocultures avec des macrophages) et *in vivo* (chez des souris déficientes pour la MT1-MMP) à l'augmentation de l'ostéoclastogenèse. Ainsi, le processus de clivage du RANKL semble agir comme un processus de régulation de l'ostéoclastogenèse locale ¹³³.

L'IL-1 est un acteur majeur de la physiologie osseuse. Il stimule la résorption tout en inhibant la formation osseuse ¹³⁴. Cependant, l'IL-1 est produit sous forme biologiquement inactive et doit donc être activé par la MMP-9 ¹³⁵ pour pouvoir se fixer à son récepteur, IL-1R. De plus, l'IL-1RII soluble, un antagoniste de l'IL-1, est également généré par un clivage protéolytique. Deux protéases ont été identifiées comme ayant l'IL-1RII pour substrat, ADAM-17 et ARTS-1 ¹³⁶.

L'IL-6 et sIL-6R (soluble IL-6 Receptor) sont impliqués dans le remodelage osseux. En effet, les ostéoblastes expriment à leur surface IL-6R qui devient actif après un clivage protéolytique, notamment par les métalloprotéases ADAM17 et ARTS-1. sIL-6R se lie ensuite à l'IL-6 et le couple peut alors activer le récepteur gp130, induisant la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. ADAM17 et ARTS-1 ont donc un effet indirect sur l'ostéoclastogenèse ¹³⁷.

ADAM17 est également impliqué dans le clivage de ligands d'EGFR (EGF Receptor), tels que l'amphiréguline, HB-EGF et l'épiréguline ¹³⁸. La signalisation d'EGFR est impliquée dans le recrutement et la formation des ostéoclastes. EGFR régule également les voies de signalisation dépendantes de RANKL en interagissant directement avec RANK, suggérant ainsi qu'EGFR joue un rôle dans la différenciation des ostéoclastes induite par RANKL ¹³⁹.

Le TNF α est présent sous forme inactive à la membrane cellulaire et nécessite un clivage protéolytique pour être actif. Ce clivage est notamment assuré par les métalloprotéases ADAM9, ADAM10 et ADAM17 ¹⁴⁰. Le TNF α actif agit sur les précurseurs ostéoclastiques en potentialisant l'activité ostéoclastogénique de RANKL ¹⁴¹ tout en inhibant la différenciation ostéoblastique ¹⁴². De plus, ADAM17 et ARTS-1 [Aminopeptidase Regulator of TNFR1 (TNF Receptor 1) Shedding] régulent le niveau des récepteurs TNFR1 et TNFR2 en les clivant, générant ainsi des antagonistes solubles ^{143,136}.

Le fait d'avoir pour substrat TNFR1, IL-6R et IL-1RII permet à ARTS-1 de jouer donc un rôle important dans la physiologie osseuse mais également dans la modulation de la réponse inflammatoire. Il est en effet capable à la fois d'activer l'ostéoclastogenèse mais également de mettre en place les mécanismes de régulation/inhibition de ce processus. Il module ainsi finement l'activité ostéoclastique et le redémarrage de la différenciation ostéoblastique.

ADAM9, qui est produite par les ostéoblastes, clive IGFBP-5 (Insulin like Growth Factor Binding Protein-5) et régule positivement la concentration et l'activité de ce facteur au sein du microenvironnement osseux ¹⁴⁴. IGFBP-5 est un important régulateur de la formation osseuse notamment en interférant avec l'action des IGFs. Il inhibe la différenciation ostéoblastique et donc la croissance osseuse ¹⁴⁵. Ainsi, ADAM9 régule indirectement la formation osseuse.

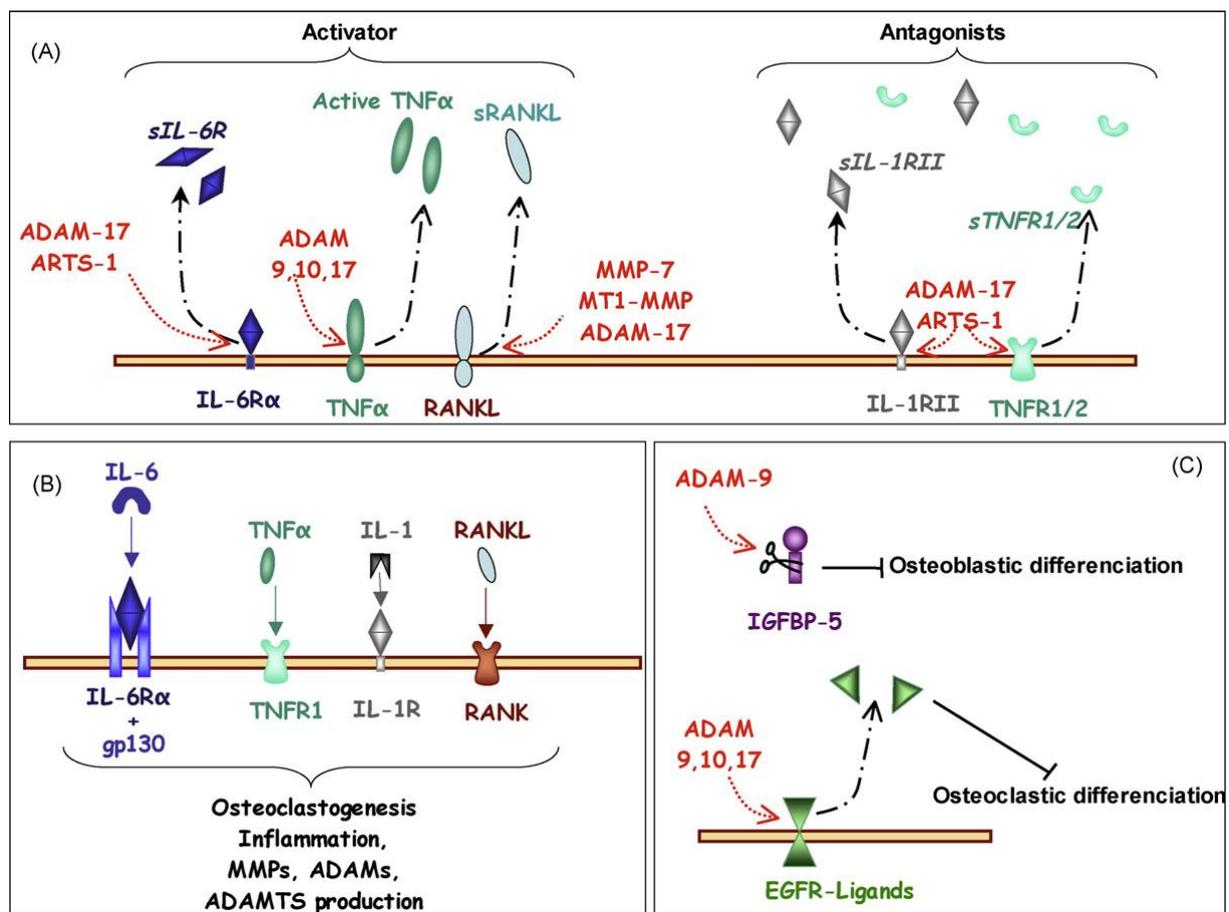


Figure 20 : Régulation du remodelage osseux par l'activité protéolytique ¹⁴⁶

C. Le rôle des métalloprotéases lors du développement tumoral

Les protéases, et plus particulièrement les MPs, jouent un rôle pivot dans la tumorigénèse. De nombreuses études ont donc été menées ces dernières décennies afin de mieux définir l'action des métalloprotéases dans les processus oncogéniques de différents types tumoraux. Du fait notamment de la multiplicité des substrats, les MPs interviennent dans un grand nombre de processus favorisant la croissance tumorale tel que l'invasion, le processus métastatique, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, la migration, l'inflammation et l'angiogenèse (**Figure 21**). Par ailleurs, un fort taux d'expression des MPs étant un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers, celles-ci représentent donc des cibles thérapeutiques potentielles.

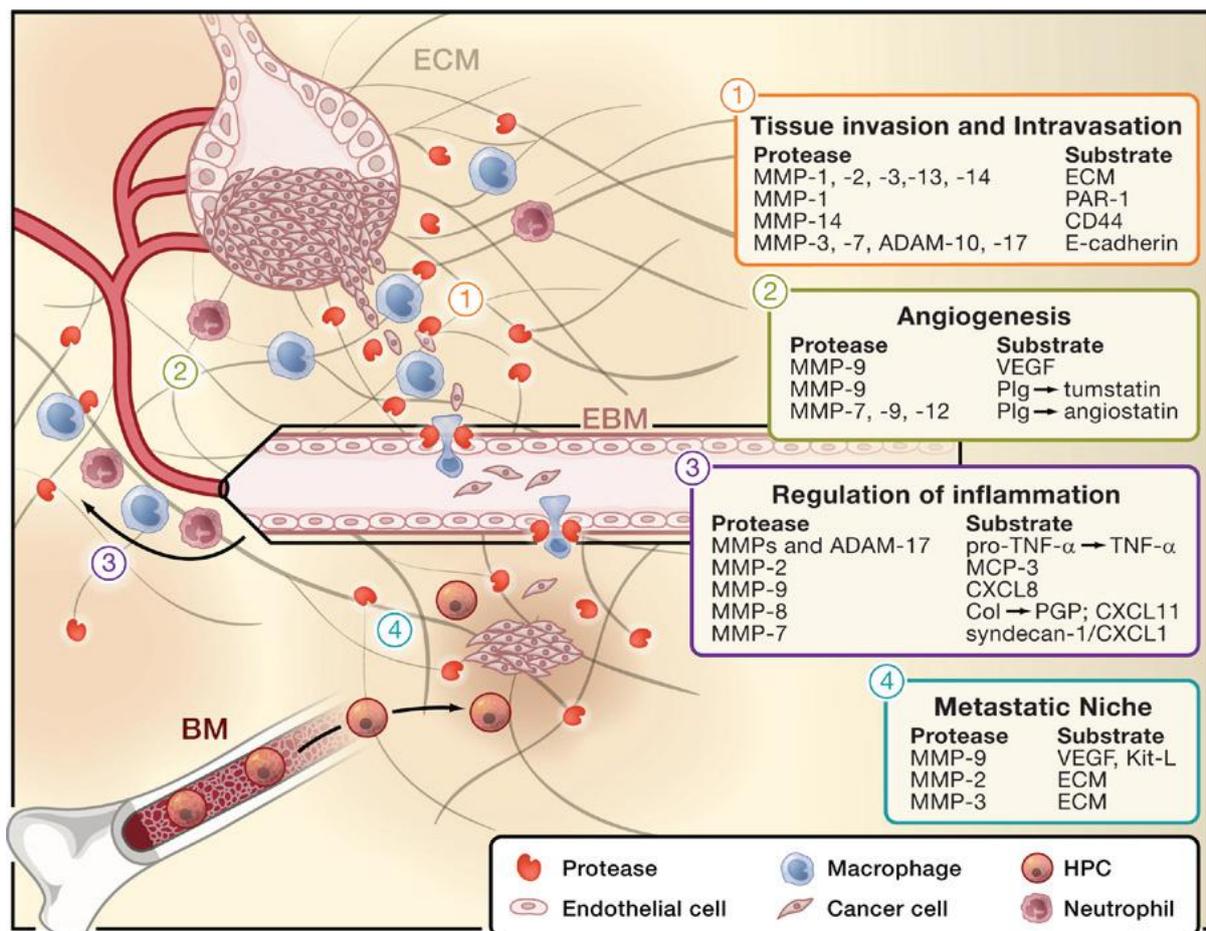


Figure 21 : Les différentes fonctions des MPs au sein du microenvironnement tumoral ¹¹⁸

1) La prolifération tumorale

Il existe différents mécanismes par lesquelles les MPs contribuent à la prolifération des cellules tumorales. Elles peuvent notamment moduler la biodisponibilité de facteurs de croissance et la fonction de récepteurs membranaires.

Un grand nombre de MMPs et d'ADAMs clivent des précurseurs de facteurs de croissance exprimés à la membrane, comme les IGFs et les EGFR ligands. Par exemple, certaines MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11 et -19) et ADAM12 libèrent des protéines, telles que les IGFBPs (IGF Binding Protein). Ces dernières se fixent à l'IGF, régulant ainsi la biodisponibilité du facteur de croissance^{147,148}. Durant la croissance tumorale, les MMP-3, -7 et les ADAM10 et 17 libèrent activement des ligands d'EGFR, comme HB-EGF, TGF α et l'amphiregulin^{104,149}, favorisant ainsi la prolifération cellulaire.

2) L'angiogenèse

L'angiogenèse est étroitement associée à la croissance continue de la masse tumorale et aux mécanismes métastatiques. Cette néovascularisation est en effet indispensable au maintien des apports en nutriments et en oxygène nécessaire à la prolifération des cellules. L'angiogenèse est donc un processus pro-tumoral essentiel.

Les MPs montrent un double-rôle dans la vascularisation tumorale et peuvent être des acteurs pro- ou anti-angiogéniques. Les acteurs-clés parmi la famille des MMPs sont principalement les MMP-2, -9 et -14, et dans une moindre mesure les MMP-1 et -7¹⁵⁰.

La dégradation de la MEC par les métalloprotéases libère des facteurs pro-angiogéniques, notamment le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)^{151,152}. Ainsi, la MMP-9, exprimée par les cellules inflammatoires, est le principal régulateur de la biodisponibilité du VEGF. Elle le libère permettant sa fixation sur son récepteur VEGFR2 (VEGF Receptor 2) exprimé à la surface des cellules endothéliales, et active alors leur migration et leur prolifération¹⁵². ADAM17 a également été décrite comme un facteur pro-angiogénique. Une inhibition *in vitro* de l'expression d'ADAM17 provoque une diminution de la prolifération et de l'invasion des cellules endothéliales¹⁵³. De plus, dans un modèle murin, une délétion d'ADAM17 aboutit à

une néovascularisation pathologique et réduit la croissance de cellules tumorales injectées
154

La dégradation des composants de la MEC par les MPs peut aussi générer des fragments possédant une activité inhibitrice de l'angiogenèse ¹⁵⁵. Ainsi, l'endostatine est produite via le clivage du collagène de type XVIII par les MMP-3, -7, -9, -13, et -20 ¹⁵⁶. De même, la dégradation du collagène de type IV par la MMP-9 libère le domaine monomérique NC1, également appelé tumstatine. Enfin, le clivage du plasminogène par les MMP-2, -9 et -12 peut produire une quantité significative d'angiostatine ^{157,158}. La libération de ces trois facteurs permet donc aux MMPs d'exercer une activité anti-angiogénique.

En fonction du moment où elles sont exprimées et de la disponibilité des substrats, les MPs peuvent donc induire ou inhiber la formation de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur et donc jouer un rôle potentiellement pro- ou anti-tumoral.

3) L'inflammation

Un contexte inflammatoire est favorable au développement tumoral et certaines métalloprotéases peuvent favoriser ce processus. En effet, les MPs activent des cytokines pro-inflammatoires mais peuvent également diriger le recrutement de cellules impliquées dans l'inflammation via le relargage de chimiokines.

Une des plus importantes cytokines pro-inflammatoire est le TNF- α , qui est exprimé sous forme de précurseur à la surface d'une grande variété de cellules, dont les macrophages et les lymphocytes T mais également par les cellules tumorales. La conversion du pro-TNF α en forme cytokinique soluble requiert le clivage protéolytique par ADAM17 mais également par différentes MMPs (MMP-1, -2, -3, -9, -12, -14, -15 et -17) ¹⁵⁹. Le TNF- α actif favorise alors le processus inflammatoire. De plus, il peut également induire directement la survie des cellules cancéreuses et ce de manière NF- κ B-dépendante ¹⁶⁰.

Les MMPs dirigent aussi le recrutement des leucocytes (comme les neutrophiles, lymphocytes Th1, cellules NK) qui sont des composants essentiels de l'inflammation associée à la tumeur. En effet, les MMPs peuvent libérer différentes chimiokines qui vont alors attirer ces cellules sur le site tumoral. Par exemple, CCL8 [Chemokine (C-C motif)

Ligand], une chimiokine notamment impliquée dans le recrutement des monocytes, des lymphocytes T et des cellules NK, est clivée par la MMP-1 et la MMP-3. La forme mature ainsi produite va pouvoir se fixer sur différents récepteurs aux chimiokines tels que CCR1 (C-C Chemokine Receptor), CCR2B et CCR5 de ces cellules. D'autres MMPs, telles que les MMP-8 et-9, modulent la bioactivité de CXCL11 [Chemokine (C-X-C motif) Ligand] qui se lie au CXCR3 (C-X-C Chemokine Receptor) exprimé par les lymphocytes Th1¹⁶¹. Enfin, les neutrophiles vont être attirés vers le site tumoral par l'interaction du complexe CXCL1-syndecan-1 avec le récepteur CXCR2. Ce complexe est libéré par la MMP-7 qui clive le syndecan-1 membranaire¹⁶².

Outre l'activation par les MMPs d'un chimiotactisme dépendant de la libération des chimiokines, ces protéases participent aussi au relargage de fragments peptidiques issus de la MEC ayant une activité analogue. Ainsi, la MMP-12, une élastase produite par les macrophages, produit des peptides en dégradant l'élastine. Ces peptides attirent les granulocytes neutrophiles¹⁶³. Ces neutrophiles peuvent aussi être recrutés au niveau des sites d'inflammation via un tripeptide Pro-Gly-Pro (PGP), également issu de la dégradation de la MEC. Ce tripeptide, généré par l'activité protéolytique de la MMP-8, active des récepteurs à chimiokines CXC.

4) Le processus invasif et métastatique

La dissémination métastatique des cellules tumorales aboutit au développement de tumeurs secondaires responsable dans une grande majorité des cancers du décès des patients. Le processus métastatique implique l'invasion de la tumeur au sein du tissu périphérique, l'intravasation des cellules cancéreuses au sein des vaisseaux sanguins et enfin l'extravasation vers un nouvel organe (**Figure 22**). Le processus invasif et métastatique nécessite donc le passage des cellules à travers des barrières physiques, comme la membrane basale de l'endothélium ou encore la MEC. Les MPs, qu'elles soient produites par les cellules cancéreuses ou par les cellules stromales (neutrophiles, macrophages, cellules endothéliales), interviennent à chacune des étapes de la propagation tumorale.

La première barrière à franchir lors du processus métastatique est la matrice extracellulaire. Les MPs ont un rôle lors de cette étape du fait de leur capacité à dégrader les protéines de la MEC. La MMP-14 (MT1-MMP), via son activité protéolytique

péricellulaire, induit un remodelage important des tissus, notamment en dégradant les fibres de collagène. Elle a été décrite comme un acteur essentiel de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses ^{164,165}. Les gélatinases, MMP-2 et -9, dégradent différentes macromolécules de la MEC et sont donc également fortement impliqués dans ce processus ¹⁶⁶. Les MPs d'origine stromale peuvent également intervenir dans la régulation de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses. Par exemple, dans un modèle de carcinome mammaire, PAR-1 (Proteinase-Activated Receptors 1), un récepteur couplé aux protéines G, est activé par la MMP-1 produite par les fibroblastes infiltrant la tumeur. PAR-1 va alors pouvoir favoriser la migration cellulaire et la capacité invasive de la tumeur ¹⁶⁷.

Les MPs induisent également la perte d'adhésion cellulaire en dégradant des protéines de surface, facilitant ainsi la migration cellulaire. La MT1-MMP clive CD44, une glycoprotéine de surface impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaire mais également dans le contact cellule-cellule. L'E-cadhérine est quant à elle la cible des MMP-3 et -7 ainsi que des ADAM-10 et -17. Le clivage de l'E-cadhérine provoque non seulement une perte d'adhérence des cellules mais également une augmentation de la prolifération cellulaire ¹⁶⁸.

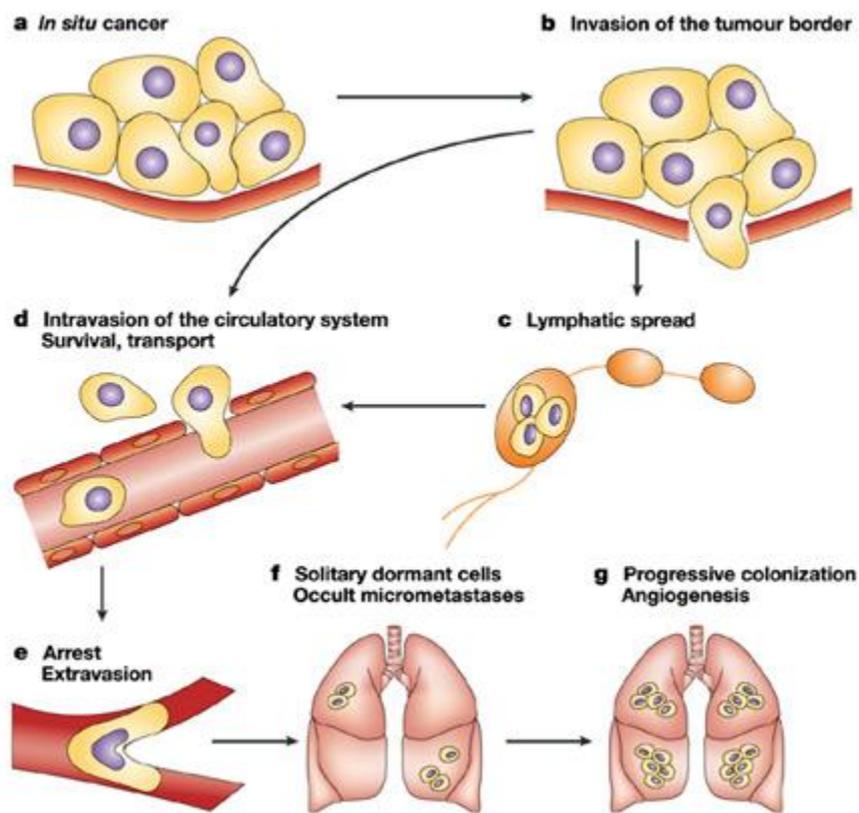


Figure 22 : Schéma du processus métastatique ¹⁰⁷

5) Les métalloprotéases comme cible thérapeutique

Du fait du rôle pivot des MMPs et des ADAMs à différentes étapes de la progression tumorale, l'industrie pharmaceutique a investi durant les vingt dernières années dans le développement d'agents thérapeutiques ciblant ces MPs. De nombreux MMPIs (MMP Inhibitor) ont donc été créés dans le but de contrôler leur synthèse, leur sécrétion, leur activation et leur activité enzymatique. Différentes stratégies ont donc été développées et testées dans des essais cliniques de phase I, II et III.

La première génération de MMPIs concerne les *peptidomimétiques*. Ils miment la structure du collagène reconnu par le site catalytique des MMPs, fonctionnant alors comme des inhibiteurs compétitifs ¹⁶⁹. Le premier peptidomimétique fut le batimastat (BB-94), un dérivé hydroxamate avec une faible solubilité et un large spectre d'inhibition ¹⁷⁰. Afin de surmonter ce problème de solubilité, le marimastat, un autre dérivé hydroxamate, a été développé. Cependant, ces deux MMPIs ont été associés à des troubles musculosquelettiques, probablement dus à un spectre d'inhibition trop large ^{171,172}.

Afin d'améliorer ces problèmes de spécificité, des *MMPIs non-peptidomimétiques* ont été synthétisés sur la base des connaissances de la structure 3D des sites actifs. Cette classe de MMPIs est composée du BAY12-9566, du prinomastat (AG3340), du BMS-275291 et du CGS27023A ¹⁷³. Malheureusement, des essais cliniques ont également montrés des effets secondaires parmi lesquels de nouveau des troubles musculosquelettiques ^{174,175,176}.

Une autre génération de MMPIs concerne les *dérivés de la tétracycline*, dépourvus de leur effet antibiotique, inhibant à la fois l'activité enzymatique et la synthèse des MMPs en bloquant la transcription. Il s'agit du metastat (COL-3), de la minocycline et de la doxycycline. Cette dernière est la seule MMPI autorisé par la Food and Drug Administration pour la prévention de la parodontite. Le metastat a montré un potentiel thérapeutique intéressant lors d'un essai clinique de phase II contre le sarcome de Kaposi ¹⁷⁷. Cette molécule a montré une activité anti-tumorale et permet de diminuer le taux de MMP-2 et de MMP-9 sanguins. De plus, le metastat est bien toléré par les patients.

Afin de limiter les effets secondaires, des inhibiteurs spécifiques de métalloprotéases ont été développés. Ainsi, un nouvel inhibiteur, *SB-3CT*, a été conçu dans le but de cibler

spécifiquement le site catalytique des gélatinases (les MMP-2 et -9) inhibant ainsi toute activité enzymatique. Une étude préclinique a montré la capacité du SB-3CT à réduire le développement de métastases hépatiques et à augmenter la survie des animaux dans un modèle murin ¹⁷⁸. Des inhibiteurs spécifiques des ADAMs ont également été créés, comme l'INCB3619 et l'INCB7839 qui ciblent les ADAM10 et 17 ¹⁷⁹. Des études précliniques ont montré la capacité de l'INCB3619 à inhiber la croissance tumorale, notamment lorsqu'il était associé à un inhibiteur de l'EGFR, le gefitinib ¹⁸⁰. L'INCB7839 a aussi montré des propriétés anti-tumorales intéressantes dans un modèle de cancer du sein ¹⁸¹ et a été testé dans plusieurs essais cliniques ¹⁵⁴. Des résultats préliminaires suggèrent que cette drogue est bien tolérée par les patients sans effets secondaires significatifs. Il apparaît que l'association de cet inhibiteur avec le trastuzumab, un anticorps monoclonal recombinant qui agit sur les récepteurs HER2/neu, augmente l'efficacité du traitement. Cependant, un essai clinique de phase III est nécessaire afin de confirmer ce résultat.

Un certain nombre d'agents thérapeutiques existants ont montré des effets sur l'activité des MPs. Ils présentent l'avantage d'être déjà présent sur le marché et donc d'avoir des posologies et des effets secondaires connus. C'est le cas par exemple des *biphosphonates*, qui bloquent la voie du mévalonate. Outre l'inhibition de l'activité ostéoclastique et de la résorption osseuse, les biphosphonates diminuent l'activité enzymatique de certaines MMPs ¹⁸². Ils ont aussi montré des effets bénéfiques sur la balance MMPs/TIMPS dans des cellules cancéreuses du sein. Les biphosphonates inhibent en effet l'expression de MMPs tout en augmentant celle des TIMPS. Un autre agent montrant un effet inhibiteur des MMPs est le letrozole, un inhibiteur de l'aromatase utilisé comme traitement adjuvant des cancers du sein hormono-dépendant chez la femme ménopausée. En effet, les gélatinases relarguées par les cellules cancéreuses du sein sont fortement inhibées par le letrozole de manière dose-dépendante, limitant ainsi le potentiel métastatique de ces cellules ¹⁸³. Il reste cependant à valider l'utilisation de ces agents dans le cadre de pathologies tumorales chez l'homme.

Enfin, les TIMPs, les inhibiteurs naturels des MPs, furent également utilisés comme agents thérapeutiques. Bien qu'ils aient montré une certaine efficacité dans des modèles expérimentaux, les TIMPs exercent aussi des effets pro-tumoraux indépendamment de leur action sur les MMPs ¹⁸⁴. Par exemple, TIMP-1 a montré des effets pro-prolifératifs, et TIMP-3, qui est sécrété par des chondrocytes et des cellules de chondrosarcomes, pourrait

avoir un effet anti-apoptotique ¹⁸⁵. D'autres composés naturels inhibant les MPs ont été testés comme le neovastat, extrait du cartilage de requin ou la génistéine. Le neovastat a montré des effets anti-angiogénique et anti-métastatique en inhibant non seulement l'activité enzymatique des MMPs mais aussi le VEGF ¹⁸⁶. La génistéine, un isoflavone structurellement proche de l'œstradiol, a des propriétés anti-tumorale et anti-invasive en interférant sur le ratio MMPs/TIMPs ^{187,188}.

Les MPs ont un rôle clé et complexe dans la progression tumorale. Cependant, dans la plupart des cas, les agents ciblant les MPs ont montré un effet thérapeutique faible lors des essais cliniques, malgré des résultats prometteurs lors des phases précliniques ¹⁸⁹. Un des problèmes majeurs est la spécificité des MMPIs. En effet, la plupart de ces agents ont un spectre d'inhibition large avec pour conséquence d'agir sur certaines MMPs qui permettent la libération de facteurs anti-tumoraux. De plus, les effets secondaires sont nombreux comme le syndrome musculosquelettique. Un des challenges pour le futur est de développer des MMPIs très spécifiques, par exemple des anticorps monoclonaux, évitant ainsi les réactions croisées. Un anticorps de très haute affinité et très spécifique de la MMP-14, le DX-2400, a déjà été conçu et a montré des propriétés anti-tumorales ^{190,191}. Enfin, la complexité moléculaire des différents types de cancer suggère une utilisation des MMPIs en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques afin d'accroître l'efficacité du traitement.

D. Le rôle des protéases dans le développement tumoral en site osseux

Les cellules tumorales produisent des protéases qui détruisent les barrières matricielles, permettant ainsi l'invasion au sein des tissus conjonctifs environnant et la formation de métastases. Leur expression et leur activité sont augmentées dans la plupart des types de cancer humain, et sont corrélées avec le grade de la tumeur, le potentiel métastatique et la survie. Les protéases sont donc des acteurs importants de la progression tumorale. Dans le contexte tumoral en site osseux, les protéases ont également été décrites comme étant pro-tumorales en favorisant les différents processus décrits précédemment mais également en intervenant dans la mise en place du cercle vicieux entre croissance tumorale et dégradation osseuse.

1) Dans l'ostéolyse associée à la tumeur

Les protéases jouent un rôle dans le remodelage osseux en favorisant ou en inhibant la formation et la dégradation osseuse. Dans un contexte tumoral, les protéases pourraient avoir un effet sur le remodelage osseux et être de ce fait impliquées dans l'ostéolyse associée au développement tumoral en site osseux (**Figure 23**).

L'identification des protéases impliquées dans l'ostéolyse paratumorale est donc un enjeu important. Dans un modèle métastatique de cancer prostatique, une surexpression de la cathepsine K et de la MMP-7 a été observée à l'interface os-tumeur. La MMP-7, produite par les ostéoclastes au niveau de cette interface, clive RANKL en une forme soluble qui va alors activer l'ostéoclastogenèse. Des souris déficientes pour la MMP-7 montrent un ralentissement de la progression tumorale et une diminution de RANKL soluble sérique¹³⁰. Une étude similaire sur un modèle murin mimant des métastases ostéolytiques issues de cancer du sein a permis d'observer une surexpression de la cathepsine G à l'interface os-tumeur. Cette protéase, produite par les ostéoclastes, clive également RANKL¹³¹. RANKL soluble est également produit par le clivage protéolytique de la MMP-14 (ou MT1-MMP). Une inhibition de l'expression de la MMP-14 par des oligonucléotides anti-sens à l'interface os-tumeur entraîne une baisse significative du nombre d'ostéoclastes matures¹⁹². La MMP-7, la cathepsine G et la MMP-14 participent donc activement à l'ostéolyse associée à la tumeur, notamment via leur capacité à cliver RANKL membranaire.

Afin d'empêcher la mise en place du cercle vicieux qui s'installe entre phase de résorption osseuse et croissance tumorale, des études visant l'inhibition de l'expression et de l'activité de protéases ont été menées. La cathepsine K, qui est essentielle à la dégradation osseuse, semble être une bonne cible thérapeutique. Cette protéase à sérine est exprimée non seulement par les ostéoclastes, mais aussi par les cellules de cancer du sein qui métastasent à l'os. L'injection de CKI (Cathepsine K Inhibiteur) réduit la masse tumorale mais également la progression de lésions ostéolytiques¹⁹³. Ainsi, le CKI rend le microenvironnement osseux moins favorable à la croissance tumorale en inhibant la résorption osseuse. Une autre cible potentielle est la MMP-13. Une étude préclinique utilisant un inhibiteur chimique spécifique de la MMP-13 (Cmpd-1) a été menée dans un modèle de cancer du sein métastasant à l'os¹⁹⁴. Utilisé en traitement préventif, le Cmpd-1 réduit significativement la croissance

tumorale et prévient l'arrivée et la sévérité de lésions ostéolytiques. De plus, aucun effet secondaire n'a été observé, notamment sur le muscle squelettique.

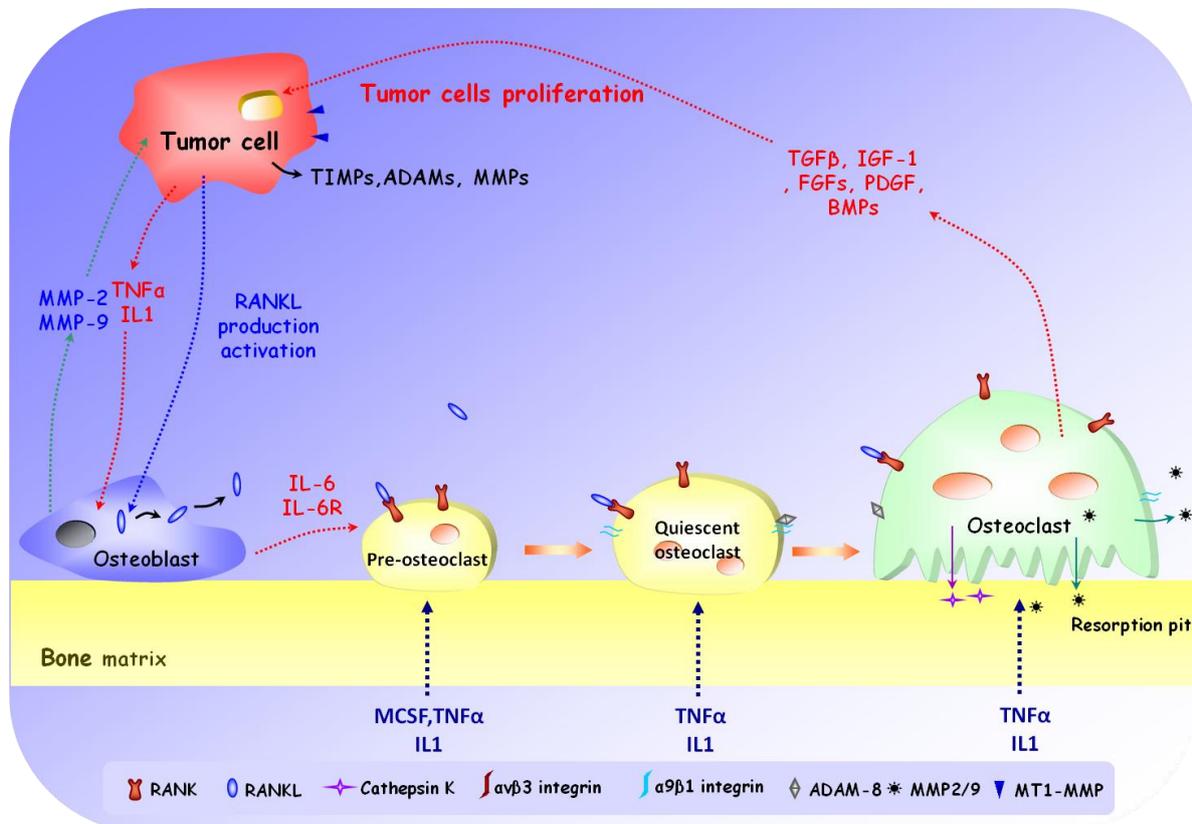


Figure 23 : Rôles des protéases dans la mise en place du cercle vicieux. Les MMP-2 et -9, produits par les ostéoblastes ou par les cellules cancéreuses, peuvent être recrutées à la membrane des cellules cancéreuses. Ce processus permet la progression tumorale à travers la dégradation de la MEC. Les cellules tumorales expriment également la MMP-13 qui facilite la prolifération cellulaire en dégradant la MEC. Ces cellules expriment également différents facteurs comme le TNFα et l'IL-1, qui sont libérés par un clivage protéolytique. Ces facteurs induisent l'ostéoclastogénèse en jouant sur les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les ostéoclastes matures expriment également des protéases, tels que la cathepsine K, qui dégradent la matrice osseuse. Enfin, l'ostéolyse libère des facteurs comme IGF-1 et le TGFβ, qui induisent la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.

2) Dans l'ostéosarcome

Le rôle des protéases dans le développement de l'ostéosarcome est encore mal connu. Cependant, à l'instar de nombreuses tumeurs malignes, les MMPs semblent être des facteurs importants de la progression des ostéosarcomes. Une étude utilisant deux inhibiteurs différents des MMPs a montrée une baisse de l'invasion des cellules d'ostéosarcome de rat suggérant ainsi que les MMPs sont bien impliquées dans l'agressivité des ostéosarcomes¹⁹⁵. De plus, RECK (Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs), un

inhibiteur membranaire des MMPs, est un facteur de bon pronostic dans l'ostéosarcome ¹⁹⁶. En effet, le taux de survie à 5 ans est plus élevé chez les patients atteints de tumeurs exprimant fortement RECK et son expression est également corrélée négativement avec la présence de métastases et le taux de récurrence.

A l'inverse, la MMP-9 a été identifiée comme un facteur favorable au développement des ostéosarcomes. En effet, une corrélation entre la MMP-9 et l'invasion a été observée dans des cellules ostéosarcomateuses de rat. De plus, des analyses immunohistochimiques de biopsies d'ostéosarcomes humaines suggèrent un rôle plus important de la MMP-9 que de la MMP-2 dans la progression tumorale ¹⁹⁷. En outre, parmi 55 patients atteints d'un ostéosarcome, le seul facteur fortement associé avec la survie à 5 ans est le statut immunohistologique de la MMP-9 dans les pièces d'exérèse ¹⁹⁸. Cette observation suggère qu'une forte expression de la MMP-9 serait un facteur de mauvais pronostic. La MMP-13 a également été identifiée comme un facteur de faible pronostic. Chez 36 patients ayant subi une chimiothérapie néoadjuvante, la résection des tumeurs et de la chimiothérapie adjuvante post-opératoire, l'expression accrue de la MMP-13 conduit à un facteur pronostique négatif significatif pour la survie des patients ¹⁹⁹. De plus, une baisse de l'expression du miR-143, un inhibiteur de l'expression de la MMP-13, est en corrélation avec la formation de métastases pulmonaires de cellules d'ostéosarcome humaines. Cet effet est dû à une induction de l'invasion cellulaire, probablement via une augmentation de l'expression de la MMP-13.

L'ensemble de ces données suggèrent un rôle pro-tumoral des MMPs dans l'ostéosarcome. Cependant, les mécanismes d'action restent entièrement à définir.

Objectifs de la thèse :

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre entre deux mécanismes: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives. Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie ont largement contribué à la progression du taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients (dont la médiane d'âge est de 18 ans) ainsi que le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, font qu'il est nécessaire de définir de nouvelles cibles moléculaires et ainsi de nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes.

Le développement d'un ostéosarcome a pour conséquence d'affecter rapidement la balance entre l'apposition et la résorption osseuse. En effet, dans la plupart des tumeurs osseuses primitives (ostéosarcome et sarcome d'Ewing), la malignité de la tumeur se caractérise le plus souvent par une ostéolyse associée au développement tumoral. Lors de cette résorption, des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire sont libérés. Les produits de dégradation de la matrice stimulent alors la prolifération tumorale maligne et un cercle vicieux s'établit entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse.

Les protéases jouent un rôle à la fois dans la progression de nombreuses tumeurs malignes mais également dans le processus d'ostéolyse. Elles pourraient donc jouer un rôle essentiel dans la mise en place du cercle du vicieux qui s'installe entre ces deux processus au cours du développement tumoral en site osseux. L'identification et la mise en évidence du rôle de ces protéases revêt donc un intérêt particulier dans l'ostéosarcome et pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce travail de thèse a donc pour objectif :

- *D'identifier une ou plusieurs protéases fortement exprimées par les tumeurs présentant une ostéolyse paratumorale importante*
- *D'étudier l'influence des protéases identifiées sur la progression tumorale et sur le phénotype osseux, particulièrement sur l'ostéolyse associée à la tumeur*
- *D'identifier des facteurs impliqués dans le remodelage osseux régulant l'expression et l'action de ces protéases*

1^{ère} PARTIE :

*Influence d'ADAM12 dans le
développement de l'ostéosarcome et
son caractère ostéolytique*

INTRODUCTION

ADAM12 appartient au groupe des ADAMs qui constitue avec les ADAMTSs et les SVMPs (Snake Venom Metalloproteases) la famille des adamalysines. ADAM12 a été identifiée en 1995 chez la souris comme une protéine transmembranaire impliquée dans la fusion de cellules musculaires²⁰⁰ et fut initialement nommée meltrin α . Le gène humain *ADAM12* a été localisé sur le locus 10q26.3 du chromosome 10²⁰¹.

A. Structure et fonctions d'ADAM12

1) Structure

Chez la souris, seule une forme membranaire d'ADAM12 est produite tandis que deux formes sont produites chez l'homme, une isoforme membranaire ADAM12-L et une isoforme soluble ADAM12-S (**Figure 24**). ADAM12-L a une structure commune à toutes les ADAMs avec un prodomaine, un domaine désintégrine, domaine riche en cystéine, un domaine de type « EGF », un domaine transmembranaire (permettant sa localisation membranaire) et enfin la queue cytoplasmique. L'isoforme ADAM12-S diffère de la forme membranaire par l'absence du domaine transmembranaire et de la queue intracytoplasmique.

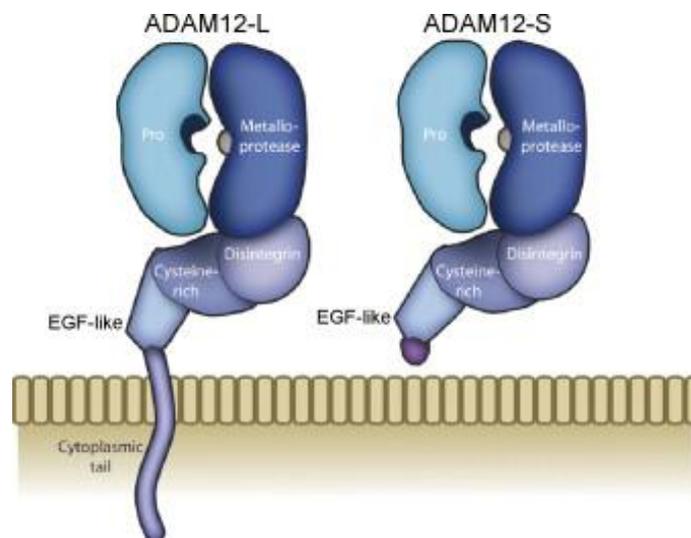


Figure 24 : Représentation schématique des isoformes humaines d'ADAM12¹⁶⁴

ADAM12 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et sa maturation se fait au sein de l'appareil de Golgi. Puis, un peptide signal permet la translocation d'ADAM12 à la membrane. Le prodomaine est ensuite clivé par une convertase furine durant le transport transgolgien, ADAM12 est donc active une fois ancrée à la membrane^{202,203}.

2) L'activité protéasique d'ADAM12

A l'instar de la plupart des ADAMs, ADAM12 a une activité protéasique via son site actif. Ce dernier est composé en partie d'une séquence consensus *HEXXHXXGXXH* caractéristique des metzincines. Les histidines permettent la liaison d'un ion zinc alors que l'acide glutamique coordonne une molécule d'eau essentielle à l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

ADAM12 a pour substrat différents types de protéines reconnues par son site actif. Leur identification est cependant complexe et les résultats sont souvent variables selon les conditions expérimentales. Néanmoins, plusieurs substrats potentiels d'ADAM12 ont été décrits. Des expériences *in vitro* ont montré l'implication d'ADAM12-S dans le clivage d'IGFBP-3 et -5 (Insulin Growth Factor –Binding Protein) ^{204,205}, deux protéines qui en se fixant au facteur de croissance IGF-1 inhibent son action. ADAM12 semble également jouer un rôle important dans le clivage de ligands de l'EGFR tels que l'HB-EGF (Heparin-Binding EGF) ^{206,207}, l'EGF et la betacellulin ²⁰⁸. Cependant, l'implication exacte d'ADAM12 dans le clivage de HB-EGF reste encore mal connue notamment du fait de résultats divergents obtenus selon le type cellulaire étudié, le type de substrats utilisé (endogènes ou exogènes) ou encore selon les études de type gain ou perte de fonction ^{206,208}. ADAM12 clive également P-LAP (Placental Leucine AminoPeptidase) ²⁰⁹, qui est une oxytocinase placentaire, et Delta-like 1 ²¹⁰, un ligand des récepteurs Notch. Enfin le rôle protéolytique d'ADAM12 s'étend aux protéines de la MEC telles que la fibronectine, le collagène de type IV et la gélatine ²¹¹.

Comme pour la plupart des métalloprotéases, l'activité enzymatique d'ADAM12 est inhibée par les TIMPs, et notamment par TIMP-2 et TIMP-3 ¹⁴⁷. TIMP-1 est quant à lui un inhibiteur faible d'ADAM12.

3) Les différentes fonctions cellulaires d'ADAM12

Outre son activité enzymatique, ADAM12 joue un rôle dans différentes fonctions cellulaires parmi lesquelles les interactions cellulaires, l'organisation du cytosquelette ou encore la signalisation cellulaire (**Figure 25**).

ADAM12 participe à *l'adhésion cellulaire* via ses domaines « désintégrine » et « riche en cystéines » qui peuvent interagir notamment avec certaines intégrines. Son domaine désintégrine contient une séquence RX₆DEVF qui peut se lier avec l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ ^{212,213}. ADAM12 interagit également avec l'intégrine $\alpha 7\beta 1$, favorisant ainsi le développement musculaire ²¹⁴, et avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, jouant alors un rôle dans la migration cellulaire ²¹⁵. ADAM12-S soutient l'adhésion cellulaire chez des cellules déficientes pour la chaîne $\beta 1$ des intégrines via la chaîne $\beta 3$ ²¹⁶. En outre, par l'intermédiaire de son domaine riche en cystéine, ADAM12 interagit avec des protéoglycanes riches en héparane sulfates, notamment le syndecan-4, facilitant là-aussi l'adhésion cellulaire ^{217,218}. L'ensemble de ces données attribue un rôle pro-adhésif à ADAM12.

ADAM12 influence également *l'organisation du cytosquelette* via son interaction avec différentes intégrines, qui induisent des réorganisations du cytosquelette d'actine en réponse à des signaux externes ou internes ²¹⁹. Ainsi, une sous-expression d'ADAM12 dans des cellules pré-adipocytaires entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine et une réduction de l'attachement cellulaire à la MEC du fait d'une modification des fonctions de l'intégrine $\beta 1$ ²²⁰. Cependant, ADAM12 régule également le cytosquelette d'actine d'une manière plus directe. En effet, son domaine cytoplasmique se lie avec l'actinin-2, une protéine spécifique des cellules musculaires, régulant ainsi l'organisation des filaments d'actine au niveau des disques Z du muscle squelettique ²²¹. Enfin, une étude montre qu'ADAM12 interagit avec l'actinin-1, qui est un composant des filaments d'actine ubiquitaire engagé dans la connexion entre ces filaments et la membrane cellulaire ²²².

Enfin, le rôle d'ADAM12 permet la transduction de voies de signalisation. Il clive des ligands de l'EGFR induisant alors l'activation de ce dernier et de voies de signalisation qui vont stimuler la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation ²²³. En outre, ADAM12 agit directement sur différentes voies de signalisation via son extrémité intracytoplasmique. Chez l'homme ou chez la souris, ADAM12 possède dans ce domaine des régions riches en proline avec des séquences consensus reconnues par les protéines contenant des sites SH3 (Src Homology 3). Ainsi, ADAM12 murine se lie aux tyrosines kinases c-Src et Yes, aux protéines Eve-1 et PACSIN3, ainsi qu'à la protéine adaptatrice Grb2 ^{224,225}. De plus, elle s'associe également à p85 α , une sous-unité de la PI3-K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase), augmentant alors l'activité de la voie PI3-K ²²⁶.

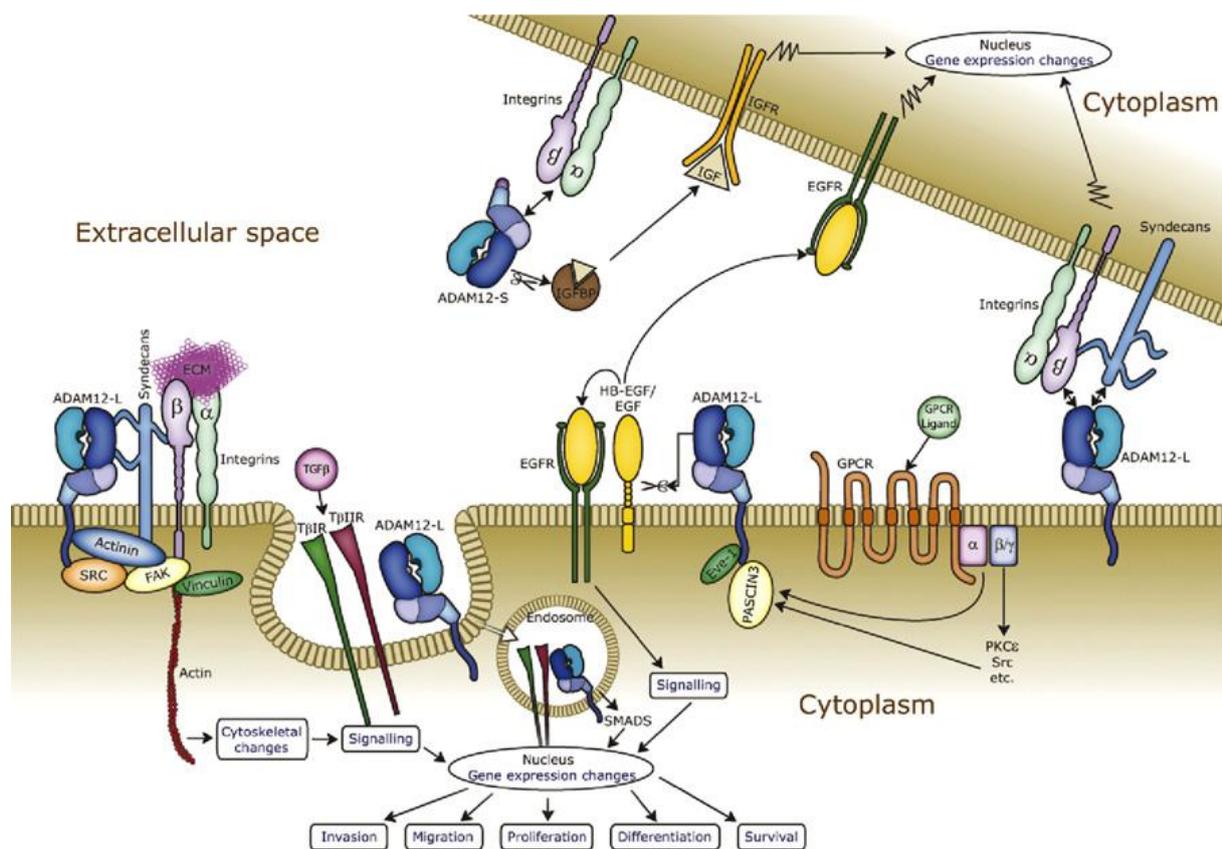


Figure 25 : Schéma des différentes fonctions cellulaires d'ADAM12 ¹⁶⁴

4) Régulation de l'expression d'ADAM12

ADAM12 est exprimée par de nombreux tissus et lignées cellulaires ²²⁷ et notamment par les cellules myoblastiques ²²¹. D'autres types cellulaires fusogéniques tels que les ostéoclastes ²²⁸ ou encore les trophoblastes placentaires ²²⁹ expriment également ADAM12. Les cellules de type mésenchymateuses comme les adipocytes ²²⁰, les ostéoblastes ²³⁰ et les chondroblastes ²³¹ expriment de manière constitutive ADAM12, tout comme les oligodendrocytes ²³² et les cellules hépatiques ²³³.

Les mécanismes de contrôle de l'expression d'ADAM12 restent encore largement inconnus. Le seul facteur induisant directement l'expression d'ADAM12, identifié chez des cellules hépatiques, est le *TGFβ1* et ce via deux voies de signalisation : la voie PI3-K/Frap-mTOR/p70^{s6} et la voie MAPK ^{233,234}. Plus récemment, une étude a montré l'implication de la voie des Smads dans l'induction de l'expression d'ADAM12 par le TGFβ1 au sein de

cellules épithéliales et de fibroblastes murins. Ce processus est régulé négativement par la protéine SnoN qui inhibe fortement l'activation de la voie des Smads ²³⁵.

L'expression du gène *ADAM12* est également régulée par un micro-ARN : *le miR-29b*. En effet, au cours d'un stress oxydatif, des cellules humaines du trabéculum voient leur expression de ce micro-ARN diminué. Ceci a pour conséquence d'induire la surexpression de gènes impliqués dans la synthèse et le dépôt de la MEC mais aussi du gène *ADAM12* ²³⁶. Le miR-29b inhibe *ADAM12-L* en se fixant sur la partie 3'UTR de l'ARNm mais il n'a aucun effet sur l'expression de l'isoforme courte *ADAM12-S*. En outre, ce miRNA est inhibé par la voie de signalisation Notch. Celle-ci serait alors un activateur indirect de l'expression d'*ADAM12* ²³⁷.

B. Rôle physiologique d'ADAM12

ADAM12 a été initialement décrit comme étant impliqué dans la myogenèse ²²¹. Il favorise en effet la fusion des cellules myoblastique. Il joue un rôle similaire au sein de l'ostéoclastogenèse en permettant la formation des cellules ostéoclastiques multinucléées ²²⁸.

Une meilleure compréhension du rôle physiologique d'*ADAM12* est basée principalement sur l'étude de souris génétiquement modifiées. Une délétion du gène *ADAM12* est létale chez 30% des souris après la naissance pour des raisons encore inconnues ²⁰⁶. En dépit du fait qu'*ADAM12* régule la *myogenèse*, les souris déficientes montrent un phénotype musculaire normal, peut-être dû à une compensation par l'activité d'autres ADAMs. toutefois, des souris transgéniques pour le gène *ADAM12-L*, sous contrôle d'un promoteur spécifique du muscle squelettique, montrent une augmentation de la régénération musculaire suite à une blessure induite expérimentalement ²³⁸. Ceci tend à démontrer l'engagement d'*ADAM12* dans la régénération musculaire. La même expérience d'induction « tissu spécifique » a été réalisée avec le gène *ADAM12-S*. Ici, une forte concentration sérique de cette forme soluble est retrouvée et est associée à une augmentation du tissu adipeux abdominal. Ce rôle d'*ADAM12* dans la différenciation adipocytaire est confirmé chez des souris déficientes pour ce gène. Ces souris sont en effet protégées de l'obésité causée par un régime riche en graisse, notamment du fait d'une baisse de la prolifération adipocytaire lors des premières étapes de la différenciation ²³⁹.

ADAM12 semble également jouer un rôle durant la *gestation* et particulièrement dans le développement fœtal. Les deux isoformes d'ADAM12, ADAM12-L et ADAM12-S, sont fortement exprimées dans le placenta humain ^{209,229}. Bien que leurs rôles exacts soient encore inconnus, des observations cliniques montrent une corrélation entre le taux sérique d'ADAM12 et certaines pathologies. En effet, un faible taux maternel d'ADAM12-S sérique est retrouvé lors de grossesse où le fœtus présente une trisomie 18 ou 21 ^{240,241}. Cependant, l'utilité d'ADAM12 comme marqueur prénatal n'a pas été démontré ²⁴². Un bas taux sérique d'ADAM12-S a également été constaté lors des cas de pré-éclampsie, une hypertension artérielle trouvant son origine dans un trouble de la placentation ²⁴³. Une étude suggère d'utiliser ADAM12-S comme marqueur prédictif de pré-éclampsie et donc de complications prénatales lors du premier trimestre de la grossesse ²⁴⁴.

Enfin, ADAM12 semble important dans la *physiologie osseuse*. Des études *in vitro* démontrent une expression régulée d'ADAM12 par les ostéoclastes, les ostéoblastes mais également les chondrocytes ^{230,245,246}. ADAM12 joue un rôle durant l'ostéoclastogenèse avec notamment un pic d'expression observé durant la fusion des cellules pré-ostéoclastiques. Par ailleurs, une inhibition de l'expression d'ADAM12 provoque une baisse du nombre d'ostéoclastes formés ²⁴⁷. Cependant, les souris déficientes pour ADAM12 ne présentent pas d'altération du phénotype osseux. Les souris transgéniques pour ADAM12-S montrent néanmoins une augmentation de la croissance des os longitudinaux et un évasement des plaques de croissance tibiales et fémorales. Une augmentation du nombre et de la prolifération chondrocytaire a également été notée ²³¹. Ainsi, s'il est démontré *in vitro* et *in vivo* une implication d'ADAM12 dans le remodelage osseux, son déficit semble pouvoir être compensé par l'activité d'autres protéases afin de maintenir un phénotype osseux sain.

C. L'influence d'ADAM12 sur la cancérogenèse

De manière générale, les ADAMs sont des acteurs importants de la cancérogenèse et ADAM12 ne déroge pas à la règle. ADAM12 est une protéine multifonctionnelle et ses différentes propriétés pourraient jouer un rôle dans la progression tumorale. Sa principale fonction reste cependant sa fonction protéolytique, qu'elle partage avec les autres protéases. ADAM12 dégrade certaines protéines de la MEC, telles que la fibronectine, et favoriserait ainsi la migration et l'invasion des cellules tumorales ²⁴⁸. Outre cet effet pro-invasif,

ADAM12 stimule également la prolifération des cellules tumorales. Deux études ont montré que des anticorps bloquant l'activité d'ADAM12 inhibaient *in vitro* la prolifération de lignées de carcinome^{249,250}. De plus, l'expression d'ADAM12 est corrélée positivement avec l'activité proliférative de glioblastomes humains mais également avec le taux de HB-EGF clivé, une protéine connue pour induire la prolifération cellulaire²⁵¹. Cette observation suggère qu'ADAM12 pourrait réguler la prolifération des cellules tumorales en clivant des facteurs de croissance tels que HB-EGF.

Des études *in vivo* ont été réalisées afin de mieux comprendre le rôle d'ADAM12 dans la tumorigenèse. Des modèles de souris transgéniques ont notamment été utilisés. Par exemple, des souris surexprimant ADAM12 spécifiquement au niveau mammaire ont été créées. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires (dû à l'expression de l'antigène « polyoma middle T »), une augmentation de l'agressivité de la tumeur mais également du grade tumoral et du potentiel métastatique aux poumons ont été observées. Ces effets seraient dus non pas à un effet pro-prolifératif d'ADAM12 mais à un effet anti-apoptotique, et ce de manière indépendante de son activité protéasique²⁵².

L'agressivité tumorale dépend non seulement des cellules de la tumeur mais également des cellules stromales environnantes. La définition du rôle d'ADAM12 dans la cancérogenèse implique d'identifier les sources cellulaires de cette protéase. Chez l'homme, ADAM12 est principalement produite par les cellules tumorales^{217,251,252}. Néanmoins, certaines études montrent une forte expression d'ADAM12 par les cellules stromales notamment dans des tumeurs mammaires²⁵⁰. De plus, ADAM12 a été détectée dans le stroma tumoral de carcinomes hépatocellulaires humains alors que les cellules tumorales restaient négatives²³³. Dans des modèles de cancer murin (sein, prostate, intestin), l'expression d'ADAM12 a été décrite comme d'origine stromale contrastant ainsi avec les observations faites chez l'homme. En outre, les conséquences de l'expression d'ADAM12 par les cellules stromales sur la tumorigenèse varient selon les modèles. Dans un modèle de cancer prostatique murin, ADAM12 produite par le stroma est essentielle à la croissance tumorale²⁵³ tandis que dans un modèle murin de tumeur mammaire, seule ADAM12 exprimée par les cellules cancéreuses a un effet pro-tumoral, la production d'ADAM12 par les cellules stromales restant sans effet²⁵⁴.

L'ensemble de ces données attribue un rôle pro-tumoral à ADAM12. Cette observation est corroborée par des études précliniques et cliniques. En effet, ces dernières ont montré une surexpression d'ADAM12 dans un grand nombre de tumeurs malignes humaines (**Tableau IX**). Cette surexpression a pu être corrélée positivement au grade et à la croissance tumorale. De plus, le taux urinaire d'ADAM12 pourrait être utilisé comme valeur pronostique. Une corrélation positive a été établie entre le taux d'ADAM12 présent dans les urines et la progression de cancers du sein ²¹¹. Une observation similaire a été faite dans le cas de cancers de la vessie. Le taux d'ADAM12 dans l'urine diminue après l'exérèse de la tumeur et augmente dans les cas de rechute tumorale ²⁵⁵. Ces observations laissent ainsi supposer qu'ADAM12 aurait un rôle pro-tumoral mais également qu'il pourrait devenir un biomarqueur utilisé en clinique.

Type tumoral		Surexpression	Fonctions potentielles	Corrélation
Humain	Sein ^{217,256}	Cellules tumorales, urine	Survie cellulaire, protéolyse de la MEC	Stade de la maladie, âge du patient, prolifération cellulaire
	Vessie ²⁵⁵	Cellules tumorales, urine	ND	Grade tumoral
	Foie ²³³	Cellules stromales	Remodelage de la MEC	ND
	Poumon ²⁵⁷	Cellules tumorales	ND	Expression de VEGF
	Cavité buccale ²⁵⁸	Cellules tumorales	Prolifération cellulaire	ND
	Estomac ²¹⁷	Cellules tumorales	Prolifération cellulaire	ND
	Colon ²¹⁷	Cellules tumorales	ND	ND
	Cerveau (glioblastome) ²⁵¹	Cellules tumorales	Clivage de HB-EGF, prolifération cellulaire	Prolifération tumorale
	Os (tumeur à cellules géantes) ²⁵⁹	Cellules tumorales	Fusion cellulaire	ND
	Œsophage ²⁶⁰	Cellules tumorales	ND	Grade tumoral
Larynx ²⁶¹	Cellules tumorales	ND	ND	
Murin	Sein ²⁵³	Cellules stromales	ND	ND
	Prostate ²⁵³	Cellules stromales	ND	ND
	Intestin ²⁵³	Cellules stromales	ND	ND

Tableau IX : Les différents cancers connus surexprimant ADAM12 (ND : Non défini)

Objectifs de la 1^{ère} partie :

ADAM12 est une métalloprotéase décrite comme potentiellement pro-tumorale dans la plupart des types de cancer étudiés, notamment via son activité pro-proliférative et pro-invasive. Cependant, son rôle dans l'ostéosarcome est encore inconnu et reste entièrement à définir. De plus, ADAM12 est impliqué dans la physiologie osseuse et particulièrement dans l'ostéoclastogenèse. Cette métalloprotéase pourrait donc intervenir dans l'ostéolyse associée à la tumeur. L'objectif de ce travail est :

- *D'établir un profil d'expression d'ADAM12 et de différentes protéases ainsi que de leurs inhibiteurs selon le caractère ostéolytique de la tumeur*
- *D'étudier l'effet d'ADAM12 sur la croissance et la progression des ostéosarcomes*
- *D'étudier l'influence d'ADAM12 sur le phénotype osseux associé à la tumeur.*

MATERIELS ET METHODES

A. Culture cellulaire

1) Lignées cellulaire

Cellules K7M2

Cette lignée dérive de la lignée d'ostéosarcome murin K7 injectée en intra-osseux dans le tibia de souris BALB/c. Les métastases pulmonaires issues de la tumeur primaire ont alors été implantées en site paratibial dans une souris naïve. Ce cycle d'implantation de fragments de métastases pulmonaires en paratibial a été répété aboutissant à la tumeur primaire appelée K7M2. La tumeur a été dissociée et des clones furent cultivés *in vitro* créant ainsi la lignée cellulaire K7M2, correspondant à un ostéosarcome ostéoblastique de nature ostéolytique et ostéogène ayant un fort pouvoir métastatique²⁶². Cette lignée provient de l'ATCC (American Type Culture Collection).

Cellules MOS-J

Ces cellules, de nature ostéogène, dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément par des souris de souche C57BL/6J (Joliat et al, 2002). Elles nous ont été fournies par le Dr Léonard Shultz (Jackson Laboratory). Ces cellules induisent des nodules minéralisés *in vitro* et induisent la formation de tumeurs très ostéogènes *in vivo*, correspondant à un ostéosarcome ostéoblastique, le plus fréquent chez l'homme.

Cellules POS-1

Ces cellules adhérentes dérivent d'un ostéosarcome murin développé spontanément par des souris de souche C3H/HeN (Uesugi et al, 2000). Cette lignée provient de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ces cellules induisent la formation de tumeurs très ostéolytiques *in vivo*.

B. Conditions de culture cellulaire

Toutes les manipulations se font dans un environnement contrôlé sous hotte à flux laminaire vertical (PSM Securiplus, Astec). Les cellules sont cultivées en flasque F25 ou F75 (FALCON®, Becton Dickinson Labware), dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) complété avec 5% SVF (Sérum de Veau Foetal, Hyclone

Perbio) pour les cellules MOS-J et POS-1 et dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza) supplémenté par 10% de SVF pour les cellules K7M2. Les cellules sontensemencées à une densité de 50×10^3 cellules/cm². Les flasques sont ensuite placées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité avec 5% de CO₂. Les milieux de culture sont changés deux fois par semaine. A confluence, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA [BioWhittaker, Trypsine : 0,5 g/L; EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) : 0,2 g/L]. La trypsine est ensuite neutralisée par un ajout de milieu de culture supplémenté par 10% SVF. Après centrifugation à 1600 rpm pendant 5 minutes à température ambiante, le culot est repris dans du milieu complet. Un comptage cellulaire est alors réalisé sur cellule de Malassez par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan, technique qui permet de quantifier la viabilité cellulaire. En effet, les cellules mortes incorporent le colorant, tandis que les cellules viables restent réfringentes.

C. Modèles d'ostéosarcome murin *in vivo*

Les animaux utilisés pour l'expérimentation *in vivo* sont hébergés dans des conditions non pathogènes au sein de l'unité de thérapie expérimentale (Faculté de Médecine, Nantes) en accord avec le comité d'éthique régional des Pays de Loire (CEE.A.PdL.06).

Modèle d'ostéosarcome murin MOS-J

Des souris C57BL/6J (élevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) âgées de 4 semaines sont utilisées pour les expérimentations *in vivo*. Les tumeurs sont induites par injection intramusculaire de 4 millions de cellules MOS-J reprises dans 50 µl de DPBS au contact du tibia de l'animal sous anesthésie par isoflurane. Une tumeur se développe au contact du tibia sept jours après l'injection.

Modèle d'ostéosarcome murin K7M2

3 millions des cellules K7M2 sont injectées en site paratibial chez des souris BALB/cByJ âgées de 4 semaines (élevage Charles River, Saint-Germain de l'Arbresles, France). Une tumeur se développe au contact du tibia dix jours après l'injection.

Modèle d'ostéosarcome murin POS-1

Des souris C3H/HeN âgées de quatre semaines (élevage Janvier) subissent une injection par voie sous-cutanée dans le coussinet plantaire gauche de $2 \cdot 10^6$ cellules tumorales POS-1 dans 50µL de PBS (Phosphate Buffered Saline). Suite à cette injection, les souris développent en environ 14 jours une tumeur primitive au site d'injection. Un fragment d'environ $2 \times 2 \times 2 \text{ m}^3$ de la tumeur primitive est ensuite transplanté chez des souris de même souche au contact du tibia (en site paratibial), après avivement du périoste, induisant le développement d'un ostéosarcome ostéolytique en 20-25 jours et des métastases pulmonaires.

D. Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes

Afin d'analyser l'expression génique de différentes protéases d'intérêt, l'ARN est extrait des cellules MOS-J et K7M2 en culture *in vitro* et également de fragments prélevés sur les tumeurs *in vivo*.

1) Extraction d'ARN

A partir de cellules cultivées in vitro

Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits. A 80% de confluence, l'extraction des ARN totaux des cellules est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel, Duren, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. La concentration en ARN extrait est ensuite mesurée à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,8 et 2 (pureté de l'échantillon).

A partir de fragments tumoraux

Après le développement des tumeurs MOS-J et K7M2 pendant quatre semaines chez la souris et le sacrifice des animaux par dislocation cervicale, des fragments tumoraux sont prélevés. Ces fragments sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un disperseur DI25 (IKA, Staufen, Allemagne). L'extraction des ARN totaux est également réalisée à l'aide du kit NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel, Duren, Allemagne).

2) Reverse Transcription

La production d'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse a été effectuée avec des oligonucléotides « Oligo(dT)₂₀ » (50 pmoles/réaction) fournis dans le kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ces oligonucléotides se positionnent au niveau de la queue polyA des ARNs et permettent par la suite la détection de transcrits multiples. L'enzyme utilisée dans ce kit est une réverse transcriptase d'origine aviaire, qui a été développée afin d'obtenir une grande stabilité thermique et pour rétrotranscrire des fragments d'ARNm de grande taille. Un µg d'ARN total est mis en présence de 1µL d'Oligo(dT)₂₀, de 2µL de dNTPs 10mM (1mM final) et d'eau afin d'obtenir un volume final de 12µL. Ce mélange a été chauffé 5min à 65°C avant d'ajouter 4µL de tampon de réaction 5X (concentrations finales : 50mM TRIS acétate, 75mM d'acétate de potassium et 8mM d'acétate de magnésium), 1µL de DTT 0,1M (5mM final), 1µL de RNase OUT à 40U/µL (2U/µL final), 1µL d'eau et 1µL de ThermoScript à 15U/µL (0,75U/µL final). Le volume final est de 20µL. La réaction est réalisée à 50°C pendant une heure puis arrêtée par chauffage à 85°C pendant 5 minutes. Les produits de RT sont ensuite utilisés pour la réaction d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

3) PCR quantitative

La PCR quantitative (Polyclonal Chain Reaction) permet de suivre en « temps réel » le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR. Les expériences de PCR quantitative ont été réalisées à l'aide de l'appareil CFX96 de Biorad permettant de travailler avec des plaques 96 puits. Dans chaque puits, 10ng d'ADNc sont déposés ainsi que 8µL du mélange [IQ SYBR Green Supermix (BioRad) et des primers sens et anti-sens du gène d'intérêt (300nM)]. Les séquences des primers utilisés sont présentées dans le **tableau X**. Les gènes de référence Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1) et Cyc1 (Cytochrome c-1) sont utilisés pour analyser les différences d'expression potentielles.

	Séquences des primers		Position	Tm (C°)
MMP-2	Sens	agaaggctgtgttctttgcag	1900 - 1920	60
	Anti-Sens	aggctggtcagtggttg	1970 - 1987	
MMP-9	Sens	cgacatagacggcatccag	1308 - 1326	
	Anti-Sens	ctgtcggctgtggttcagt	1381 - 1399	
ADAM8	Sens	cгааaggctccgagacaa	2067 - 2084	
	Anti-Sens	ttggagagccccgagatag	2113 - 2131	
ADAM9	Sens	tccggcagtgagtacaagaa	1807 - 1826	
	Anti-Sens	gcattgaagctttccacaca	1847 - 1866	
ADAM12	Sens	tgagcagcagtggtcacg	1801 - 1819	
	Anti-Sens	gagttgactcgctcaaagca	1856 - 1875	
ADAM15	Sens	gccgctgccaaatatagg	186 - 203	
	Anti-Sens	ctccatggatccactcagc	243 - 261	
ADAM17	Sens	aagtgcaggctgggaaat	1873 - 1891	
	Anti-Sens	ccttgacagagttgtcagtg	1944 - 1963	
ADAMTS-4	Sens	cttcctggacaatggttatgg	1657 - 1677	
	Anti-Sens	gaaaagtcgctggtagatgga	1710 - 1730	
Cathepsine B	Sens	aagctgtgtggcactgtcct	295 - 314	
	Anti-Sens	gatctatgtcctcaccgaacg	344 - 364	
Cathepsine K	Sens	ggaggcggctatatgacca	585 - 603	
	Anti-Sens	ggcgttatacatacaactttca tcc	671 - 695	
Cystatine B	Sens	ttcagcttctccgtgctacc	85 - 104	
	Anti-Sens	ttcaagctgggacttcacct	187 - 206	
Cystatin C	Sens	tggtagagactcgtgaagcag	297 - 316	
	Anti-Sens	cccattctccacatccaaaa	338 - 357	
tPA	Sens	gcctgggcagacacaatta	883 - 901	
	Anti-Sens	atcacatggcaccaggctc	928 - 946	
uPAR	Sens	ctctgcaggactaccgtgct	146 - 165	
	Anti-Sens	gtgggcacagcctcttgt	203 - 220	
PAI-1	Sens	aggatcgaggtaaacgagagc	1187 - 1207	
	Anti-Sens	gcgggctgagatgacaaa	1235 - 1252	
TIMP3	Sens	gcctcaagctagaagtcaacaa a	717 - 739	
	Anti-Sens	tgtacatcttgccttcatacac g	763 - 785	
TIMP4	Sens	agggagagcctgaatcatca	504 - 523	
	Anti-Sens	gcactgcatagcaagtgtg	551 - 570	

Tableau X : Liste des amorces utilisées

E. Production des lignées modifiées

1) Clonage des cassettes d'ADN codant pour des shRNAs ciblant l'ARNm ADAM12

a. Choix des séquences des shRNAs

Les séquences des shRNAs (Small-hairpin RNA) dirigés contre ADAM12 sont dessinées sur la base de plusieurs critères (**Tableau X**)²⁶³ :

- la séquence doit contenir entre 40 et 50% de GC assurant une structure stable
- absence de répétitions d'une même base supérieure à quatre
- de préférence un T ou un G en première position, un A en troisième, un U en dixième, pas de G en treizième, et au moins 3A ou T entre les positions 15 à 19

Une séquence ne ciblant aucun ARN messager murin est également produite afin d'être utilisée comme shRNA contrôle (shCT).

Nom	Séquence des oligonucléotides		Tm (°C)
shCT	Sens	GATCCCC TTCTCCGAACGTTACGTTT TTCAAGAGAA AAACGTGACACGTTCCGGAGAA TTTTTGGAAA	67
	Anti-sens	AGCTTTTCCAAAA TTCTCCGAACGTTACGTTT TCTCTTGAA AAACGTGACACGTTCCGGAGAA GGG	
shADAM12.1	Sens	GATCCCC GGATGAACCATGACACACT TTCAAGAGAA AGTGTGTCATGGTTCATC TTTTTGGAAA	
	Anti-sens	AGCTTTTCCAAAA GGATGAACCATGACACACT TCTCTTGAA AGTGTGTCATGGTTCATC GGG	
shADAM12.2	Sens	GATCCCC CCATCAGGCAAGCAGATAA TTCAAGAGAA TATCTGCTTGCTGATGG TTTTTGGAAA	
	Anti-sens	AGCTTTTCCAAAA CCATCAGGCAAGCAGATAA TCTCTTGAA TATCTGCTTGCTGATGG GGG	

Tableau X : Séquences des oligonucléotides utilisés

Les risques de reconnaissance non-spécifique sont évalués à l'aide du logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr>).

b. Clonage dans le plasmide pSUPER

Les séquences d'ADN sont dans un premier temps clonées dans le plasmide pSUPER obtenu auprès de R. Agami²⁶⁴. Ce plasmide possède le promoteur H1, reconnu par l'ARN polymérase III, qui permet une production endogène des shRNAs.

- **Linéarisation du plasmide pSUPER** : 2µg du plasmide pSUPER sont linéarisés par 2µl d'enzymes de restriction *BglIII* et *HindIII* (Figure 26) pendant une heure à 37°C.

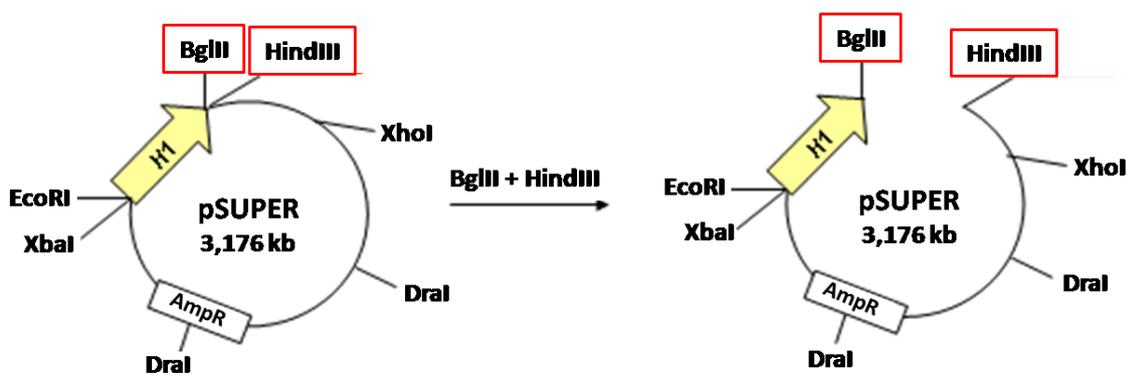


Figure 26 : Linéarisation du plasmide pSUPER par les enzymes de restriction *BglIII* et *HindIII*

- **Appariement des brins sens et anti-sens des oligonucléotides** : Les oligonucléotides sont repris dans de l'eau à une concentration de 10 µM. Après une dénaturation des brins pendant 10 minutes à 90°C, 4µl de chaque oligonucléotide sont incubés avec 28µl d'eau et 4µl de tampon 2 10X 10 minutes à 67°C puis 30 minutes à température ambiante.
- **Ligation** : Les oligonucléotides sont clonés dans le plasmide pSUPER (Figure 27). Quatre µl d'oligonucléotides appariés sont incubés une nuit avec 2µl du plasmide linéarisé, 4µl de tampon DNA ligase 5X, 1µl de l'enzyme *DNA T4 ligase* et 9µl d'eau. Le mélange est ensuite incubé 20 minutes à 65°C afin de dénaturer l'enzyme. Le produit de ligation est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *BglIII* éliminant ainsi les plasmides s'étant refermés sur eux-mêmes.

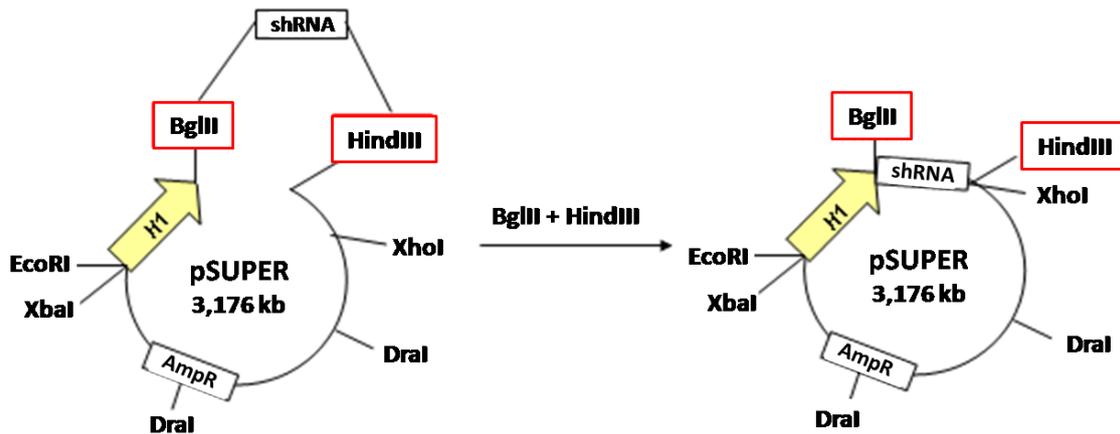


Figure 27 : Ligation des oligonucléotides dans le plasmide pSUPER

- **Précipitation de l'ADN** : L'ADN du produit de digestion est ensuite précipité. Sont ajoutés successivement aux 100µl du produit de digestion: 5µl d'EDTA 0,2M pH8, 5µl NaCl 5M, 1µl tRNA à 10µg/µl et 220µl d'éthanol 100%. Après une incubation de 2h à -20°C, les tubes sont centrifugés 5' à 12000 rpm à 4°C. Le culot est ensuite rincé dans de l'éthanol 70% puis de nouveau centrifugé 5' à 12000 rpm et enfin séché. Les plasmides sont alors repris dans 10µl de tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).
- **Transformation des bactéries chimiocompétentes Stbl3** : Des bactéries chimiocompétentes One Shot® Stbl3™ (Invitrogen) sont décongelées sur glace puis 1 µL de plasmide sont ajoutés. Les bactéries sont alors incubées 30 minutes sur glace et un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secondes. Les bactéries sont de nouveau placées 2 minutes dans la glace. 250 µL de milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10mM chlorure de sodium, 2,5mM chlorure de potassium, 10mM chlorure de magnésium, 10mM sulfate de magnésium, 20mM glucose) préchauffés sont ensuite ajoutés et les bactéries sont placées 1 heure à 37°C sous agitation horizontale. Deux cents µL et 50 µL sont alors étalés sur des boîtes de gélose LB (Luria Bertani) additionné de 10 µg/mL d'ampicilline pour ne sélectionner que les bactéries ayant incorporé le plasmide.
- **Mini-préparation plasmidique** : 24 colonies récoltées sur la gélose sont mises chacune en culture dans 2 ml de milieu LB [20 g/L de Luria Bertani (Invitrogen)] pendant une nuit à 37°C, sous agitation. Le lendemain, les plasmides sont purifiés à l'aide du kit *Nucleospin*® *plasmid* (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne) selon les indications données par le fournisseur. Une digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* de chaque

mini-préparation est réalisée suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1,2%. Un fragment de 400 paires de bases est détecté pour les plasmides positifs. Les différents fragments clonés positifs sont ensuite vérifiés par un séquençage complet par la société Cogenics (Bordeaux).

- **Maxi-préparation plasmidique** : Les clones sélectionnés sont finalement amplifiés et purifiés à l'aide d'un kit *NucleoBond Xtra Maxi Plus* (Macherey-Nagel) selon les indications du fournisseur.

c. Clonage dans le plasmide pFG12

Le plasmide pFG12, obtenu auprès de Xiao-Feng Qin ²⁶⁵, permet la production de particules lentivirales. Il contient deux séquences LTR (Long Terminal Repeat) qui permettent l'intégration de l'ADN proviral situé entre ces deux séquences dans le génome de la cellule hôte. La cassette H1-insert est clonée entre les séquences LTR. Le pFG12 contient également le gène codant pour la GFP (Green Fluorescence Protein) qui sera un moyen de sélection des cellules transduites par tri cellulaire.

- **Linéarisation des vecteurs pSUPER-shRNA et pFG12** : Les vecteurs sont linéarisés par les enzymes *XbaI* et *XhoI* (**Figure 28**). Le fragment contenant le promoteur H1 et le shRNA est alors libéré. Les plasmides pSUPER sont digérés en trois fragments par l'enzyme de restriction *DraI*, la cassette H1-insert restant intacte.

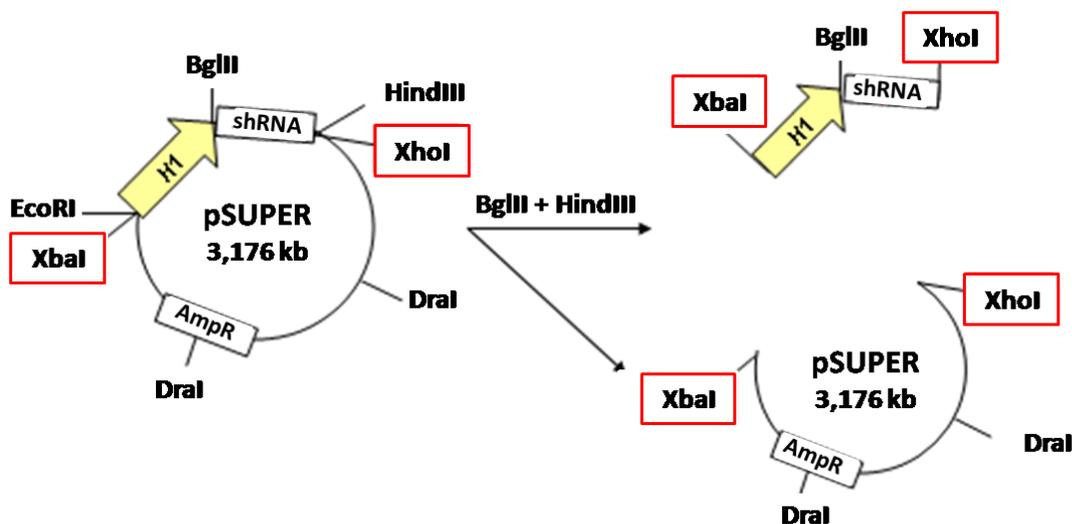


Figure 28 : Digestion du plasmide pSUPER-shRNA par *XbaI* et *XhoI*

a. Production des particules lentivirales

La lignée cellulaire 293FT, une lignée transfectée par l'antigène T SV40, est utilisée pour produire les particules lentivirales. Elle est cultivée dans des boîtes de 10cm de diamètre dans 10ml de milieu α MEM sans rouge phénol (Invitrogen) avec 10% de SVF et de la généticine à 500ng/ml.

La production lentivirale est réalisée pour les trois shRNAs clonés dirigés contre ADAM12 et pour le shRNA contrôle à l'aide du kit *ViraPower™ Lentiviral Expression Systems* (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur. Le milieu de culture contenant les particules lentivirales est récupéré, centrifugé 5 minutes à 2500 rpm puis passé à travers de filtres 0.45 μ m afin d'éliminer les débris cellulaires. Les particules sont ensuite concentrées par ultrafiltration avec des tubes AMICON (Millipore) puis sont conservées à -80°C.

La production lentivirale est ensuite titrée afin de connaître le nombre de particules par μ l. 40000 cellules 293FT sont transduites par 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ou 5 μ l de la production lentivirale. Le pourcentage de cellules transduites est évalué 72h après en analysant le pourcentage de cellules exprimant la GFP à l'aide d'un cytomètre en flux FC500 (Beckman Coulter). La concentration en particules lentivirales est calculée en considérant que chaque particule infecte une cellule.

b. Transduction de la lignée K7M2

Les cellules K7M2 sont transduites par les particules lentivirales shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2.

20000 cellules sontensemencées en plaque 24 puits. Le lendemain, les cellules sont transduites par les particules lentivirales avec un ratio de 40 particules par cellule. Les cellules sont ensuite passées en plaque 6 puits puis en flasque de 25 cm². Les cellules transduites sont alors triées au plateau technique de cytométrie en flux et de tri cellulaire de la *SFR Santé François Bonamy* par un cytomètre en flux FACS Aria III (BD biosciences) afin de sélectionner uniquement les cellules exprimant la GFP et donc les shRNAs. Trois

nouvelles lignées sont alors obtenues : *K7M2 shCT*, *K7M2 shADAM12.1* et *K7M2 shADAM12.2*.

L'efficacité des différents shRNAs dirigés contre ADAM12 est évaluée en analysant l'expression d'ADAM12 par PCR quantitative selon le protocole utilisé précédemment.

3) Production de lignées MOS-J surexprimant ADAM12

La lignée MOS-J est transfectée par le plasmide Lv105-Mm24235 codant pour ADAM12 (Genecopoeia, Rockville, USA) ou par le plasmide contrôle Lv105-eGFP (**Figure 30**). Les productions de particules lentivirales s'étant avérées peu efficaces avec ces plasmides, nous avons décidé de modifier les cellules MOS-J par transfection plasmidique.

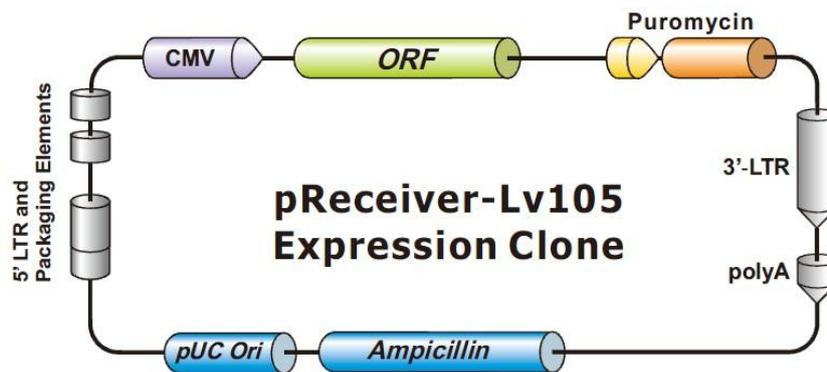


Figure 30 : Carte du vecteur Lv105

Les cellules MOS-J sont cultivées en boîte de 10cm de diamètre. Le mélange réactionnel utilisé pour la transfection est constitué de 72µl de *lipofectamine 2000* (Invitrogen) dans 250µl d'Opti-MEM (Invitrogen) et de 24µg de plasmide dans 250µl d'Opti-MEM. Les deux solutions sont mélangées, incubées 20 minutes à température ambiante puis ajoutées aux cellules adhérentes. 48 heures après, les cellules sont sélectionnées par un milieu RPMI 5% SVF additionné de puromycine 5µg/mL (Invitrogen). Sept jours après l'ajout de l'antibiotique, seules les cellules transfectées stablement sont viables. Des clones sont alors produits par dilution limite. Ils sont cultivés et amplifiés successivement en plaque 96 puits, 24 puits et 6 puits. Le niveau d'expression d'ADAM12 de chaque clone est analysé par PCR quantitative. Deux nouvelles lignées sont alors produites:

- **MOS-J Mock** : pool de quinze clones transfectés par le plasmide contrôle
- **MOS-J ADAM12** : pool de quinze clones exprimant le plus fortement ADAM12

F. Prolifération cellulaire

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits à raison de 1000 cellules par puits. Le nombre de cellules est évalué chaque jour pendant une semaine par comptage au bleu trypan.

G. Etudes *in vivo* du rôle d'ADAM12

1) Mesure du volume tumoral

La mesure de la tumeur selon deux axes perpendiculaires permet de calculer le volume tumoral suivant la formule :

$$\text{Volume tumoral} : \frac{L \times l^2}{2} \quad L = \text{plus grand axe} ; l = \text{petit axe}$$

Le volume tumoral est mesuré trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse.

2) Analyse de la microarchitecture osseuse par microscanner

L'analyse microscanner permet d'étudier l'architecture osseuse grâce à la reconstruction en 3 dimensions. L'acquisition de chaque patte est réalisée grâce au microscanner Skyscan 1076 (Micro Photonics Inc.) et à son logiciel Skyscan. La caméra prend des images tous les 0,6°, la résolution des images est de 18 microns. Le logiciel NRecon permet de convertir les images obtenues afin de les analyser grâce aux logiciels CTAnt et ANT. Deux types de quantification du volume osseux sont réalisés sur les tibias au contact desquels se sont développées les tumeurs:

- volume total osseux spécifique exprimé en pourcentage de BV/TV (Bone volume/ Total Volume). La région d'intérêt est dessinée autour du tibia.
- volume osseux trabéculaire exprimé également en BV/TV (%). La région d'intérêt correspond au volume trabéculaire située en-dessous de la plaque de croissance de la tête tibiale (sur 10% de la longueur totale du tibia).

3) Analyse histologique

En plus de l'analyse par microscanner, des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées. Pour cela, des animaux ont été sacrifiés lorsque le volume tumoral a atteint 2000 mm³. Les pattes ont, alors, été prélevées et fixées grâce à une solution de formaldéhyde 10% durant 24h. Après fixation, les pattes ont été décalcifiées dans un « KOS MicrowaveHistostation » (Milestone®) grâce à une solution de PBS contenant 4,13% d'EDTA et 0,2% de paraformaldéhyde. Suite à la décalcification, les échantillons sont déshydratés puis inclus en paraffine. Des coupes sériées de 3 µm d'épaisseur sont effectuées avec un microtome Leica® RM2255.

Toutes les acquisitions (histologie et immunohistochimie) ont été obtenues à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.ORS Hamamatsu®.

a. Coloration histologique

Les colorations ont été réalisées grâce à un automate de coloration (Microm® HMS 740) dans lequel les échantillons sont déparaffinés puis réhydratés par passage dans des bains de toluène puis d'éthanol de concentration décroissante.

Pour le trichrome de Masson, les lames sont ensuite colorées selon le protocole indiqué dans le **Tableau XI**.

TRICHROME DE MASSON	
SOLUTION	TEMPS
Héματοxyline de Groat	15 min
Eau distillée	5 min
Fuchsine acide-Ponceau	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Orange G molybdique	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Vert lumière	5 min
Eau acétifiée 1%	10 sec
Alcool 100°	30 sec
Alcool 100°	30 sec
Toluène	1 min
Toluène	1 min

Tableau XI : Protocole expérimental du trichrome de Masson

Pour la coloration TRAP, les lames sont également déparaffinées puis réhydratées avant d'être colorées pendant 90 min, à 37°C par la solution présentée ci-dessous (pour 60 ml) :

- 60mg de naphтол AS-TR phosphate de disodium (Sigma®)
- 300µL de N-N diméthylformamide (Sigma®)
- 60mL de tampon acétate à pH 5,2 (acide acétique glacial à 0,2M et acétate de sodium à 0,2M)
- 1,38g de sodium tartrate (Sigma®)
- 60mg de Fastred TR salt (Sigma®)

A l'issue de ce bain dans cette solution de coloration, une contre-coloration à l'héματοxyline de Mayer est réalisée.

Enfin, les lames colorées (Trichrome de Masson ou TRAP) sont montées entre lame et lamelles grâce à un produit de montage non aqueux, le PertexHistolab®.

b. Immunohistochimie

Les tissus sont incubés sur lame avec un anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée (Ostérix), cet anticorps primaire est ensuite détecté par un anticorps secondaire biotinylé. Puis, le signal est amplifié grâce à la liaison d'une streptavidine couplé à une HRP (Horse Raddish Peroxidase) à la biotine de l'anticorps secondaire. La révélation est permise par la solution DAB (3,3'-diaminobenzidine), le substrat de la HRP. Enfin, une contre-coloration hématoxyline de Mayer est réalisée. Le montage entre lame et lamelles est réalisé grâce à une solution de montage en solution aqueuse : Faramount Aquaeous Mounting Medium (Dako®). Entre chacune de ces étapes, 3 lavages de 5 minutes sont réalisés par une solution de PBS / Tween 0,1%. Les concentrations et temps d'incubation des anticorps et réactifs sont présentés ci-après.

Ostérix :

- *Anticorps primaire* : « polyclonal rabbit anti-mouse osterix » (ab22552 ; Abcam) ; dilué au 1/800^{ème} et incubé sur la nuit et à 4°C
- *Anticorps secondaire* : « Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated » (E0432 ; Dako) dilué au 1/200^{ème} et incubé durant 30 min à 37°C
- *Streptavidine / HRP* : dilué au 1/200^{ème} et incubé durant 30 min à 37°C (P0397 ; Dako)

H. Analyse statistique

Les résultats obtenus *in vitro* ont été analysés par le test de Mann Whitney grâce aux logiciels GraphPad InStat v3.02 et Prism3. Ils sont présentés sous forme de moyenne +/- SD Pour les expériences *in vivo*, les résultats sont comparés en utilisant un test ANOVA suivi d'un post-test de Dunnett (multiple comparaison) et sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM. Les courbes de survie sont comparées en utilisant un test Mantel-Cox. Les résultats sont considérés comme significatifs pour $p < 0,05$. (** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

RESULTATS

A. Analyse de l'expression de protéases et de leurs inhibiteurs dans des modèles d'ostéosarcome murin

L'expression génique de différentes protéases et d'inhibiteurs de protéases suspectés de jouer un rôle dans l'ostéolyse associée à la tumeur a été analysée par PCR quantitative dans trois modèles d'ostéosarcome murin (**Figure 31**) :

- POS-1 : ostéosarcome fortement ostéolytique
- K7M2 : ostéosarcome présentant un phénotype mixte, associé à de l'ostéoformation et de l'ostéolyse
- MOS-J : ostéosarcome fortement ostéogénique

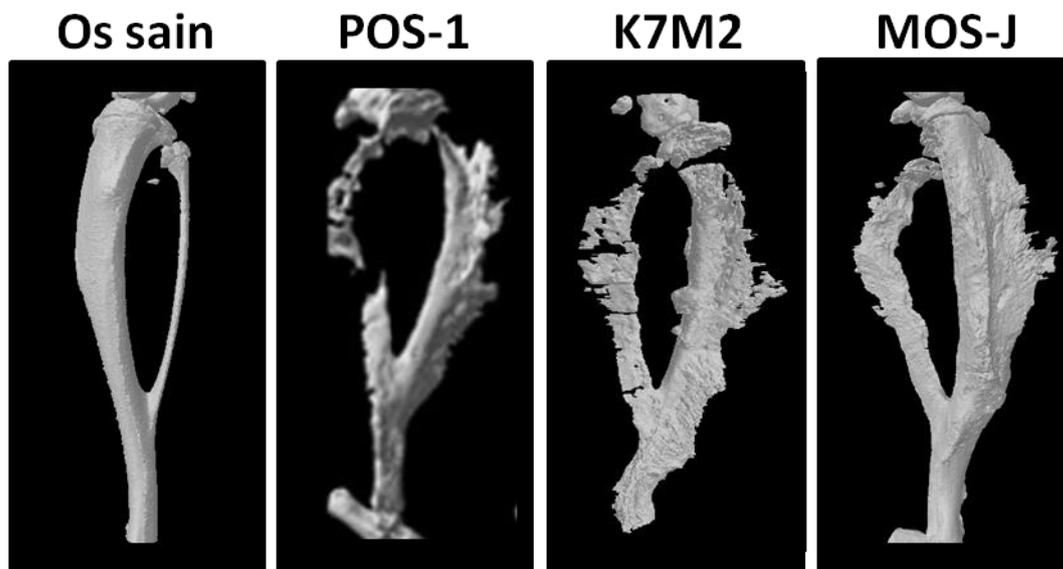


Figure 31 : Microscanner de tibias/péronés sain ou en contact des tumeurs POS-1 (modèle ostéolytique), K7M2 (modèle mixte) et MOS-J (modèle ostéogénique)

Dans un premier temps, le profil d'expression génique a été réalisé sur les cellules cultivées *in vitro* (**Figure 32**). Après extraction de l'ARNm et reverse transcription, l'expression des gènes cibles a été analysée par PCR quantitative dans les trois lignées MOS-J, K7M2 et POS-1. La lignée de référence utilisée ici est la lignée MOS-J, qui est le modèle présentant le moins de lésions ostéolytiques associées à la tumeur. L'expression est donc arbitrairement fixée à 1 pour les différents gènes étudiés. Ainsi, plusieurs gènes ont été identifiés comme étant exprimés plus fortement dans les lignées POS-1 et K7M2 que dans la lignée MOS-J. ADAM8, une métalloprotéase connue pour être associée à une destruction osseuse durant des pathologies inflammatoires^{266,267}, est plus exprimée dans les lignées

POS-1 (d'un facteur 15) et dans la lignées K7M2 (d'un facteur 25) que dans la lignée MOS-J. De même, la cathepsine K, une des protéases majeures de la résorption osseuse, est exprimé respectivement 9 fois et 80 fois plus par les cellules POS-1 et K7M2 que dans les cellules MOS-J. Cependant, la différence d'expression la plus importante entre les deux lignées ostéolytiques et la lignée ostéogénique concerne ADAM12. En effet, cette métalloprotéase est plus exprimée dans les lignées POS-1 et K7M2 (d'un facteur 1000). Enfin, la MMP-2 est le seul gène fortement surexprimé par le modèle MOS-J en comparaison avec le modèle POS-1 (d'un facteur 3) et le modèle K7M2 qui a une expression quasiment nulle.

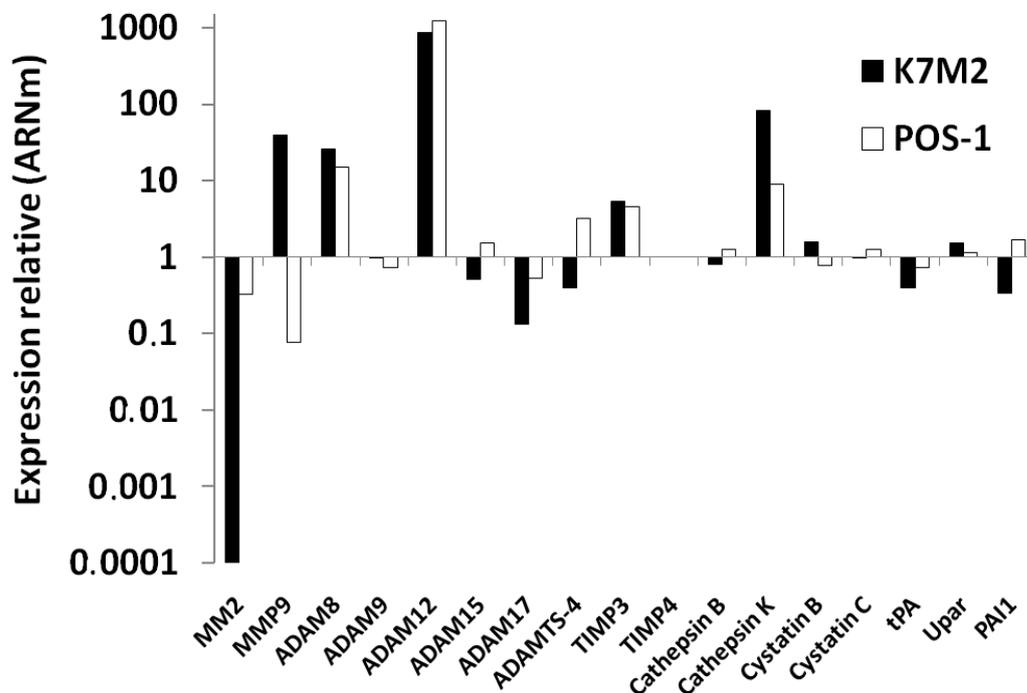


Figure 32 : Analyse de l'expression de différentes protéases dans les modèles POS-1, K7M2 et MOS-J *in vitro*. L'expression est étudiée par RT-qPCR après extraction de l'ARNm à partir des lignées POS-1, K7M2 et MOS-J cultivées *in vitro*. La lignée MOS-J est prise comme lignée de référence (modèle ostéogénique).

Dans un second temps, le profil d'expression génique a été réalisé sur les différents modèles induits *in vivo* (**Figure 33**). Comme précédemment, le modèle de référence est le modèle MOS-J. ADAM8 est une nouvelle fois, mais dans une moindre mesure, surexprimé dans les modèles ostéolytiques. Les modèles POS-1 et K7M2 expriment respectivement 2 fois et 3 fois plus cette protéase. De même, ADAM12 est encore la protéase la plus fortement exprimée par les modèles POS-1 et K7M2, qui l'expriment respectivement 40 fois

et 50 fois plus que le modèle MOS-J. Enfin, la MMP-2 reste une des seules protéases fortement surexprimée par le modèle MOS-J en comparaison avec le modèle POS-1 (d'un facteur 10) et le modèle K7M2 (d'un facteur 250).

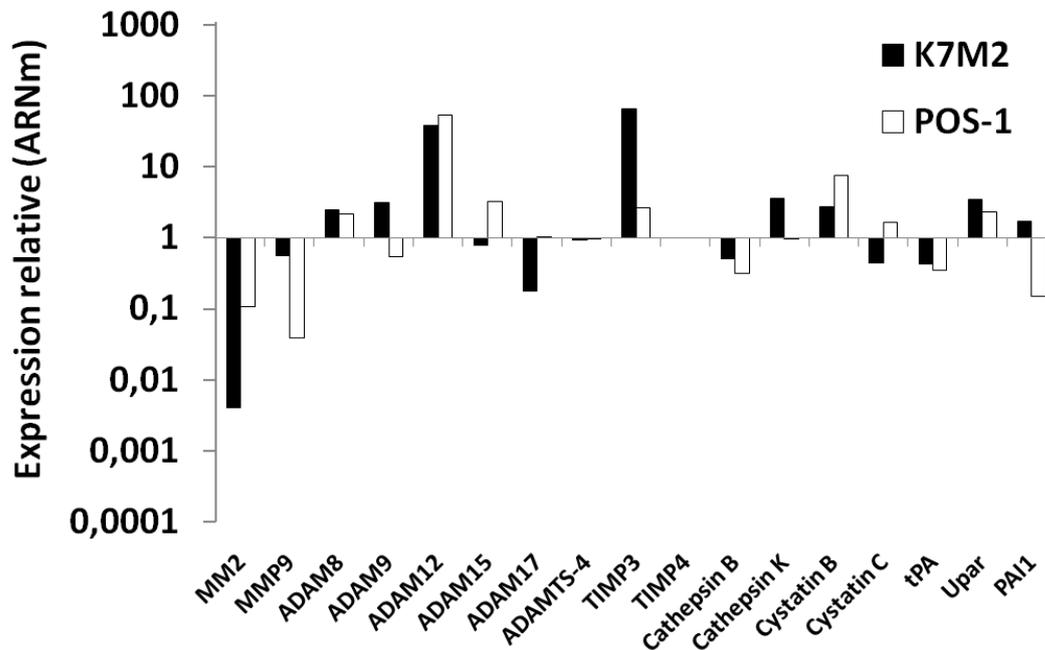


Figure 33 : Analyse de l'expression de différentes protéases dans les modèles POS-1, K7M2 et MOS-J *in vivo*. Les modèles d'ostéosarcome sont induits chez la souris par une injection paratibiale des cellules K7M2 et MOS-J ou par transplantation en paratibial d'un fragment de tumeur POS-1. Après extraction de l'ARNm de fragments tumoraux, l'expression génique de différentes protéases est analysée par RT-qPCR. Le modèle ostéogénique MOS-J est pris comme référence.

ADAM12 est la protéase la plus fortement exprimée dans les modèles ostéolytiques POS-1 et K7M2 par rapport au modèle ostéogénique. ADAM12 est connu pour être un facteur pro-tumoral dans différents types de cancer mais son rôle dans les tumeurs osseuses, primitives ou secondaires, reste encore inconnu. De même, bien qu'il soit exprimé par les différentes cellules osseuses, son action est mal connue. L'influence d'ADAM12 dans le développement des ostéosarcomes est donc à définir et sa surexpression dans les modèles ostéolytiques suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans l'ostéolyse associée à la tumeur et donc dans la croissance tumorale en site osseux.

B. Etudes *in vitro* de l'effet d'ADAM12 sur les cellules d'ostéosarcome

1) Expression d'ADAM12 dans les lignées MOS-J et K7M2 modifiées

Afin d'éclaircir le rôle d'ADAM12 dans le développement des ostéosarcomes, ADAM12 a été respectivement surexprimé dans les cellules MOS-J et inhibé dans les cellules K7M2. La lignée POS-1 n'est pas utilisée par la suite du fait que la prise tumorale chez la souris reste faible (< 20%) et ne permet pas de conduire des expérimentations reproductibles.

Dans un premier temps, nous avons transfecté stablement la lignée MOS-J par un plasmide codant pour ADAM12. Des clones ont été produits, sélectionnés et analysés en comparaison avec les lignées Parental et Mock (transfecté par un plasmide codant pour l'eGFP) pour leur expression de l'ARNm ADAM12. Pour minimiser le risque d'artefacts phénotypiques dû à la sélection de clones, des pools de cellules, composés de quinze clones, ont été générés. Ainsi, les lignées Parental et Mock ont une expression faible d'ADAM12 contrairement à la lignée MOS-J ADAM12 (**Figure 34A**).

Puis, l'expression d'ADAM12 a été inhibée stablement dans les cellules K7M2 par transduction de deux vecteurs lentiviraux différents codant pour un shRNA ciblant l'ARNm ADAM12 (shADAM12.1 et shADAM12.2). En comparaison des lignées Parental et shCT utilisées comme lignées contrôles, les cellules shADAM12.1 et shADAM12.2 sont respectivement caractérisées par une baisse de 80% et de 70% de l'expression d'ADAM12 (**Figure 34B**). Les deux shRNAs testés sont donc efficaces. Le shADAM12.1 présente un taux d'inhibition de l'expression d'ADAM12 supérieur.

L'absence d'anticorps efficaces pour la détection de la protéine murine ADAM12 ne nous a pas permis de confirmer ces différences d'expression au niveau protéique.

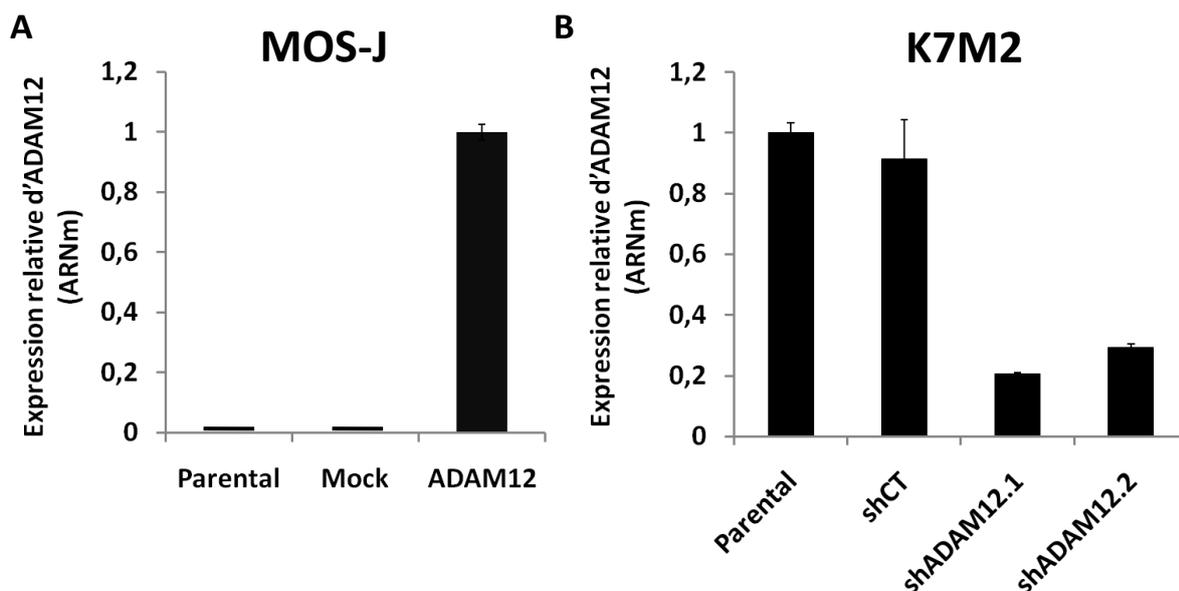


Figure 34 : Etude de l'expression génique d'ADAM12 dans les modèles MOS-J (Parental, Mock et ADAM12) et K7M2 (Parental, shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2). L'ARNm est extrait des cellules cultivées *in vitro* et l'expression d'ADAM12 est analysée par RT-qPCR. **A)** Dans les lignées MOS-J contrôles (Parental et Mock) ou transfectée par le plasmide Lv105 codant pour ADAM12 (ADAM12). **B)** Dans les lignées K7M2 contrôles (Parental, shCT) ou transduites par un shRNA ciblant l'ARNm ADAM12 (shADAM12.1 et shADAM12.2).

2) Effet d'ADAM12 sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome

ADAM12 semble jouer un rôle sur la prolifération cellulaire, notamment via sa capacité à libérer des facteurs de croissance tels que l'EGF. Cependant, son rôle sur la prolifération des cellules ostéosarcomateuses reste encore à déterminer. A cette fin, la prolifération des cellules MOS-J Mock et ADAM12 d'une part, et des cellules K7M2 shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 d'autre part, a été analysée. Pour cela, les différentes lignées ont été ensemencées en plaque 24 puits à raison de 1000 cellules par puits. La prolifération cellulaire est évaluée par comptage cellulaire au bleu trypan.

Six jours après l'ensemencement des cellules MOS-J, nous observons une augmentation de 50% du nombre de cellules MOS-J surexprimant ADAM12 par rapport au nombre de cellules contrôles Mock. Dans les lignées K7M2, le nombre de cellules K7M2 shADAM12.1 et shADAM12.2 est respectivement diminué de 75% et 50% par rapport au nombre de cellules shCT sept jours après l'ensemencement. De plus, la lignée shADAM12.1, qui exprime le plus faiblement ADAM12, a une capacité de prolifération plus faible que la lignée shADAM12.2 (50% d'inhibition de prolifération).

L'ensemble de ces résultats montre qu'ADAM12 a un effet pro-prolifératif dans les lignées d'ostéosarcome murin K7M2 et MOS-J.

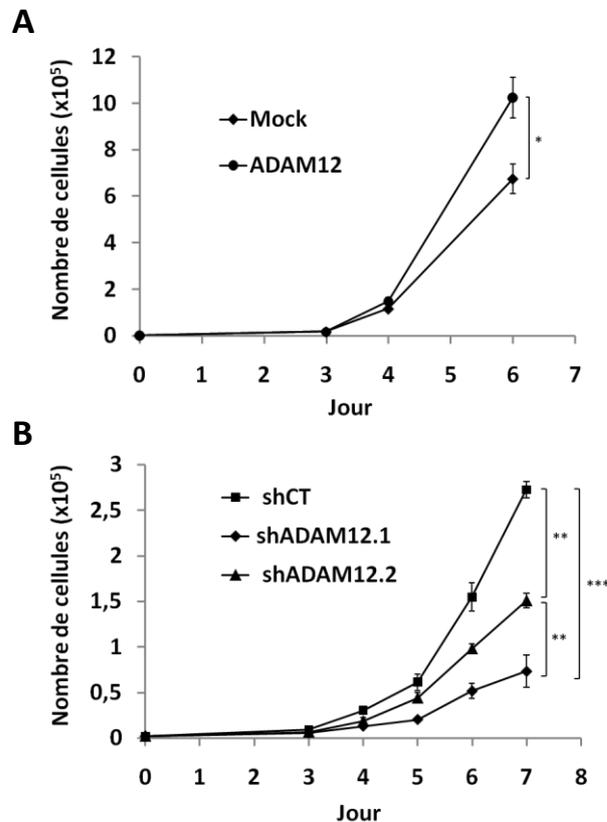


Figure 35 : Etude de l'effet d'ADAM12 sur la prolifération cellulaire des modèles MOS-J et K7M2 *in vitro*. **A**) 1000 cellules MOS-J (Mock ou ADAM12) par puits sontensemencées en plaque 24 puits à J0 et le nombre de cellules est évalué à J4 et J6 par comptage cellulaire par la méthode d'exclusion au bleu trypan. **B**) 1000 cellules K7M2 (shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2) par puits sontensemencées en plaque 24 puits à J0 et le nombre de cellules est évalué à J3, J4, J5, J6 et J7 par comptage cellulaire par la méthode d'exclusion au bleu trypan. **p<0,01 ; *** p<0,001

C. Etudes *in vivo* du rôle d'ADAM12 dans le développement des ostéosarcomes

1) Effets d'ADAM12 sur la croissance tumorale

Le rôle d'ADAM12 sur la croissance tumorale a tout d'abord été évalué dans le modèle ostéogénique MOS-J. Les lignées MOS-J Parental, Mock et ADAM12 ont été injectées en site paratibial dans des souris C57BL/6J. Nous observons dans un premier temps que le taux de prise tumorale (développement d'une tumeur palpable au site d'injection) est de 100% pour les différents modèles 25 jours après l'injection (**Figure 36A**).

La croissance tumorale est ensuite suivie pour chaque souris en mesurant la taille de la tumeur trois fois par semaine. Comme montré dans la **Figure 36B**, la surexpression d'ADAM12 augmente très significativement la croissance tumorale. En effet, les volumes tumoraux moyens sont respectivement $770 \pm 42 \text{ mm}^3$ et de $975 \pm 90 \text{ mm}^3$ à jour 25 chez les souris injectées par les cellules MOS-J contrôles Parental et Mock, alors que le volume tumoral moyen chez les souris injectées par les cellules MOS-J surexprimant ADAM12 est de $2200 \pm 120 \text{ mm}^3$. Ainsi, cette surexpression d'ADAM12 accélère la croissance tumorale du modèle expérimental MOS-J de 250% (**Figure 36C**) et diminue fortement la survie des animaux (**Figure 36D**). En effet, 29 jours après l'injection des cellules tumorales, tous les animaux des groupes ADAM12 sont sacrifiés pour des raisons éthiques (le volume tumoral est supérieur à 2000 mm^3) alors que 100% des souris des groupes Parental et Mock n'ont pas atteint ce volume tumoral.

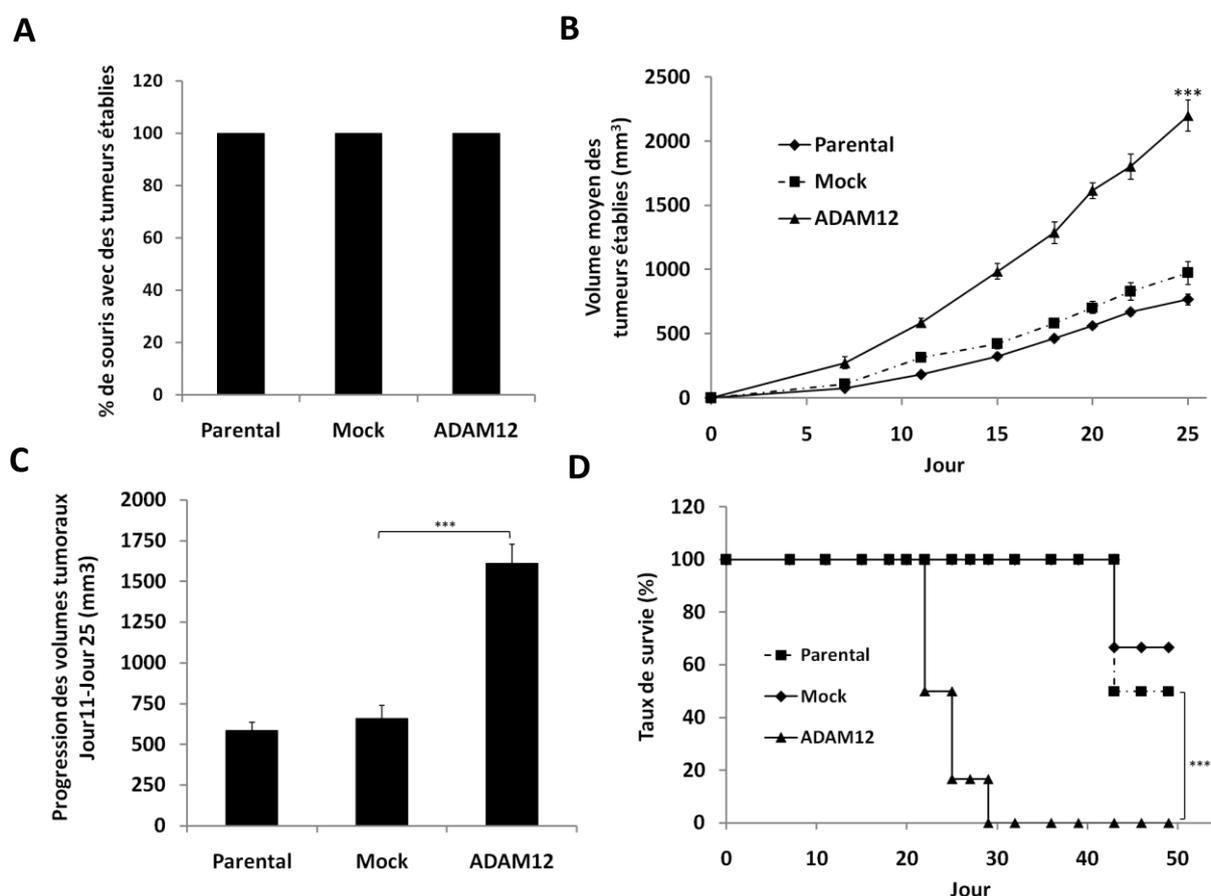


Figure 36 : Analyse de l'effet d'ADAM12 sur le développement du modèle d'ostéosarcome murin MOS-J *in vivo*. Trois millions de cellules MOS-J Parental, Mock ou ADAM12 sont injectés en site paratibial dans des souris C57BL/6J (n=6). **A**) Pourcentage de souris avec des tumeurs établies 25 jours après l'injection (moyenne de trois expériences indépendantes). **B**) Moyenne des volumes tumoraux dans les groupes Parental, Mock et ADAM12. **C**) Moyenne de la progression tumorale entre les jours 11 et 25. **D**) Taux de survie des souris en fonction du temps après l'injection des cellules tumorales. Le point final correspond au jour de sacrifice des souris dont le volume tumoral $> 2000 \text{ mm}^3$. *** $p < 0,001$

Une étude *in vivo* a été réalisée avec le modèle K7M2 sous-exprimant ADAM12. Nous observons dans un premier temps une baisse importante du nombre de souris développant une tumeur chez les souris injectées par les cellules K7M2 sous-exprimant ADAM12 (shADAM12.1 et shADAM12.2) en comparaison des groupes contrôles (Parental et shCT). En effet, le pourcentage de prise tumorale (moyenne de trois expériences indépendantes) est respectivement de 65% et 70% dans les groupes Parental et shCT et chute à 0% et 10% dans les groupes shADAM12.1 et shADAM12.2 (**Figure 37A**). Les cellules ayant la plus forte inhibition de l'expression d'ADAM12 (shADAM12.1) ne forment donc aucune tumeur. Dans la suite des résultats, seules les souris ayant développées une tumeur [Parental (7 souris sur 10), shCT (9 souris sur 10) et shADAM12.2 (3 souris sur 10)] sont prises en compte dans le calcul des volumes tumoraux moyens, de la progression tumorale et de la survie. Le groupe shADAM12.1 n'est donc pas représenté. Une baisse de l'expression d'ADAM12 ralentit également sensiblement la croissance tumorale. Au trente-neuvième jour, les volumes tumoraux moyens sont respectivement de $2000 \pm 128 \text{ mm}^3$ et de $1775 \pm 78 \text{ mm}^3$ pour les souris injectées par les cellules Parental et shCT contre $870 \pm 165 \text{ mm}^3$ pour les souris injectées par les cellules shADAM12.2 (**Figure 37B**). ADAM12 joue également un rôle dans la progression tumorale dans le modèle K7M2. Entre le quinzième et le vingt-sixième jour, la progression des volumes tumoraux moyens est de $1450 \pm 100 \text{ mm}^3$ et $1200 \pm 95 \text{ mm}^3$ dans les groupes contrôles Parental et shCT et de $765 \pm 140 \text{ mm}^3$ dans le groupe shADAM12.2 (**Figure 37C**). Enfin, la sous-expression d'ADAM12 augmente la survie des animaux (**Figure 37D**). 53 jours après l'injection des cellules tumorales, tous les animaux des groupes contrôles sont sacrifiés alors que 33% des souris du groupe shADAM12.2 n'ont pas atteint un volume tumoral de 2000 mm^3 .

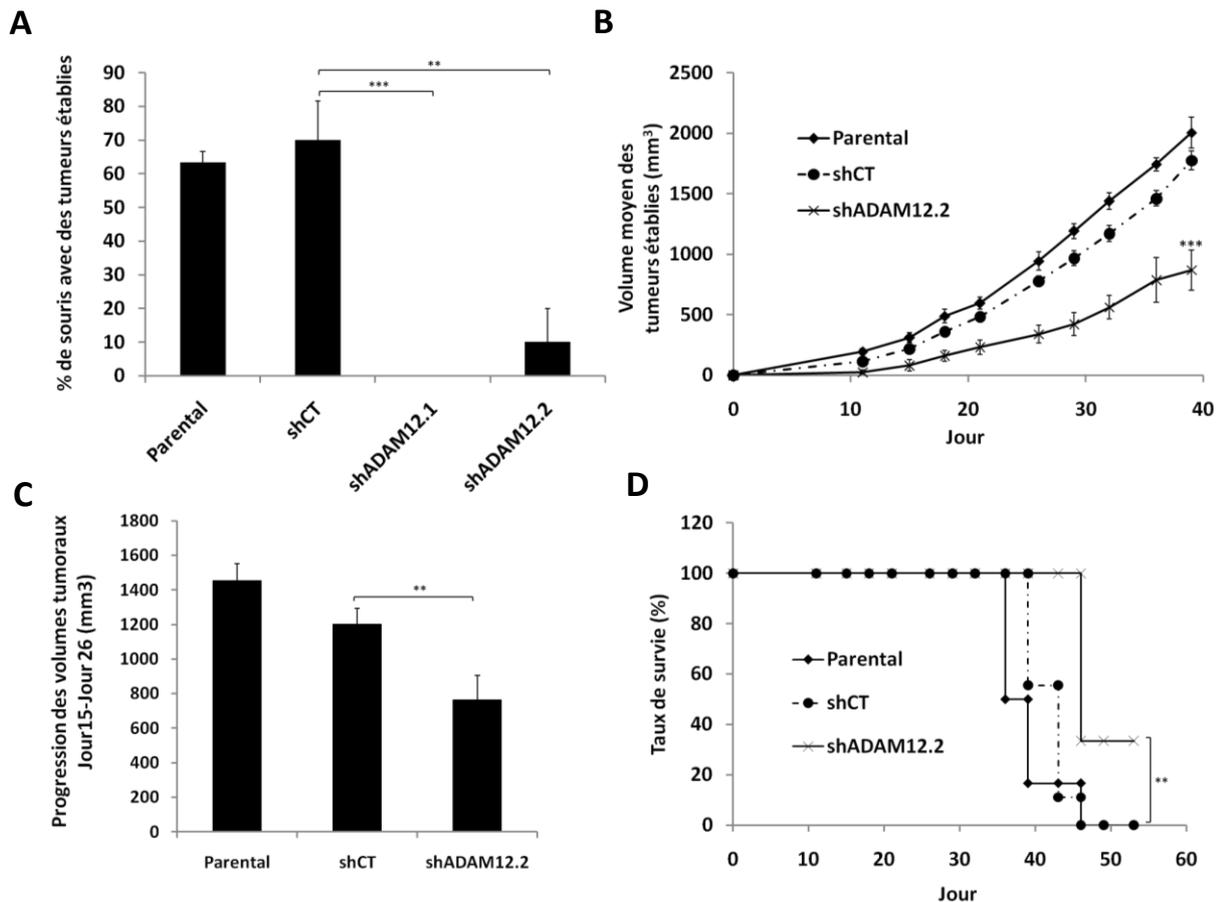


Figure 37 : Analyse de l'effet d'ADAM12 sur le développement du modèle d'ostéosarcome murin K7M2 *in vivo*. Trois millions de cellules K7M2 Parental, shCT, shADAM12.1 ou shADAM12.2 sont injectés en site paratibial dans des souris BALB/cByJ (n=10). **A**) Pourcentage de souris avec des tumeurs établies 35 jours après l'injection (moyenne de trois expériences indépendantes). **B**) Moyenne des volumes tumoraux dans les groupes Parental, shCT et shADAM12.2. **C**) Moyenne de la progression tumorale entre les jours 15 et 26. **D**) Taux de survie des souris en fonction du temps après l'injection des cellules tumorales. Le point final correspond au jour de sacrifice des souris dont le volume tumoral > 2000 mm³. ** p<0,01 ; *** p<0,001

ADAM12 montre donc, *in vivo*, un impact sur la croissance tumorale. Son induction augmente la progression tumorale tout en diminuant la survie des animaux. De façon concordante, son inhibition présente un profil opposé avec de façon intéressante, une inhibition de la prise tumorale. Ces données confirment un effet pro-tumoral d'ADAM12 et montre pour la première fois un rôle de cette protéase dans le mécanisme d'implantation tumorale en site osseux.

2) Analyse de l'effet d'ADAM12 sur la microarchitecture osseuse

Le remodelage osseux joue un rôle central durant le développement et la progression de l'ostéosarcome, nous avons donc évalué la capacité d'ADAM12 à moduler la résorption et la néoformation osseuse. A cette fin, la microarchitecture osseuse a été examinée par microscanner après le sacrifice des animaux à un volume tumoral équivalent (2000 mm^3). Nous avons calculé dans un premier temps le BV/TV total (Bone volume/Total Volume) qui permet d'évaluer le volume d'os total. Le volume d'os trabéculaire a également été quantifié par le calcul du BV/TV de la zone trabéculaire située sous la plaque de croissance (sur 10% de la longueur totale du tibia).

Dans le modèle MOS-J, la reconstruction de la structure osseuse du tibia et du péroné suggère qu'une surexpression d'ADAM12 augmente l'ostéolyse associée à la tumeur (**Figure 38A**). Cependant, aucune modification significative n'est constatée pour le BV/TV total (**Figure 38B**). Le volume d'os au sein du tissu trabéculaire a été donc ensuite quantifié. A volume tumoral équivalent (2000 mm^3), nous observons une baisse de 70% du BV/TV de la zone trabéculaire dans les souris du groupe surexprimant ADAM12 par rapport aux groupes contrôles (**Figure 38D**), suggérant ainsi une augmentation de l'ostéolyse paratumorale dans le modèle MOS-J ADAM12.

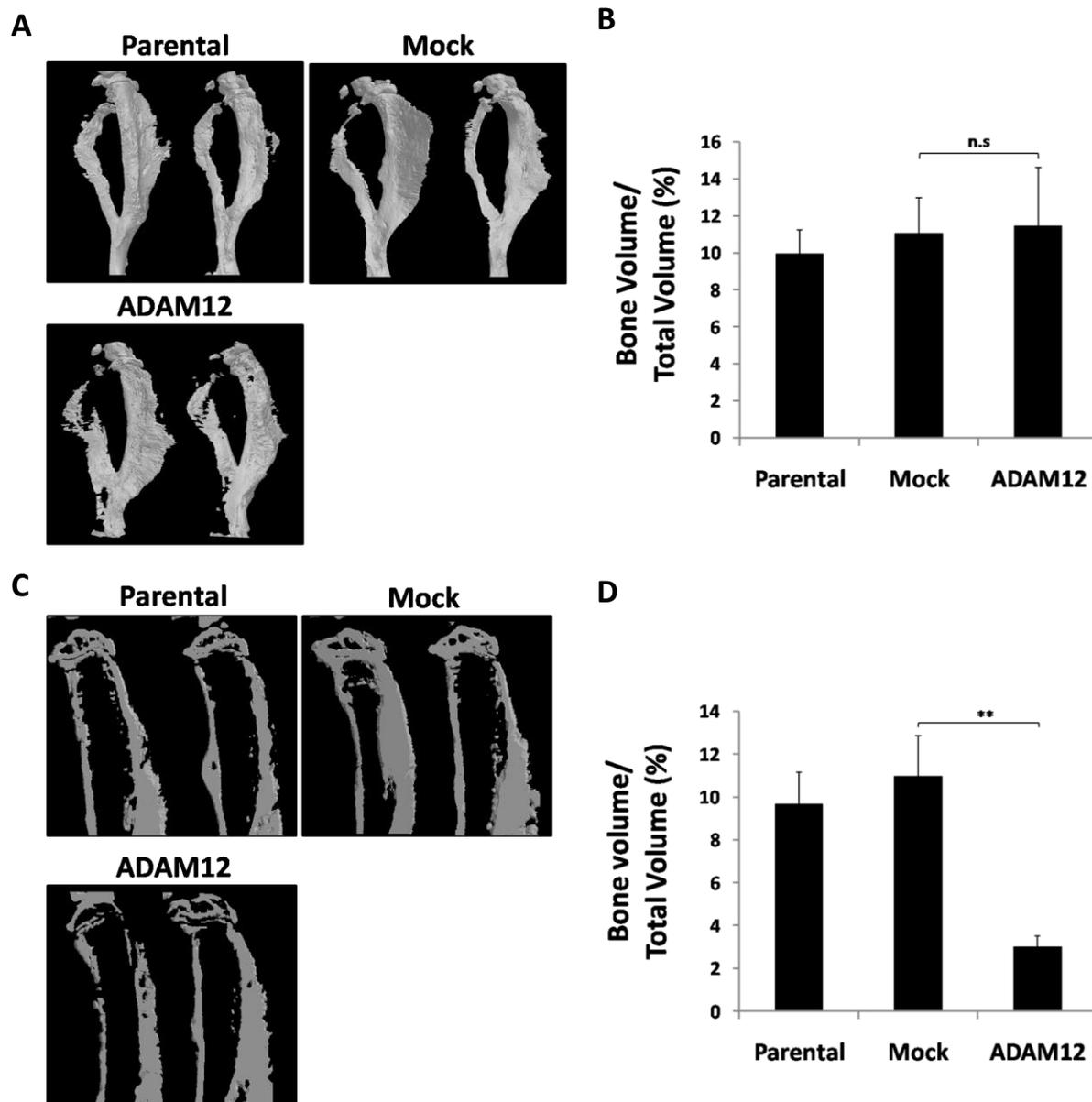


Figure 38 : Comparaison de la microarchitecture osseuse par microscanner des modèles *MOS-J Parental*, *Mock* et *ADAM12*. Trois millions de cellules *MOS-J Parental*, *Mock* ou *ADAM12* sont injectés en site paratibial dans des souris C57BL/6J (n=6). Après sacrifice des animaux à un volume tumoral équivalent (2000 mm³), la microarchitecture osseuse des tibias/péronés est analysée. **A**) Reconstruction 3D des tibias/péronés des souris des groupes Parental, Mock et ADAM12. **B**) Le volume osseux spécifique total est évalué en calculant le BV/TV (Bone Volume/Total Volume, exprimé en %). **C**) Coupe longitudinale des tibias de souris des groupes Parental, Mock et ADAM12. **D**) Le volume d'os trabéculaire spécifique est évalué en calculant le BV/TV (Bone Volume/Total Volume). Dans ce cas, la région d'intérêt correspond à la zone trabéculaire située sous la plaque de croissance. ** p<0,01

Une analyse de la microarchitecture a été réalisée avec le modèle K7M2. Nous observons une augmentation du volume d'os total dans le groupe sous-exprimant ADAM12 shADAM12.2 (BV/TV de 9%) en comparaison des groupes Parental et shCT (BV/TV de respectivement 6,61% et 6%) (**Figure 39B**). Les souris du groupe shADAM12.1, qui ne développent pas de tumeurs palpables, ne présentent aucune atteinte osseuse visible. Enfin, l'inhibition de l'expression d'ADAM12 aboutit à une diminution de l'ostéolyse associée à la tumeur comme le montrent les analyses du volume de l'os trabéculaire des souris de chaque groupe (**Figure39D**). En effet, à volume tumoral équivalent (2000 mm³), les souris des groupes Parental et shCT présentent un BV/TV de la zone trabéculaire de 3,70% et de 3,45% alors que les souris des groupes shADAM12.2 ont un BV/TV de 7,20%.

ADAM12 joue donc un rôle important dans le développement tumoral en site osseux en induisant l'ostéolyse associée à la tumeur dans les modèles MOS-J et K7M2. Néanmoins, l'ostéolyse induit par ADAM12 dans le modèle MOS-J ne se traduit pas par une baisse significative du volume osseux total. Le modèle MOS-J étant un modèle très ostéogène, il est difficile d'observer des modifications significativement différentes sur l'os total. Ces modifications sont cependant observables sur l'os trabéculaire, qui est une zone moins assujettie à une néoformation osseuse induite par les cellules tumorales. Dans le modèle K7M2 (modèle moins ostéogène et plus ostéolytique), nous observons à la fois une augmentation du volume d'os total et une augmentation du volume d'os trabéculaire. Il reste cependant à déterminer si cette augmentation du volume osseux total est due à une baisse de l'ostéolyse, à une augmentation de l'ostéoformation ou à une association de ces deux processus.

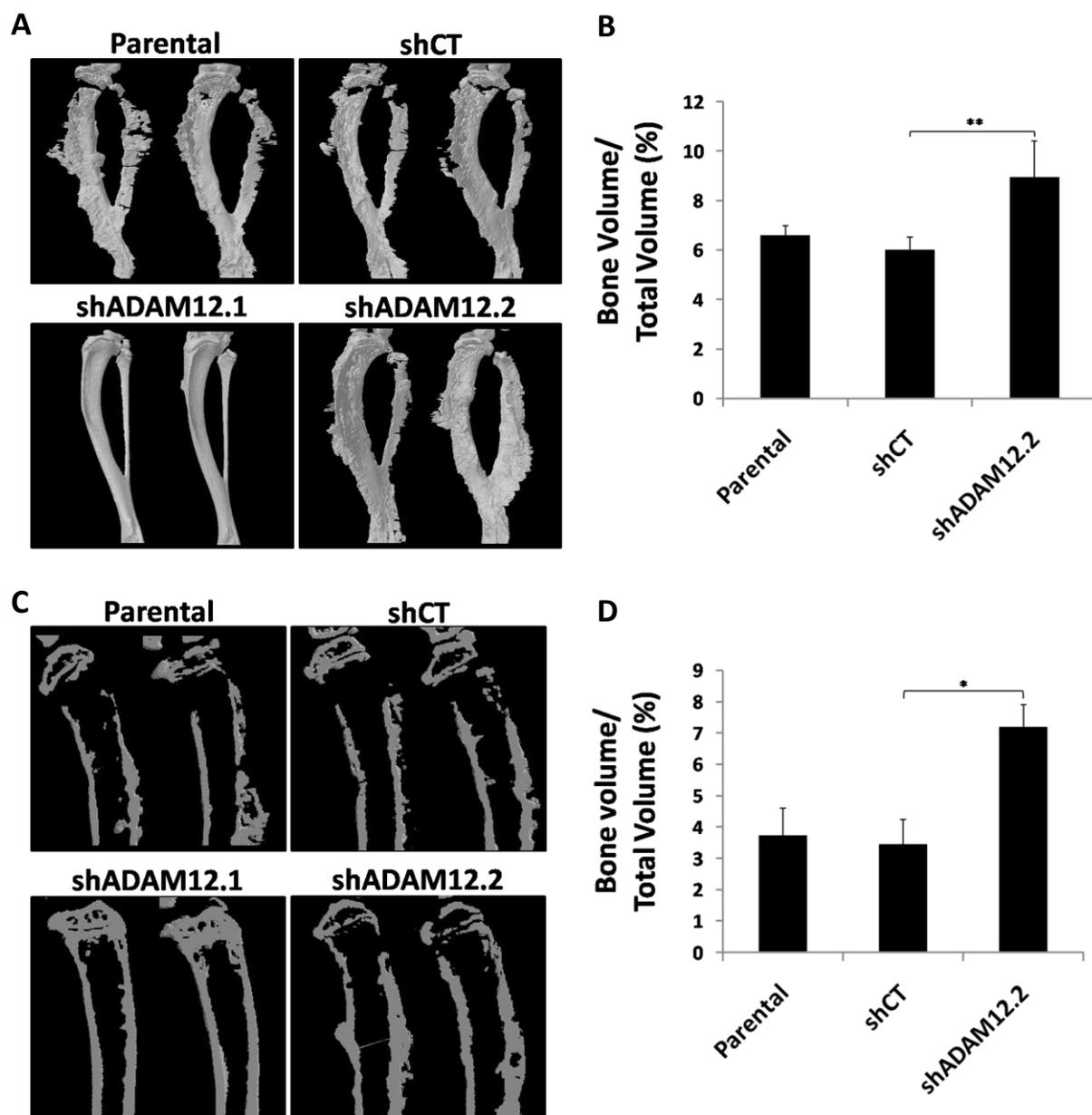


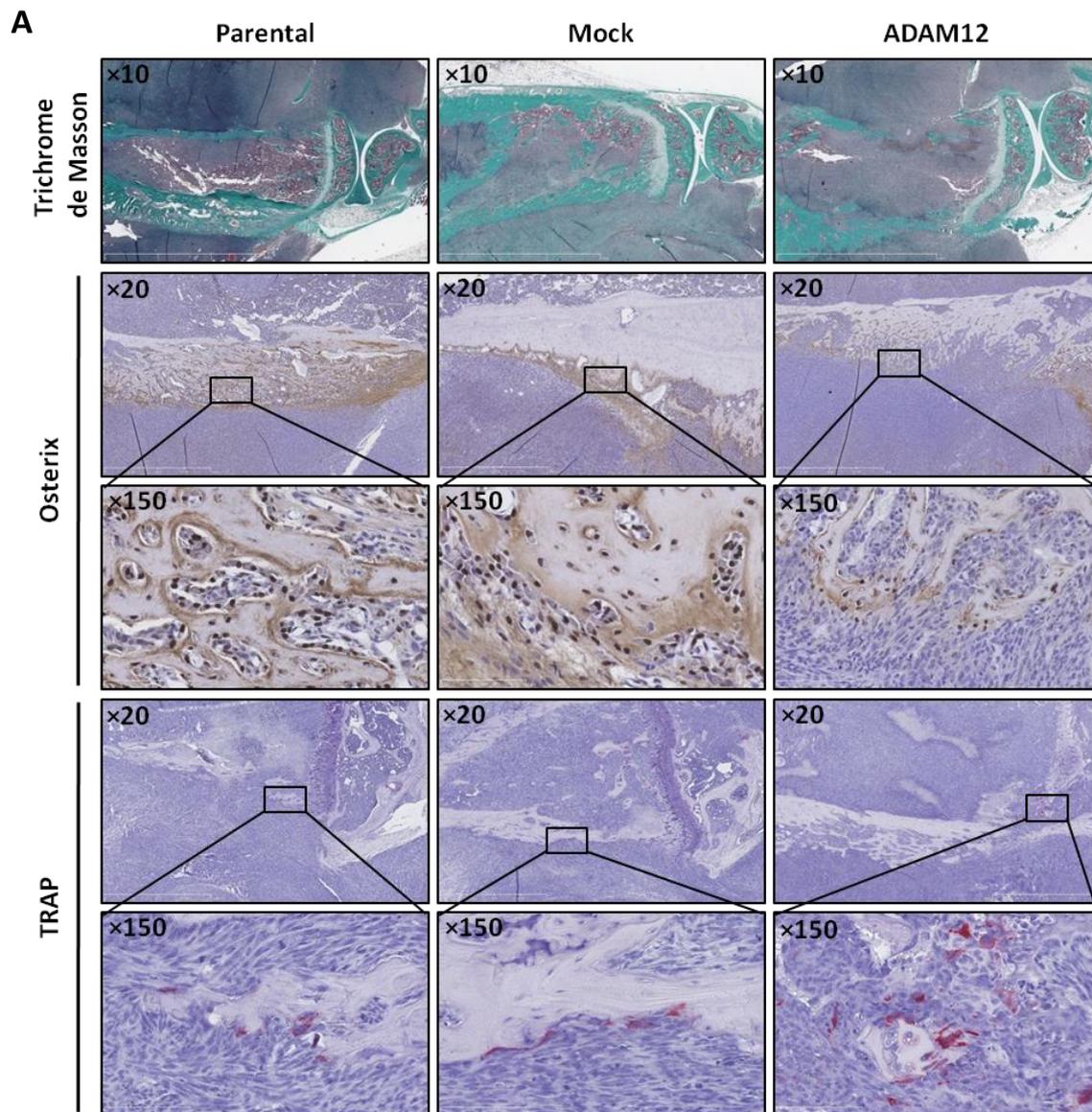
Figure 39 : Etude de la microarchitecture osseuse par microscanner des modèles K7M2 Parental, shCT et shADAM12.2. Trois millions de cellules K7M2 Parental, shCT, shADAM12.1 ou shADAM12.2 sont injectés en site paratibial dans des souris BALB/cByJ (n=10). Après sacrifice des animaux à un volume tumoral (2000 mm³), la microarchitecture osseuse des tibias/péronés est analysée. **A)** Reconstruction 3D des tibias/péronés des souris des groupes Parental, shCT, shADAM12.1 ou shADAM12.2. **B)** Le volume d'os total est évalué en calculant le BV/TV (Bone Volume/Total Volume). **C)** Coupe longitudinale des tibias de souris des groupes Parental, shCT, shADAM12.1 ou shADAM12.2. **D)** Le volume d'os trabéculaire est évalué en calculant le BV/TV (Bone Volume/Total Volume). La région d'intérêt correspond à la zone trabéculaire, située sous la plaque de croissance. * p<0,05 ; ** p<0,01

3) Analyse histologique

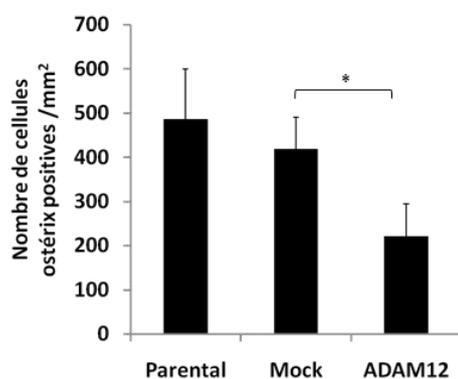
Afin de déterminer l'influence d'ADAM12 sur le phénotype osseux associé à la tumeur, l'activité des cellules multinucléées TRAP positives et le nombre d'ostéoblastes a été évalué par histologie et immunohistologie après sacrifice des animaux à un volume tumoral équivalent (2000 mm^3). En effet, ces deux lignées cellulaires sont impliquées dans le remodelage osseux, les cellules multinucléées TRAP positives (parmi lesquelles les ostéoclastes actifs) étant responsable de l'ostéolyse et les cellules ostéoblastiques étant responsable de la formation osseuse. Trois types d'analyse ont ainsi été menés :

- *Coloration Trichrome de Masson* : met en évidence la matrice osseuse en vert et les cellules de la moelle osseuse en rouge.
- *Immunomarquage d'ostérix* : facteur de transcription impliqué dans la différenciation ostéoblastique
- *Coloration TRAP* : met en évidence l'activité enzymatique de TRAP, une protéine fortement exprimée par les ostéoclastes activés.

Dans le modèle MOS-J, la coloration trichrome de Masson montre une dégradation plus importante de l'os cortical et trabéculaire au niveau de la tête tibiale dans le groupe MOS-J ADAM12 que dans les groupes contrôles Parental et Mock (**Figure 40A**), corroborant ainsi les résultats obtenus précédemment lors l'analyse microscanner. Puis, le nombre de cellules ostérix positives a été évalué au sein de l'os ectopique, une zone caractérisée par une activité ostéoblastique importante, par un immunomarquage d'ostérix (**Figure 40B**). Une baisse du nombre de cellules ostérix positives est observée dans les souris du groupe ADAM12 ($80 \text{ ostéoblastes par mm}^2$) par rapport aux groupes Parental ($175 \text{ cellules ostérix positives par mm}^2$) et Mock ($150 \text{ cellules ostérix positives par mm}^2$). Enfin, l'activité TRAP a été analysée (**Figure 40B**). Les résultats sont ici exprimés en pourcentage de surface colorée en rouge par coupe. Les groupes Parental et Mock présentent une surface de coloration TRAP respectivement de 0,14% et de 0,12% alors que cette valeur est supérieure pour le groupe ADAM12 (0,29%).



B



C

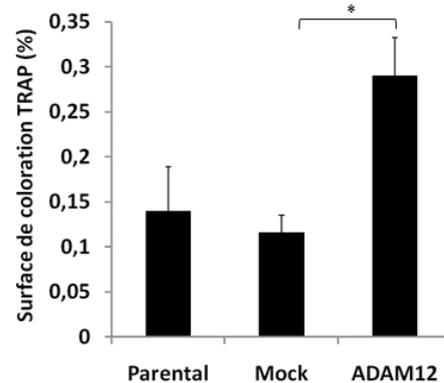


Figure 40 : Etude histologique et immunohistologique de l'effet d'ADAM12 sur les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques dans le modèle MOS-J. Après sacrifice des animaux à un volume tumoral équivalent (2000mm³) des groupes MOS-J Parental, Mock et ADAM12, les tumeurs ont été fixées, incluses en paraffine, coupées et déposées entre lame et lamelle. **A**) Coloration trichrome de Masson, TRAP et marquage immunohistologique d'ostérix. **B**) Nombre d'ostéoblastes par mm². **C**) Quantification de l'activité TRAP (en % de surface marqué en rouge). * p<0,05

Des analyses histologiques ont été réalisées pour le modèle K7M2 (**Figure 41**). Comme observé lors de l'analyse de la microarchitecture osseuse, la coloration au trichrome de Masson montre une baisse de la dégradation de l'os cortical et trabéculaire dans le groupe shADAM12.2 que dans les groupes Parental et Mock. De plus, l'immunomarquage d'ostérix révèle une augmentation du nombre de cellules ostérix positives au niveau de l'os néoformé pour le groupe shADAM12.2 (45 cellules ostérix positives par mm²) par rapport aux groupes Parental et Mock [respectivement 12 cellules Ostérix positives par mm² et 10 cellules ostérix positives par mm²] (**Figure 41**). Cependant, la coloration TRAP est quasiment nulle pour chaque groupe. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les ostéoclastes seraient actifs dans des stades plus précoces du développement tumoral dans le modèle K7M2 et il sera donc nécessaire de réaliser des analyses complémentaires à des volumes tumoraux plus faibles (environ 500-1000 mm³).

Ainsi, ADAM12 pourrait donc contrôler l'ostéolyse et la néoformation osseuse associée à la tumeur en stimulant l'activité ostéoclastique et en diminuant l'activité ostéoblastique. Ces résultats obtenus par des analyses histologiques et immunohistologiques restent cependant à confirmer.

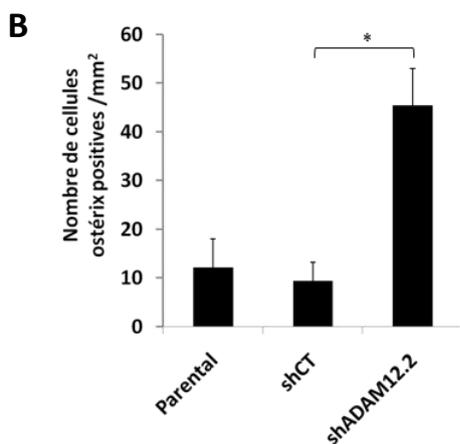
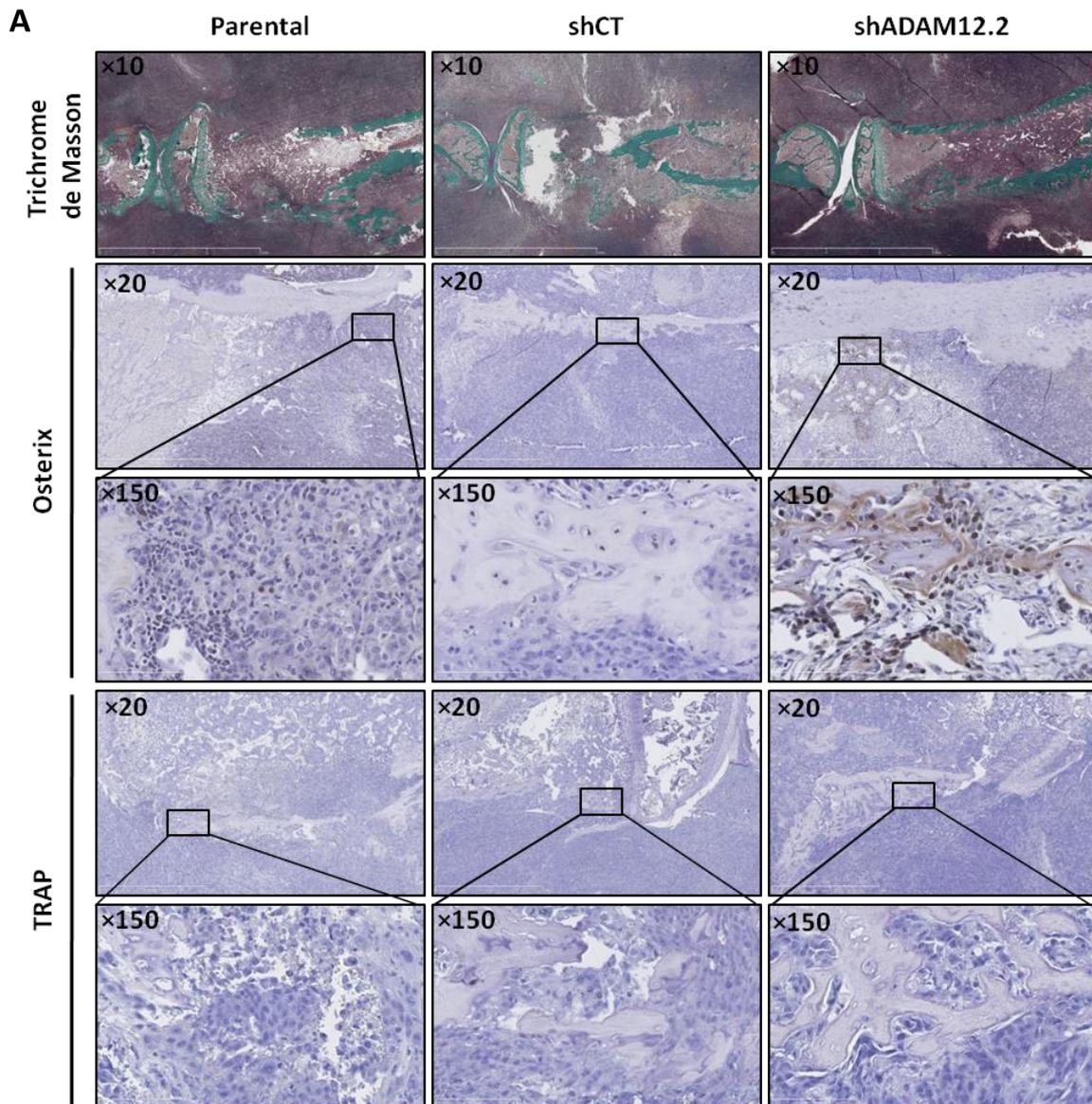


Figure 41 : Etude histologique et immunohistologique de l'effet d'ADAM12 sur les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques dans le modèle K7M2. Après sacrifice des animaux à un volume tumoral équivalent (2000 m³) des groupes K7M2 Parental, shCT et shADAM12.2, les tumeurs ont été fixées, incluses en paraffine, coupées et déposées entre lame et lamelle. **A**) Coloration trichrome de Masson, TRAP et marquage immunohistologique d'ostérix. **B**) Nombre d'ostéoblastes par mm². * p<0,05

DISCUSSION

Les protéases, que ce soit les métalloprotéases, les protéases à sérine ou encore les cathepsines, sont impliquées dans la plupart des processus physiologiques et pathologiques. Elles sont par exemple essentielles au développement des cancers participant aux processus de migration, d'invasion, d'angiogenèse ou encore d'inflammation. Dans la physiologie osseuse, les protéases participent à l'équilibre existant entre l'ostéoformation et l'ostéolyse via leur activité protéasique, en dégradant la matrice osseuse mais également en libérant des facteurs solubles tels que RANKL ou le TNF- α . L'influence des protéases sur le développement des ostéosarcomes est mal définie mais du fait de ce double-rôle dans la cancérogenèse et l'homéostasie osseuse, elles pourraient participer au cercle vicieux qui se met en place entre croissance tumorale et ostéolyse.

En analysant dans un premier temps l'expression de protéases dans trois lignées d'ostéosarcome, nous avons observé une expression supérieure d'ADAM12 par les lignées ostéolytiques POS-1 et K7M2, en comparaison de celle observée pour la lignée ostéogénique MOS-J. Le rôle de cette métalloprotéase dans les pathologies tumorales semble être établi. En effet, ADAM12 est impliqué dans la croissance tumorale et dans le remodelage du microenvironnement tumoral de différents types de cancer tels que le cancer du sein ²⁵⁰, de la vessie ²⁵⁵, du poumon ²⁵⁷ ou encore du cerveau ²⁵¹. Cependant, le rôle d'ADAM12 dans la physiologie osseuse est encore mal connu, bien qu'il soit exprimé par les différentes cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes et chondrocytes) et qu'il semble être impliqué dans l'ostéoclastogenèse ²⁴⁷.

L'analyse de la prolifération des cellules *in vitro* a montré que la lignée cellulaire K7M2 prolifère moins rapidement lorsque l'expression du gène *ADAM12* est inhibée par des shRNAs spécifiques. De plus, la lignée cellulaire MOS-J présente une augmentation de sa capacité de prolifération quand ADAM12 est surexprimé. L'ensemble de ces résultats suggère fortement qu'ADAM12 régule positivement la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Le détail des mécanismes expliquant cet effet reste encore à définir. Une hypothèse probable concerne l'activité protéasique d'ADAM12 dans le relargage de facteurs de croissance qui jouent un rôle central dans la prolifération cellulaire. De nombreux facteurs de croissance sont initialement synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires inactifs qui sont activés par un clivage protéolytique. Parmi ces facteurs activés par ADAM12, les familles de ligands de l'EGFR/HER sont des candidats potentiels. En effet, la fixation d'un ligand sur le récepteur EGFR déclenche l'activation de plusieurs

voies de signalisation parmi lesquelles les voies des MAPK, de PI3K et des JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) qui sont toutes impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire²⁶⁸. En outre, des études réalisées *in vitro* ont démontré que l'activation du récepteur EGFR stimule la prolifération des cellules d'ostéosarcome²⁶⁹. Ainsi, ADAM12 pourrait indirectement augmenter la prolifération cellulaire par des mécanismes autocrines dans l'ostéosarcome.

Grâce à des expériences *in vivo*, nous avons démontré qu'ADAM12 régule la prise tumorale. Une sous-expression d'ADAM12 dans le modèle K7M2 diminue très fortement le pourcentage de souris développant une tumeur après injection intramusculaire de cellules d'ostéosarcome. Le modèle MOS-J, ayant une prise tumorale de 100%, ne permet pas de conclure sur un effet pro-implantatoire d'ADAM12. La capacité d'ADAM12 à se lier à des intégrines ou à des syndecans via ses domaines disintégrine et riches en cystéines pourrait expliquer l'implication d'ADAM12 sur la prise tumorale en site osseux. En effet, ADAM12 favorise l'adhésion cellulaire en interagissant avec les intégrines $\alpha 9\beta 1$ ^{212,213}, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ²¹⁵ mais aussi avec des protéoglycanes riches en héparanes sulfates, notamment le syndecan-4^{217,218}. Une seconde hypothèse concerne la capacité de la tumeur à échapper au système immunitaire. ADAM12 pourrait libérer des facteurs inhibant l'action du système immunitaire permettant ainsi à la tumeur de se développer. Cependant, aucun facteur décrit comme étant un substrat d'ADAM12 ne semble pouvoir jouer ce rôle.

En plus d'influer sur la prise tumorale, ADAM12 favorise la croissance tumorale des ostéosarcomes. En effet, nous observons une forte augmentation de la progression tumorale dans le modèle MOS-J surexprimant ADAM12 et une inhibition dans le modèle K7M2 sous-exprimant ADAM12. Cet effet pourrait s'expliquer en partie par la capacité d'ADAM12 à moduler la prolifération cellulaire comme expliqué précédemment ou à modifier le microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, la présence d'un cercle vicieux, qui s'établit entre prolifération tumorale et dégradation de la matrice osseuse, joue un rôle crucial dans le développement des tumeurs osseuses primitives. Les cellules cancéreuses produisent des facteurs solubles qui agissent sur les ostéoblastes mais également sur la différenciation et l'activation des ostéoclastes. En retour, au cours de la dégradation osseuse, les ostéoclastes libèrent des facteurs supportant la croissance tumorale emprisonnés dans la matrice osseuse. Nous avons montré ici qu'ADAM12 exprimé par les cellules d'ostéosarcome favorise l'ostéolyse paratumorale. En effet, le volume d'os trabéculaire

diminue dans le modèle MOS-J surexprimant ADAM12 et augmente lorsque l'on inhibe son expression dans le modèle K7M2. Cet effet pourrait être dû à une activité pro-ostéoclastique et anti-ostéoblastique d'ADAM12 comme le montrent les analyses histologiques et immunohistologiques. ADAM12 pourrait donc faciliter le développement des ostéosarcomes à deux niveaux du cercle vicieux en favorisant la prolifération tumorale mais également en induisant l'ostéolyse paratumorale.

Cet effet pro-ostéolytique et anti-ostéoblastique peut s'expliquer par les facteurs libérés par l'activité protéasique d'ADAM12. Comme expliqué précédemment, ADAM12 est capable de libérer différents ligands de l'EGFR tels que l'EGF, HB-EGF et la betacellulin²⁷⁰. L'EGFR a rôle important dans la biologie osseuse en jouant à différents niveaux (**Figure 42**). Des études menées *in vitro* montrent que l'activation de ce récepteur stimule la prolifération des cellules pré-ostéoblastiques mais inhibe leur différenciation en ostéoblastes matures^{271,272}. Ce concept a été conforté par des expériences *in vivo*. En effet, des souris déficientes pour EGFR présentent un retard de croissance, dû notamment à une baisse de la prolifération des cellules ostéoblastiques²⁷³. La surexpression de ligands de l'EGFR dans des souris transgéniques a également un effet sur la formation osseuse. Des souris transgéniques pour l'EGF présentent une prolifération plus importante et une accumulation des ostéoblastes au niveau de l'endoste et du périoste mais également un amincissement de l'os cortical²⁷⁴. Le système EGFR intervient également dans l'ostéoclastogénèse. Différentes études menées ces dernières décennies ont montré que les ligands de l'EGFR stimulent la résorption osseuse *in vitro* et *in vivo*. L'activation d'EGFR stimule la prolifération des précurseurs ostéoclastiques, ce qui aboutit à une augmentation du nombre d'ostéoclastes matures^{275,276}. L'effet du système EGFR pourrait être cependant un effet indirect sur l'ostéoclastogénèse. En effet, Zhu *et al.* ont montré que les ostéoclastes n'expriment pas d'EGFR fonctionnel²⁷⁷. Cette même étude a aussi démontré que les ligands de l'EGFR stimulaient la formation des ostéoclastes matures en inhibant l'expression de l'OPG et en augmentant l'expression de MCP-1 (un facteur favorisant la fusion et l'activité des ostéoclastes) par les ostéoblastes. Enfin, une inhibition de l'activité de l'EGFR dans des cellules souches mésenchymateuses aboutit à une réduction de la quantité de RANKL et de MCSF sécrété²⁷⁸. ADAM12, en libérant des ligands d'EGFR, pourrait donc inhiber la différenciation ostéoblastique et activer l'ostéoclastogénèse, comme nous l'observons dans nos modèles d'ostéosarcome *in vivo*. Cela favoriserait alors l'ostéolyse paratumorale et donc le développement de tumeurs en site osseux.

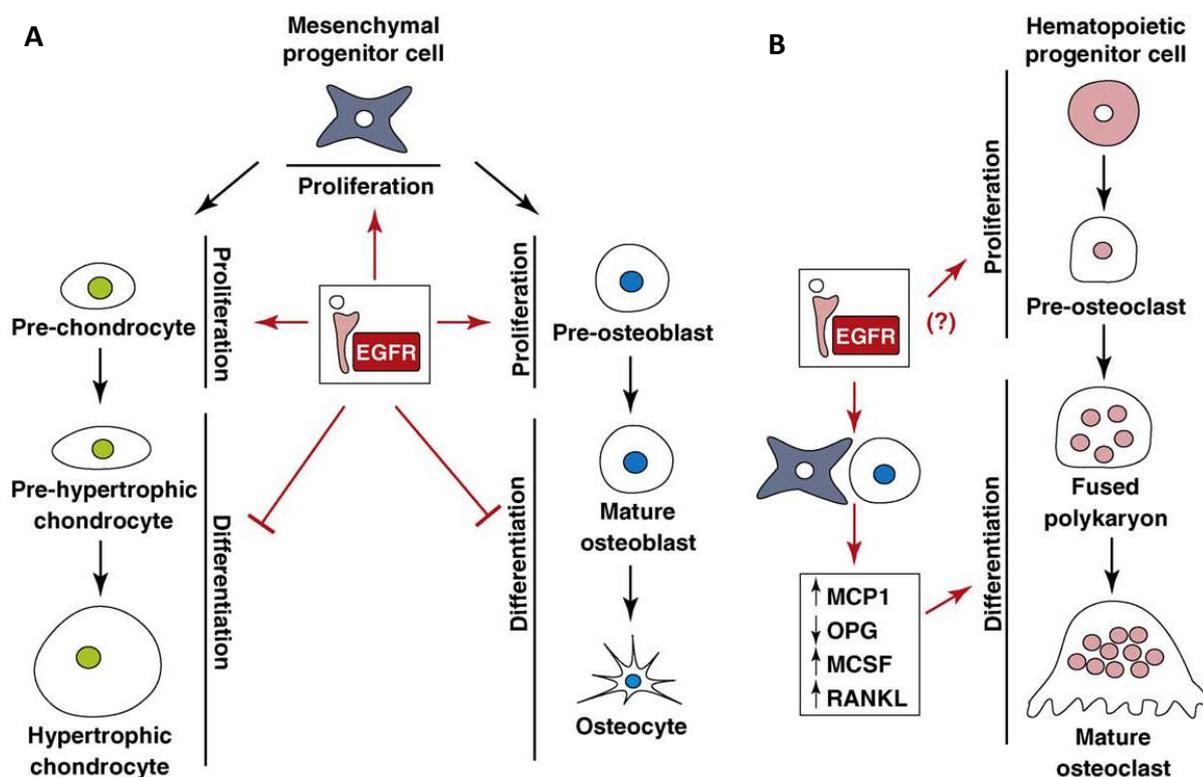


Figure 42 : Les effets du système EGFR sur les cellules osseuses ²⁷⁹. **A)** Les voies de signalisations déclenchées par l'EGFR induisent la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques et chondrocytaires mais inhibent leur différenciation en cellules matures. **B)** La voie d'EGFR stimule la prolifération des cellules pré-ostéoclastiques et promeut la différenciation et l'activation ostéoclastique en stimulant la production de MCP1, de MCSF et de RANKL et en inhibant la sécrétion d'OPG.

Le rôle d'ADAM12 dans le cercle vicieux pourrait également mettre en jeu le TGF- β , un facteur de croissance stocké dans la matrice osseuse. En effet, nous avons montré qu'ADAM12 promeut la croissance tumorale mais également l'ostéolyse. Ce dernier processus libère du TGF- β . Ce facteur a un rôle complexe dans les pathologies tumorales et peut être à la fois pro-ou anti-tumoral. En effet, il a été montré que dans les cancers épithéliaux, le TGF- β inhibe la prolifération cellulaire à des stades précoces du développement tumoral, et a donc un effet anti-tumoral alors qu'à des stades tardifs, il favorise la migration et l'invasion cellulaire et donc la progression tumorale et le processus métastatique. Le TGF- β induit notamment l'expression des MMP-2 et -9, des facteurs pro-migratoires et pro-invasifs. De plus, Le Pabic *et al.* ont montré que le TGF- β augmentait l'expression d'ADAM12 dans des cellules hépatiques humaines via les voies PI3K/Frap-mTOR/p70S6K et MEK/ERK ²³⁴. Le TGF- β pourrait donc avoir un effet pro-tumoral dans

l'ostéosarcome en induisant l'expression d'ADAM12, qui en retour favoriserait l'ostéolyse libérant ainsi du TGF- β .

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois le rôle pro-tumoral d'une protéase, ADAM12, dans le développement des ostéosarcomes. Cette métalloprotéase intervient à la fois dans la prolifération cellulaire mais également dans l'ostéolyse associée à la tumeur. Ces actions pourraient dépendre de son activité protéasique impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la libération de facteurs de croissance, mais également de sa capacité à interagir avec la matrice via ses domaines désintégrine et riche en cystéine. Ces hypothèses restent cependant à vérifier et particulièrement le rôle que les ligands d'EGFR pourraient tenir dans l'effet d'ADAM12 en faveur du développement des ostéosarcomes. Enfin, une seconde voie d'étude concerne la relation entre ADAM12 et le TGF- β dans l'ostéosarcome et la conséquence de cette relation sur la cancérogenèse.

2^{ème} PARTIE :

*ADAM12 potentialise l'activité de la voie
de signalisation TGF- β par les Smads
dans les cellules d'ostéosarcome*

INTRODUCTION

La superfamille du TGF- β est une large famille de protéine partageant une structure similaire. Elle doit son nom à son premier membre décrit en 1983 : le TGF- β 1²⁸⁰. Cette superfamille regroupe trois sous-familles principales : les BMPs (Bone Morphogenetic Protein), les Activines et la sous-famille du TGF- β . Les membres de cette superfamille sont fortement impliqués dans différents processus tels que la prolifération et la différenciation cellulaires mais également l'embryogenèse.

La sous-famille du TGF- β est constituée chez les mammifères de trois isoformes : TGF- β 1, 2 et 3. Le TGF- β 1 est l'isoforme la plus exprimée au sein de l'organisme et est sécrété par la plupart des cellules. Il participe activement au maintien de l'homéostasie tissulaire en régulant la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaires ainsi que la production de matrice extracellulaire. Le TGF- β 1 a ainsi un impact sur divers processus physiologiques comme la réponse immune, l'angiogenèse, la cicatrisation et la formation osseuse.

Le TGF- β 1, comme les deux autres isoformes, est sécrété sous une forme latente biologiquement inactive et est ensuite stocké en partie au sein de la matrice extracellulaire. L'activation du TGF- β 1 latent nécessite un clivage protéolytique. Ainsi, différentes protéases impliquées dans ce processus ont été identifiées telles que la plasmine, la thrombine mais aussi les MMP-2, -9, -13 et -14. La forme latente peut également être activée en interagissant avec la thrombospondine 1 ou des intégrines, ce qui induit un changement conformationnel de la protéine la rendant ainsi fonctionnelle.

Pour induire ces effets biologiques, le TGF- β 1 mature interagit avec un complexe de récepteurs membranaires composés de deux types de récepteur : un récepteur de type I (T β RI) et un récepteur de type II (T β RII). Ces récepteurs sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire fixant le TGF- β 1, d'un domaine transmembranaire et enfin d'un domaine C-terminal intracellulaire possédant une activité sérine/thréonine kinase. T β RII est caractérisé par un domaine kinase constitutivement actif alors que l'activité kinase de T β RI est inductible. Le TGF- β 1 se fixe aux récepteurs de type II qui, en absence de ligands, sont présents à l'état d'homodimères. Suite à cette fixation, les récepteurs T β RII recrutent les récepteurs T β RI formant alors un complexe hétérotétramérique composé de deux T β RI et de deux T β RII. L'activité kinase constitutivement active de T β RII phosphoryle les récepteurs de type I, induisant un changement de conformation qui dévoile leur activité kinase. Les

récepteurs TβRI ainsi activés vont alors déclencher différentes cascades de signalisation dont la principale implique les protéines Smads. Le TGF-β peut aussi stimuler la voie des MAPK par activation d'ERK, p38 et JNK.

Les protéines Smads composent la voie de signalisation spécifiquement activée par le TGF-β1. Cette famille de protéines peut être divisée en trois groupes ayant chacun un rôle défini (**Figure 43**): les *R-Smads* (Receptor-activated Smads), les *Co-Smads* (Common-Smad) et les *I-Smads* (Inhibitory-Smad). Les R-Smads et les Co-Smads ont une structure proche et partagent deux domaines particulièrement conservés : un domaine MH1 (Mad homology 1) à l'extrémité N-terminale qui permet des interactions protéine-ADN et un domaine MH2 situé à l'extrémité C-terminale qui permet des interactions de type protéine-protéine. Les I-Smads possèdent uniquement le domaine MH2 et non le domaine MH1.

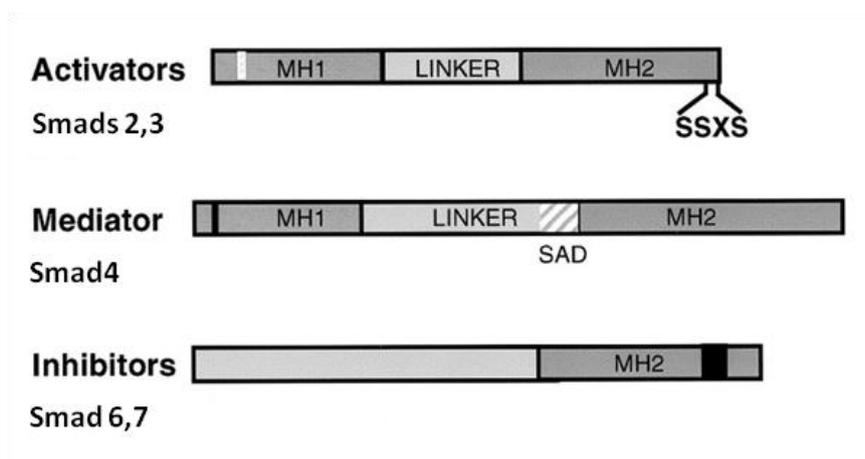


Figure 43 : Structure schématique des protéines Smads impliquées dans la voie du TGF-β1 ²⁸¹

Suite à l'activation de TβRI par le TGF-β1, les R-Smads Smad2 et Smad3 interagissent avec ce récepteur et sont alors phosphorylés au niveau de deux résidus sérine présents à l'extrémité C-terminale (séquence SSXS). Cette phosphorylation provoque la dissociation des R-Smads avec des protéines d'ancrage telles que SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) qui les maintenaient à proximité des récepteurs et permet ainsi leur association avec le Co-Smad Smad4. Ce complexe R-Smad/Co-Smad est alors transporté dans le noyau où ils participent à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles du TGF-β1. En effet, le complexe Smad interagit via les domaines MH1 à des séquences CAGAC

situées dans les promoteurs de gènes spécifiques²⁸². Cependant, l'affinité du domaine MH1 pour l'ADN est relativement faible et les Smads doivent donc recruter d'autres facteurs de transcription ainsi que des co-facteurs. Enfin, l'I-Smad Smad7 inhibe l'activité de cette voie de signalisation en empêchant l'activation des R-Smads. Il peut agir comme un inhibiteur compétitif en interagissant avec T β RI, empêchant ainsi la fixation et donc la phosphorylation des R-Smads. Smad7 favorise également le recrutement de phosphatases et de ligases qui, respectivement, déphosphorylent et induisent la dégradation des récepteurs de types I activés²⁸³ (**Figure 43**).

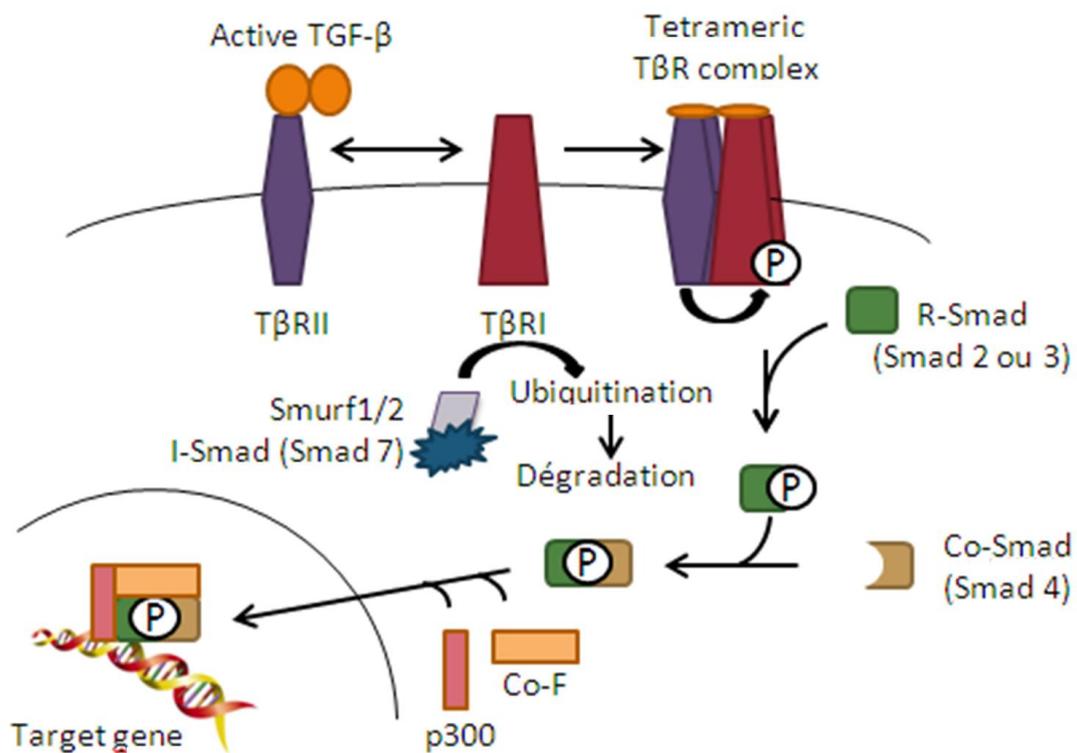


Figure 44 : Implication des protéines Smads dans la signalisation induite par le TGF- β ²⁷⁰

A. Le rôle du TGF- β dans l'homéostasie osseuse

Le TGF- β est présent en grande quantité dans l'environnement osseux, qui représente une des plus importantes sources de ce facteur de l'organisme. Il est essentiel au maintien de l'homéostasie osseuse en maintenant l'équilibre entre phase de résorption et de formation^{284,285,286}. Le TGF- β module notamment la différenciation et l'activation des différentes cellules osseuses. Cependant, le rôle du TGF- β dans ce remodelage est complexe et dépendant du contexte et de la temporalité de son action.

Le TGF- β intervient dans les différents stades de la formation osseuse. La plupart des études montrent qu'il augmenterait la minéralisation *in vitro*, principalement en favorisant la migration et la prolifération des progéniteurs ostéoblastiques²⁸⁷. Néanmoins, le TGF- β semble également pouvoir inhiber la minéralisation en bloquant durant les stades tardifs la différenciation ostéoblastique d'une manière dépendante de Smad3^{288 289}. Ainsi, l'effet du TGF- β sur la formation osseuse diffère selon le stade de différenciation des cellules ostéoblastiques et a donc un effet stimulant dans les stades précoces et un effet inhibiteur dans les stades tardifs.

L'effet du TGF- β sur l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse est également complexe. Des études *in vitro* ont montré que le TGF- β pouvait inhiber ou stimuler la différenciation ostéoclastique selon le contexte cellulaire de manière directe ou indirecte. Le TGF- β inhibe l'ostéoclastogenèse en contrôlant la sécrétion de différents facteurs. Il induit notamment la production d'OPG par les cellules de la moelle osseuse et les ostéoblastes tout en inhibant la production de RANKL par les cellules ostéoblastiques^{290,291,292}. Le TGF- β modifie donc sensiblement la balance RANKL/OPG en faveur du facteur anti-résorptif. Ceci aboutit à une baisse de la différenciation ostéoclastique. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre l'OPG ne suffit pas à abolir l'effet anti-ostéoclastogenèse du TGF- β ²⁹⁰, suggérant ainsi une autre voie d'action du TGF- β sur la différenciation ostéoclastique. Contrastant avec cet effet inhibiteur du TGF- β , Sells Galvin *et al.* ont montré que le TGF- β pouvait faciliter l'ostéoclastogenèse. En effet, il favorise la différenciation ostéoclastiques dans des cultures de cellules hématopoïétiques stimulées par du RANKL et du M-CSF et en présence ou non de cellules ostéoblastiques²⁹³. Le TGF- β a donc un effet direct sur les précurseurs ostéoclastiques et facilite leur différenciation et leur activation. Le TGF- β

semble ainsi pouvoir induire ou inhiber l'ostéoclastogenèse mais son effet réel au sein de l'organisme reste à définir.

Des expériences menées *in vivo* ont permis ainsi d'observer un effet plus global du TGF- β , notamment grâce au développement de souris génétiquement modifiées. Ainsi, des souris knock-out pour le TGF- β 1 présentent une baisse de la densité minérale osseuse mais également de la longueur et de l'élasticité des os longs^{294,295}. Le TGF- β 1 semble donc jouer un rôle en faveur de la formation osseuse ou en défaveur de l'ostéolyse. Cependant, l'étude des effets de la voie de signalisation du TGF- β sur la formation osseuse modère cette observation. Si une inactivation de Smad3 dans des souris aboutit bien à une fragilité osseuse²⁹⁶, une surexpression chez des souris de T β RII tronqué, menant à une baisse de la voie du TGF- β , provoque une augmentation de la masse osseuse et une réduction du remodelage osseux²⁹⁷. De même, un knockout conditionnel de T β RII dans les ostéoblastes accroît la masse osseuse avec une hausse du volume d'os trabéculaire et une diminution du volume d'os cortical²⁹⁸. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la voie du TGF- β , le SD208, conforte ces résultats. Cette petite molécule inhibe le domaine kinase de T β RI et bloque donc l'effet du TGF- β . Les souris traitées avec cet inhibiteur présentent une augmentation de la différenciation ostéoblastique, de la formation osseuse mais aussi une baisse de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse, résultant en une augmentation de la masse osseuse²⁹⁹.

B. Le TGF- β dans la pathologie tumorale

1) Les fonctions anti- ou pro-tumorales du TGF- β

Le TGF- β maintient l'homéostasie tissulaire en contrôlant la prolifération, la différenciation, l'apoptose, et l'invasion du microenvironnement cellulaire^{300,301}. Ainsi, une altération de la voie du TGF- β peut déréguler l'ensemble de ces processus et participer à la cancérogenèse. Le TGF- β exerce cependant deux effets opposés sur la progression tumorale et ce en fonction du stade du développement³⁰².

Durant les stades précoces du développement de cancers épithéliaux, le TGF- β peut agir comme un facteur anti-tumoral en jouant sur différents mécanismes³⁰³. Le TGF- β

inhibe notamment la prolifération des cellules cancéreuses en induisant l'expression des inhibiteurs de CDK (Cyclin-Dependant Kinase) tels que p15 et p21. Ces protéines bloquent alors la transition G1/S du cycle cellulaire. En parallèle, le TGF- β réprime l'expression de la protéine c-Myc, un facteur de transcription oncogénique qui active la prolifération cellulaire. En plus de son effet anti-prolifératif, le TGF- β limite également la progression tumorale en contrôlant l'apoptose. Les mécanismes moléculaires restent cependant encore à déterminer mais pourraient impliquer le récepteur de mort Fas et la kinase DAPK (Death Associated Protein Kinase). Par ces mécanismes, le TGF- β contrôle la prolifération et la survie cellulaires et donc la croissance tumorale. L'inhibition de l'activité biologique du TGF- β pourrait alors faciliter la cancérogenèse. Ainsi, des mutations touchant des gènes impliqués dans la voie de signalisation du TGF- β sont détectées dans de nombreux types de cancer. Des mutations aboutissant à l'inactivation du récepteur T β RII sont responsables de tumeurs gastriques, de cancers colorectaux ou de gliomes^{304,305}. Les mutations qui inactivent le gène codant T β RI sont moins fréquentes mais ont également été retrouvées dans certains types de cancer du pancréas, du sein et des ovaires³⁰⁶⁻³⁰⁸. Enfin, des mutations ou délétions affectant le gène codant Smad4 sont retrouvées dans la moitié des cancers gastriques.

Certaines tumeurs acquièrent des résistances aux effets anti-tumoraux du TGF- β et détournent cette voie de signalisation au cours des phases plus tardives pour induire différents mécanismes pro-tumoraux³⁰⁹. Le TGF- β active notamment la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM). Ce processus physiologique peut être pathologique dans le cadre d'un carcinome. Durant la TEM, les cellules cancéreuses perdent leur polarité cellulaire, et différentes types de connexions (qu'elles établissent entre elles et avec leur matrice). Elles acquièrent alors un phénotype fibroblastique devenant ainsi plus mobiles et invasives et deviennent capables de survivre dans un environnement indépendamment de leur ancrage³¹⁰. Le TGF- β en induisant ce processus facilite l'invasion des cellules tumorales et donc la dissémination métastatique. Le TGF- β promeut également l'angiogenèse, un phénomène essentiel au développement tumoral. Il agit directement sur les cellules endothéliales, stimulant l'expression, la sécrétion et l'activation de MMPs permettant la migration de ces cellules³¹¹. Le TGF- β peut aussi agir indirectement en induisant l'expression de VEGF par les cellules fibroblastiques et épithéliales³¹², un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et donc pro-angiogénique. Enfin, le TGF- β a un effet immunosuppresseur. Le TGF- β régule notamment l'activité des lymphocytes T via différents mécanismes, tels que l'inhibition de la production d'IL-2³¹³, l'induction indirecte

de l'apoptose des cellules T périphériques³¹⁴ et l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques³¹⁵. Ainsi, en inhibant l'action des lymphocytes T mais également des cellules NK, le TGF- β participe au processus d'échappement immunitaire des cellules cancéreuses³¹⁶.

2) Le rôle du TGF- β dans le développement tumoral en site osseux

Le rôle du TGF- β dans les tumeurs osseuses a principalement été étudié dans le cadre de métastases osseuses. Il intervient dans les différentes étapes du processus métastatique que sont l'intravasation, l'extravasation et l'implantation au sein du tissu osseux. Le TGF- β facilite ensuite la croissance tumorale en favorisant les différents processus décrits précédemment comme l'angiogenèse et l'échappement au système immunitaire.

Le TGF- β joue un rôle majeur dans la mise en place du cercle vicieux (qui se met en place lors du développement tumoral en site osseux) notamment en favorisant le processus d'ostéolyse associée à la tumeur (**Figure 45**). En effet, lors de la dégradation de la matrice osseuse, du TGF- β est libéré et activé. Il induit ensuite la production de facteurs ostéolytiques et prométastatiques comme l'IL-11 et PTHrP par les cellules tumorales. Ainsi, dans un modèle de cancer du sein, le blocage des voies de signalisation du TGF- β inhibe la production de PTHrP par les cellules tumorales et le développement de métastases osseuses³¹⁷. De même, la neutralisation de PTHrP par un anticorps bloquant réduit la progression de métastases osseuses mais également le développement de lésions osseuses³¹⁸. De plus, le TGF- β a un effet direct sur l'ostéolyse et plus particulièrement sur les cellules osseuses. Il semble en effet favoriser l'ostéoclastogénèse, déséquilibrant ainsi la balance entre formation et résorption osseuse en faveur de cette dernière. Ainsi, en augmentant les lésions ostéolytiques paratumorales, le TGF- β promeut le développement tumoral en site osseux.

Le rôle du TGF- β dans l'ostéosarcome est encore mal défini. Néanmoins, par extension des études réalisées sur les métastases osseuses, il est raisonnable de penser que le TGF- β favoriserait le développement des tumeurs primitives en site osseux et certaines études tendent à conforter cette hypothèse dans le cadre de l'ostéosarcome. A l'inverse de son effet sur les cancers épithéliaux, le TGF- β peut augmenter la prolifération des cellules d'ostéosarcome (d'origine mésenchymateuse). Cet effet a été observé *in vitro* sur différentes lignées d'ostéosarcome³¹⁹ dont la lignée d'ostéosarcome humaine MG63³²⁰. Dans cette

dernière, le TGF- β induit l'expression du proto-oncogénique c-Myc, contrairement à ce qui a été observé dans les lignées de carcinome. Ces observations ont été faites uniquement *in vitro* et conclure sur le rôle pro-prolifératif du TGF- β dans l'ostéosarcome nécessite des études complémentaires précliniques et cliniques. Cependant, l'observation récente d'une corrélation positive entre l'activité de la voie Smad et le grade des ostéosarcomes tend à confirmer le rôle pro-tumoral du TGF- β dans ce contexte ³²¹.

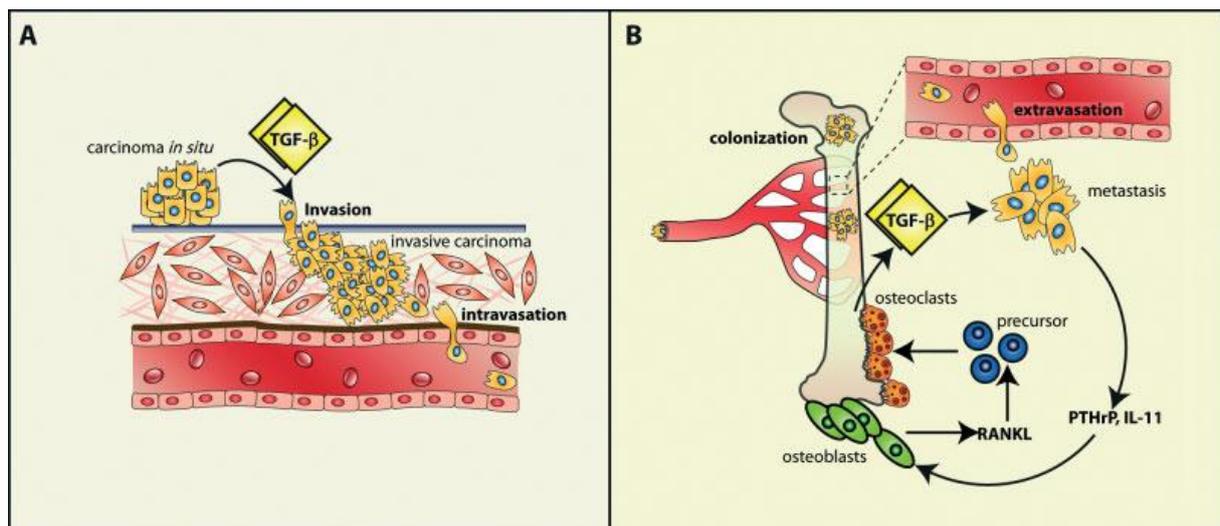


Figure 45 : Les effets pro-tumoraux du TGF- β . **A)** Le TGF- β stimule la progression des carcinomes en stimulant l'invasion, la mobilité et l'agressivité des cellules cancéreuses. Les cellules tumorales acquièrent la capacité à envahir les tissus adjacents et à traverser la barrière endothéliale. **B)** Le TGF- β facilite le développement des métastases osseuses en induisant l'expression de PTHrP et d'IL-11, qui en retour induisent la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes. RANKL induit l'ostéoclastogénèse et donc l'ostéolyse libérant ainsi du TGF- β emprisonné dans la matrice osseuse. En retour, le TGF- β promeut le développement de la masse tumorale ³²².

C. Le TGF- β et ADAM12

ADAM12 est une métalloprotéase exprimée par de nombreux types cellulaires. Dans un contexte physiologique, son expression est sous le contrôle du TGF- β . En effet, Le Pabic *et al.* ont montré que le TGF- β augmentait l'expression d'ADAM12 dans des cellules hépatiques humaines via les voies PI3K/Frap-mTOR/p70S6K et MEK/ERK ²³⁴. Bien que l'effet du TGF- β sur l'expression d'ADAM12 dans un contexte tumoral n'ait pas encore été étudié, ce processus pourrait renforcer l'action pro-cancéreuse du TGF- β . ADAM12 favorise en effet le développement de différents types de cancer et une forte expression de cette protéase est considérée comme étant de mauvais pronostic.

ADAM12 est impliquée en retour dans la voie de signalisation du TGF- β . Il interagit avec le récepteur T β RII³²³ dans les vésicules endosomales et stabilise alors la protéine probablement en inhibant son association avec Smad7. Ce processus facilite ainsi l'activation de la voie Smad et accroît donc les effets du TGF- β .

Objectifs de la 2^{ème} partie :

Le TGF- β 1 est un acteur important du développement tumoral et peut agir comme un facteur anti- ou pro-tumoral. Il est stocké dans la matrice osseuse et est donc libéré lors de l'ostéolyse. Le TGF- β 1 pourrait donc être impliqué dans le cercle vicieux qui s'établit dans les tumeurs osseuses primitives malignes entre le développement tumoral en site osseux et l'ostéolyse. De plus, le TGF- β 1 est le seul facteur connu pouvant induire l'expression d'ADAM12, une métalloprotéase décrit précédemment comme favorisant le développement des ostéosarcomes et l'ostéolyse associée à la tumeur. D'autres facteurs pourraient moduler l'expression d'ADAM12 et ainsi jouer un rôle dans l'ostéosarcome. Enfin, la relation entre ADAM12 et le TGF- β 1 dans l'ostéosarcome est encore à définir. Les objectifs de cette partie sont d'étudier :

- *le contrôle de l'expression d'ADAM12 par différents facteurs impliqués dans la physiopathologie osseuse*
- *le rôle d'ADAM12 dans la sensibilité des cellules d'ostéosarcome au TGF- β 1*
- *l'effet du TGF- β 1 sur les capacités prolifératives et migratoires des cellules d'ostéosarcome*

MATERIELS ET METHODES

A. Etude du contrôle de l'expression d'ADAM12 par différents facteurs impliqués dans la physiopathologie osseuse

Les cellules K7M2, MOS-J et POS-1 sont ensemencées à J0 en plaque 6 puits. A J1, le milieu de culture est remplacé par du milieu complétement avec 1% de SVF (afin de minimiser l'apport de différents facteurs par le sérum). A J2, le milieu de culture est de nouveau remplacé par du milieu 1% SVF dans lequel est ajouté le facteur étudié. L'ARN est extrait à J3 après 24 heures de traitement. L'expression de l'ARNm ADAM12 est analysée selon le protocole décrit dans le « Matériels et Méthodes » de la 1^{ère} partie.

Les facteurs étudiés sont : IL-1 (25 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), RANKL (25 ng/ml), OPG (100 ng/ml), OSM (50 ng/ml), TGF- β 1 (10 ng/ml), TNF- α (100 ng/ml).

B. Activation d'un promoteur artificiel cible du TGF- β

1) Construction plasmidique

L'évaluation de la réponse des différentes lignées cellulaires au TGF- β a été effectuée en mesurant la réponse d'un promoteur artificiel cible du TGF- β (CAGAC)₉-lux.

(CAGA)₉-lux est constitué d'un promoteur artificiel contenant la répétition en tandem de 9 fois la séquence CAGA appelée SBE pour Smad Binding Element sur laquelle se fixe spécifiquement le complexe transcriptionnel Smad3/4 en réponse au TGF- β . Ce promoteur est cloné dans un vecteur en amont de l'ADNc codant pour la luciférase « Firefly ». Afin de minimiser les variations expérimentales dues à l'efficacité de transfection, nous avons utilisé un vecteur rapporteur pRLTK (Promega, Madison, WI, USA) comme contrôle interne. Ce vecteur contient la région codant la luciférase Renilla située en amont d'un promoteur HSV-TK (*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*) qui permet un niveau faible d'expression de la luciférase « Renilla » dans les cellules co-transfectées, dont l'activité n'est pas modulée par les traitements effectués lors de nos expériences. Les mesures de l'activité luciférase « Firefly » dans chaque puits ont été ainsi rapportées aux mesures de l'activité luciférase

« Renilla ».

2) Transfection transitoire et détection de l'activité luciférase

A J0, 80000 cellules sontensemencées en plaque 24 puits (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) puis transfectées à J1 avec 250ng du vecteur (CAGA)₉-lux et 50ng du plasmide de normalisation (pRLTK) à l'aide de l'agent de transfection *Jet PEI* (*Polypus Transfection*, Illkirch, France) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Les cellules sont alors traitées avec 5ng/ml de TGF-β1 à J2 pendant 24h. La mesure des activités luciférase est réalisée à J3 à l'aide du kit « Dual-Luciférase Reporter Assay System » (Promega) avec un luminomètre à deux injecteurs (Berthold France, Thoiry, France). Le réactif « Luciferase Assay Reagent II » permet la génération d'un signal luminescent stable à partir de la luciférase « Firefly » ((CAGA)₉-lux) et le réactif « Stop & Glo » permet l'inhibition de la première réaction et la mesure de l'activité luciférase Renilla dans le même puits.

C. Western Blot

- **Extraction protéique :** Les cellules sont rincées deux fois avec du Dulbecco's Phosphate Buffer Saline [DPBS] (PAA GmbH, Linz, Autriche) puis lysées dans 100μL de tampon de lyse (SDS 1%, sodium orthovanadate 1mM, Tris-HCl pH 7,4 10mM) auquel est ajouté extemporanément une endonucléase [Benzonase] (Sigma-Aldrich) à la concentration finale de 2μmol/mL. Après extraction, les protéines sont dosées par absorptiométrie selon la méthode de Bradford (Biorad, Richmond, CA). 30μg de protéine en solution dans le tampon de lyse sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli 4X (Tris pH 6,8 200mM, Sodium Dodecyl Sulfate [SDS] 8%, Glycérol 40%, DTT : 400μM, bleu de bromophénol 0,04%, β-mercapto-éthanol 20%).
- **Migration et transfert :** Les protéines sont séparées en fonction de leurs poids moléculaire par électrophorèse sur gel SDS et polyacrylamide (10%). Elles sont ensuite électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède).

- **Hybridation et révélation :** Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane pendant 1h dans une solution de Tris Buffer Saline (TBS), polyoxoéthylène sorbitan monolaurate (Tween₂₀) 0,1% et lait écrémé 5%. Puis les membranes sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Les anticorps utilisés sont dirigés contre Smad3, P-Smad3, Smad4 (dilution au 1/1000) et la β -actine (Sigma-Aldrich, diluée au 1/20000). Après 3 rinçages au TBS-Tween₂₀, la membrane est hybridée 1h avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase (Santa Cruz, California, USA) dilué au 1/5000 dans le TBS-Tween₂₀ : anti-lapin reconnaissant les anticorps Smad3, P-Smad3, Smad4 et anti-souris pour l'anticorps anti beta-actine. La révélation se fait par chemiluminescence grâce au kit de révélation Super Signal West Pico Chemiluminescent substrat (Pierce, Thermo Scientific). Le résultat du blot est visualisé à l'aide d'une GBOX Syngene (Cambridge, UK).

D. Prolifération cellulaire

Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 1000 cellules par puits en présence ou non de 5 ng/ml de TGF- β 1. Le nombre de cellules est évalué chaque jour pendant une semaine par comptage par la méthode d'exclusion au bleu trypan.

E. Etude du cycle cellulaire

La cytométrie en flux permet d'étudier la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire G0/G1, S ou G2/M. Les cellules sont traitées ou non avec 5ng/ml de TGF- β 1 pendant 24 ou 72 heures. Elles sont ensuite décollées à la trypsine et récupérées ainsi que leurs surnageants, contenant les cellules en division. Après un rinçage au PBS, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1600g et fixées à l'éthanol 70% pendant 30 minutes à 4°C. Après un nouveau rinçage au PBS et centrifugation, le culot est resuspendu dans 100 μ L de tampon phospho-citrate pendant 30 minutes à température ambiante (Na₂HPO₄ 0,192M, acide citrique 4 mM pH 7,8). Les cellules sont centrifugées puis reprises dans 200 μ L de PIB-RNase (0,12% de triton X-100, 0,12mM d'EDTA et 50 μ g/mL RNase) pour dégrader la membrane plasmique des cellules afin d'accéder au noyau et limiter l'hydrolyse des protéines dans les extraits cellulaires, pendant 30 minutes à 37°C. Enfin, 50 μ g/mL d'Iodure de Propidium sont ajoutés dans chaque tube pendant 20 minutes à 4°C de manière à

intercaler l'ADN des cellules et ainsi les marquer pour l'analyse par cytométrie en flux.

F. Migration cellulaire

Lors du test de migration, la mitomycine C est utilisée à 4 µg/ml (Sigma). Elle bloque la prolifération, permettant ainsi d'étudier uniquement l'impact du TGF-β1 sur la migration cellulaire. Elle est utilisée en pré-traitement pendant 1 h. Les cellules sont mises en culture en plaque 6 puits. Lorsque les cellules sont à confluence, une rupture du tapis cellulaire est réalisée dans chaque puits à l'aide d'un cône stérile, le milieu est alors enlevé et remplacé par du milieu avec les différentes conditions de traitements (TGF-β1). Des photos sont prises aux temps 0 et 24 h avec le microscope Leica.

G. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés par le test de Mann Whitney grâce aux logiciels GraphPad InStat v3.02 et Prism3. Ils sont présentés sous forme de moyenne +/- SD et sont considérés comme significatifs pour $p < 0,05$. (** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

RESULTATS

A. Etude du contrôle de l'expression d'ADAM12 par des facteurs impliqués dans la physiopathologie osseuse

ADAM12 étant impliqué dans le développement tumoral en site osseux, il semble intéressant d'étudier le contrôle de son expression dans l'ostéosarcome par différents facteurs jouant un rôle important dans la physiologie osseuse tels que : IL-1 (25 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), RANKL (25 ng/ml), OPG (100 ng/ml), OSM (50 ng/ml), TGF- β 1 (10 ng/ml) et TNF- α (100 ng/ml). (**Figure 46**).

La lignée K7M2 a été cultivée pendant 24 heures en présence des facteurs cités ci-dessus dans un milieu complété avec 1% de SVF. Nous observons une augmentation de l'expression d'ADAM12 uniquement après traitement au TGF- β 1 (d'un facteur 7), les autres facteurs restant sans effet dans nos conditions expérimentales (**Figure 46A**). La capacité du TGF- β 1 à induire l'expression d'ADAM12 a également été testée dans deux autres lignées murines d'ostéosarcome : POS-1 et MOS-J (**Figure 46B**). Comme pour la lignée K7M2, le TGF- β 1 augmente l'expression d'ADAM12 dans la lignée POS-1 (d'un facteur 10). Cependant, aucun effet n'est détecté dans la lignée MOS-J, qui possède une expression basale d'ADAM12 faible dans nos conditions expérimentales.

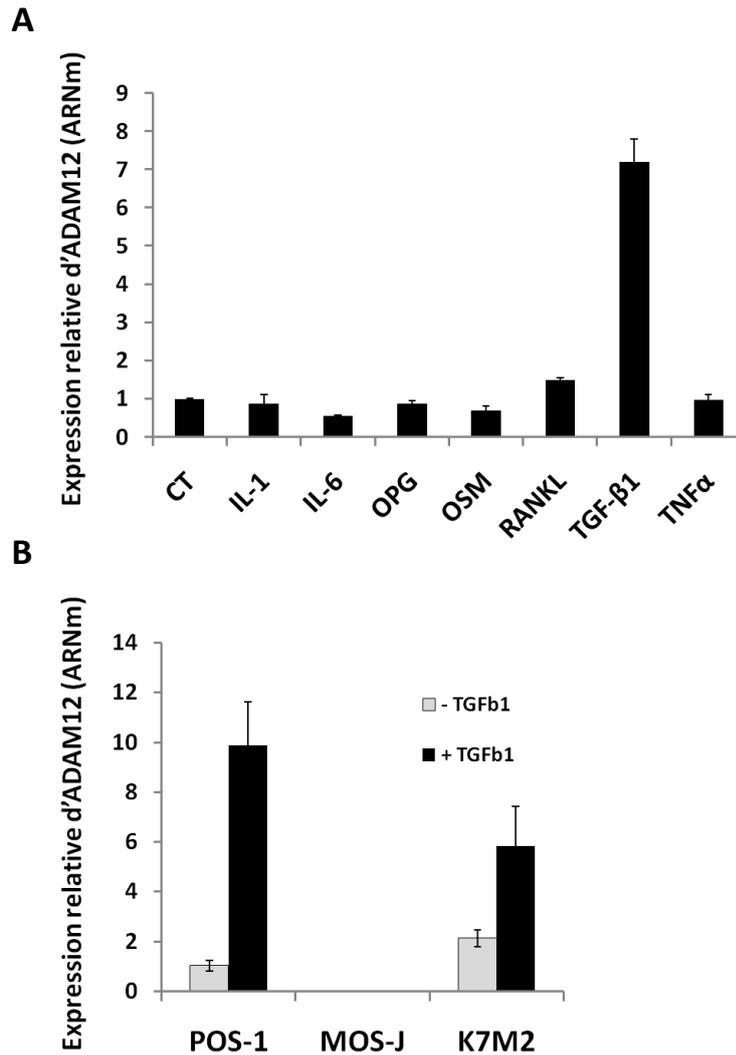


Figure 46 : Etude du contrôle de l'expression d'ADAM12 dans le modèle K7M2 par des facteurs impliqués dans la physiologie osseuse. **A)** Les cellules K7M2 sont cultivées en présence de différents facteurs pendant 24h: IL-1 (25 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), RANKL (25 ng/ml), OPG (100 ng/ml), OSM (50 ng/ml), TGF-β1 (10 ng/ml), TNF-α (100 ng/ml). L'ARNm est ensuite extrait et l'expression d'ADAM12 est analysée par RT-qPCR. **B)** Les cellules POS-1, MOS-J et K7M2 sont cultivées en présence ou non de TGF-β1 pendant 24h. L'expression d'ADAM12 est ensuite analysée par RT-qPCR.

La capacité du TGF-β1 à induire l'expression d'ADAM12 en fonction de la dose a été testée dans les lignées POS-1 et K7M2 (**Figure 47A**). Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 0,25, 0,5, 1, 2 ou 4 ng /ml de TGF-β1. Dans la lignée POS-1, l'expression d'ADAM12 augmente progressivement en fonction des doses croissantes de TGF-β1 jusqu'à atteindre un plateau à partir d'une concentration de 1 ng/ml. Une observation similaire est faite pour la lignée K7M2 avec cependant un plateau atteint dès une concentration de TGF-β1 de 0,5 ng/ml.

La cinétique d'induction de l'expression d'ADAM12 par le TGF- β 1 a également été testée sur les lignées POS-1 et K7M2 (**Figure 47B**). Les cellules sont cultivées en présence de TGF- β 1 (5 ng/ml) pendant 2, 4, 8, 16 ou 24 heures. Dans les deux modèles, le TGF- β 1 induit l'expression d'ADAM12 dès 4 heures de traitement. De plus, cette expression augmente progressivement avec un pic d'expression atteint après 16 heures de traitement avant de baisser à 24 heures.

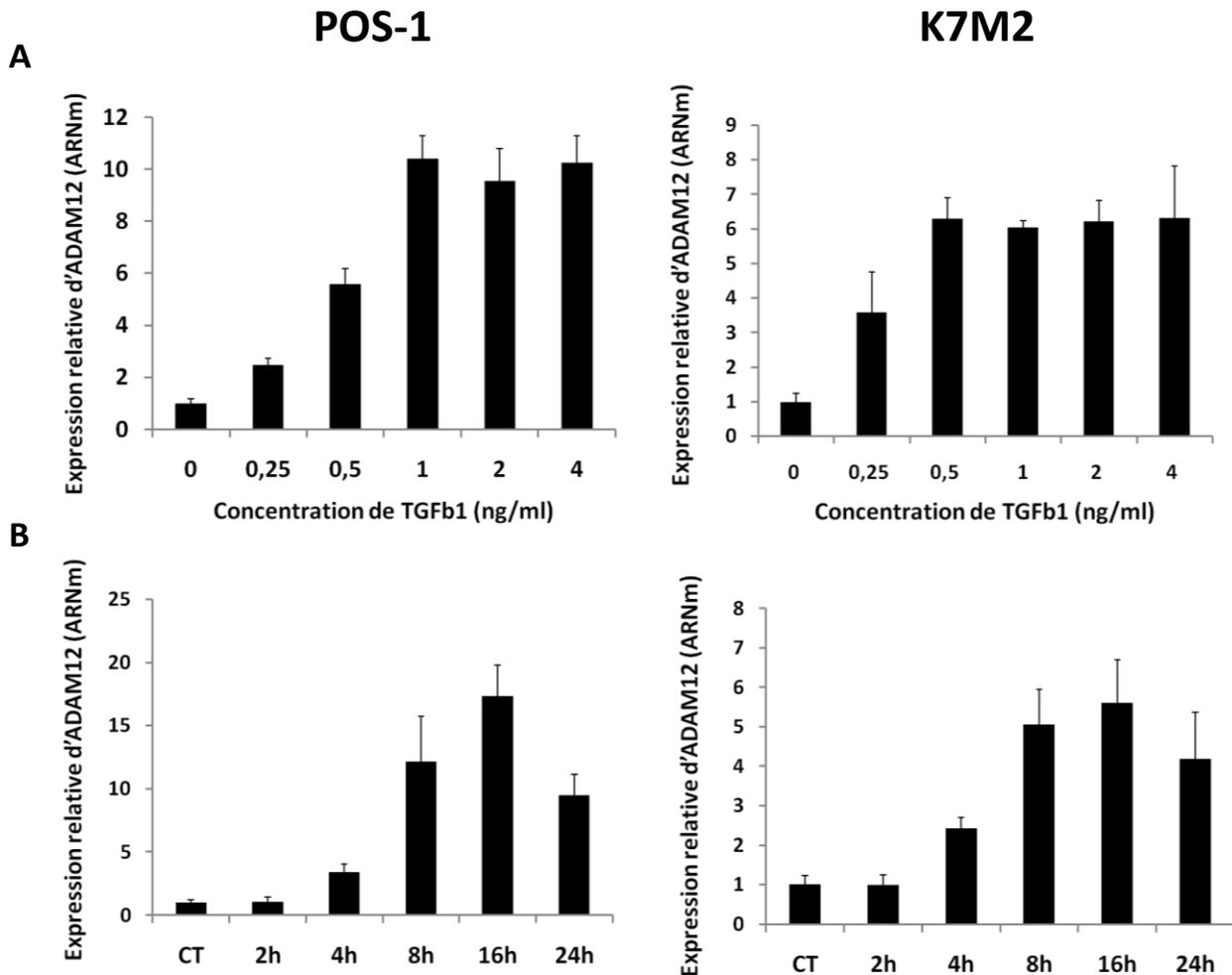


Figure 47 : Analyse de l'expression d'ADAM12 en réponse au TGF- β 1 dans les cellules POS-1 et K7M2. **A**) Les cellules POS-1 et K7M2 ont été traitées pendant 24 heures ou non avec 0,25, 0,5, 1, 2 ou 4 ng/ml de TGF- β 1. L'expression d'ADAM12 est ensuite analysée par RT-qPCR. **B**) Les cellules POS-1 et K7M2 sont cultivées en présence ou non de TGF- β 1 (5 ng/ml) pendant 2, 4, 8, 16 ou 24 heures. L'expression d'ADAM12 est ensuite analysée par RT-qPCR.

Le TGF- β 1 est le seul facteur testé pouvant moduler l'expression d'ADAM12. Cette régulation est dose et temps dépendant.

B. Rôle d'ADAM12 sur la sensibilité des cellules d'ostéosarcome au TGF- β 1

Après avoir mis en évidence la capacité du TGF- β 1 à stimuler l'expression d'ADAM12 par les cellules d'ostéosarcome, nous nous sommes interrogés sur la capacité d'ADAM12 à moduler la voie des protéines Smads. Nous avons donc étudié la réponse au TGF- β 1 de la lignée MOS-J contrôle Mock (transfectée par le plasmide Lv105-eGFP) et de la lignée MOS-J surexprimant ADAM12 (transfectée par le plasmide Lv105-ADAM12). Une étude similaire a été réalisée avec la lignée K7M2 contrôle shCT et les lignées K7M2 shADAM12.1 et shADAM12.2 (dans lesquelles ADAM12 a été éteint par l'utilisation d'un shRNA).

1) Etude de l'activation de la voie Smad3/4 par le TGF- β 1

Dans le but d'étudier l'activation de la voie Smad par le TGF- β 1 en fonction du niveau d'expression d'ADAM12, la phosphorylation de Smad3 a été étudiée par Western Blot après traitement des cellules MOS-J et K7M2 modifiées avec du TGF- β 1 (5ng/ml) (**Figure 48**). Nous avons également analysé l'expression protéine de Smad3 (protéine total), Smad4 (qui forme un complexe transcriptionnel avec Smad3 phosphorylée) et de la β -actine (utilisée ici comme protéine de référence).

Dans la lignée MOS-J Mock, la phosphorylation de Smad3 est plus faible que dans la lignée surexprimant ADAM12 et est moins stable dans le temps. En effet, après 90 minutes de traitement, seule la lignée MOS-J ADAM12 présente une phosphorylation importante de Smad3. Etonnamment, cette phosphorylation est accompagnée d'une diminution progressive de la protéine totale Smad3. Enfin, nous n'observons aucun effet significatif sur l'expression protéique de Smad4.

Dans le modèle K7M2, la phosphorylation de Smad3 est inhibée dans les lignées sous-exprimant ADAM12 shADAM12.1 et shADAM12.2 en comparaison avec l'effet observé dans la lignée contrôle shCT, corroborant ainsi les résultats obtenus dans le modèle MOS-J.

Enfin, nous ne constatons aucune modification sensible de l'expression protéique de Smad et Smad4.

ADAM12 favorise donc la phosphorylation de Smad3 en réponse au TGF- β 1 dans les cellules d'ostéosarcome.

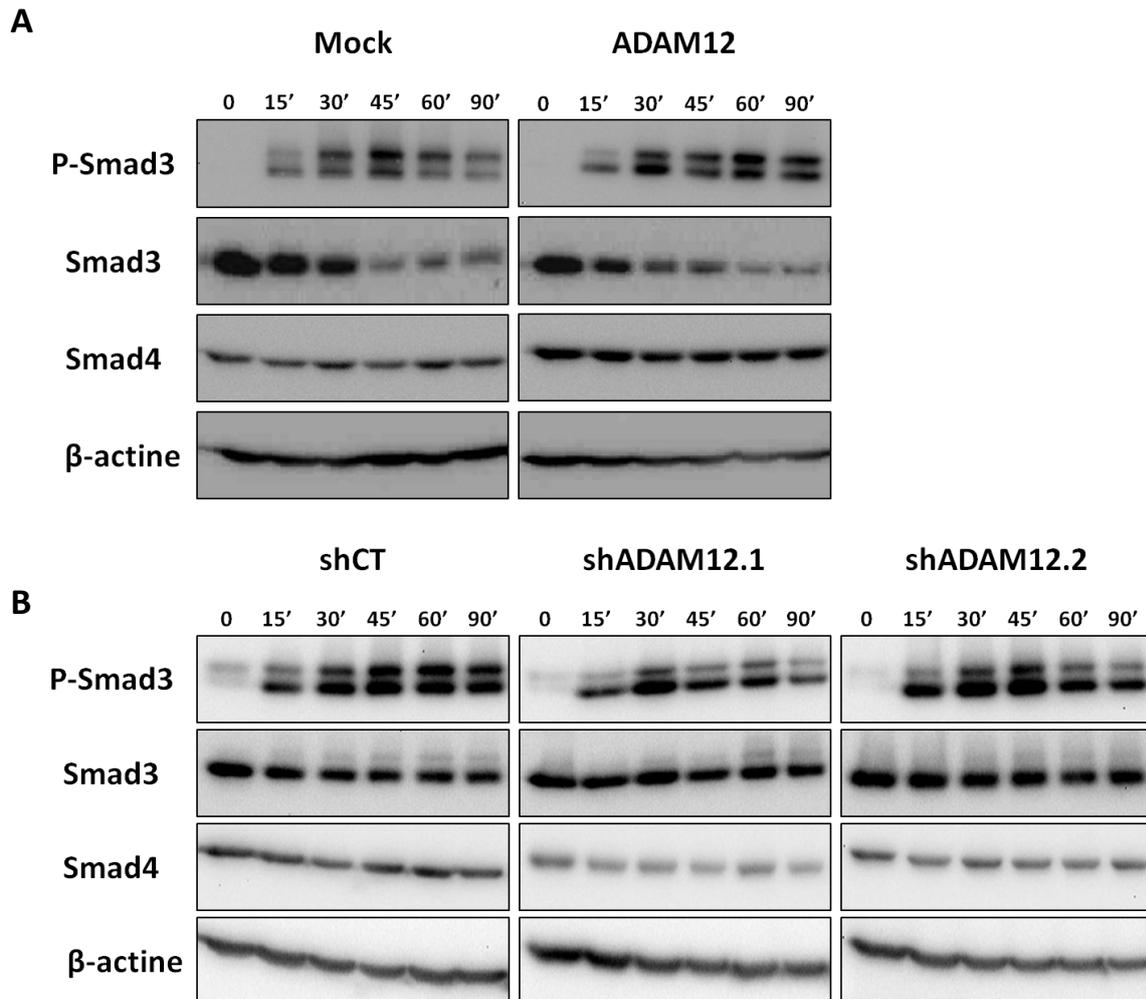


Figure 48 : Etude de la phosphorylation de Smad3 en réponse au TGF- β 1 dans les modèles MOS-J (*Mock* et *ADAM12*) et K7M2 (*shCT*, *shADAM12.1* et *shADAM12.2*). **A**) Les cellules MOS-J *Mock* et *ADAM12* ont été traitées ou non avec 5ng/ml de TGF- β 1 pendant 15', 30', 45', 60' et 90'. L'expression protéique de P-Smad3, Smad3 et Smad4 a ensuite été analysée par Western Blot. La protéine β -actine sert de protéine de référence. **B**) Les cellules K7M2 *shCT*, *shADAM12.1* et *shADAM12.2* ont été traitées ou non avec 5ng/ml de TGF- β 1 pendant 15', 30', 45', 60' et 90'. L'expression protéique de P-Smad3, Smad3 et Smad4 a ensuite été analysée par Western Blot. La protéine β -actine sert de protéine de référence.

Afin de confirmer le résultat obtenu précédemment, les différentes lignées ont été transfectées avec la construction (CAGA)₉ constitué de la répétition en tandem de 9 fois l'élément de réponse spécifique du complexe Smad3/Smad4 en réponse au TGF-β1. Le promoteur est associé à un gène codant pour la luciférase « Firefly ». L'activité luciférase détectée est donc dépendante de l'activation de la voie Smad3/4. De plus, les lignées sont transfectées simultanément par le vecteur pRLTK qui exprime constitutivement la luciférase « Renilla ». L'activité de la luciférase « Renilla » est alors un témoin de l'efficacité de transfection et permet de normaliser les résultats. L'activité luciférase est détectée après 24 heures de traitement au TGF-β1 (5 ng/ml).

Dans les lignées MOS-J, le TGF-β1 induit dans les cellules surexprimant ADAM12 une augmentation de 65% de l'activité luciférase par rapport aux cellules Mock (**Figure 49A**). De façon concordante, l'induction de l'activité luciférase par le TGF-β1 est respectivement diminuée de 55% et 50% dans les lignées K7M2 shADAM12.1 et shADAM12.2 (sous-exprimant ADAM12) par rapport au résultat observé dans la lignée contrôle shCT (**Figure 49B**). L'analyse de l'activité transcriptionnelle des voies Smad3/4 corrobore le rôle stimulateur de l'ADAM12 sur l'activation des voies smad3/4 par le TGF-β1.

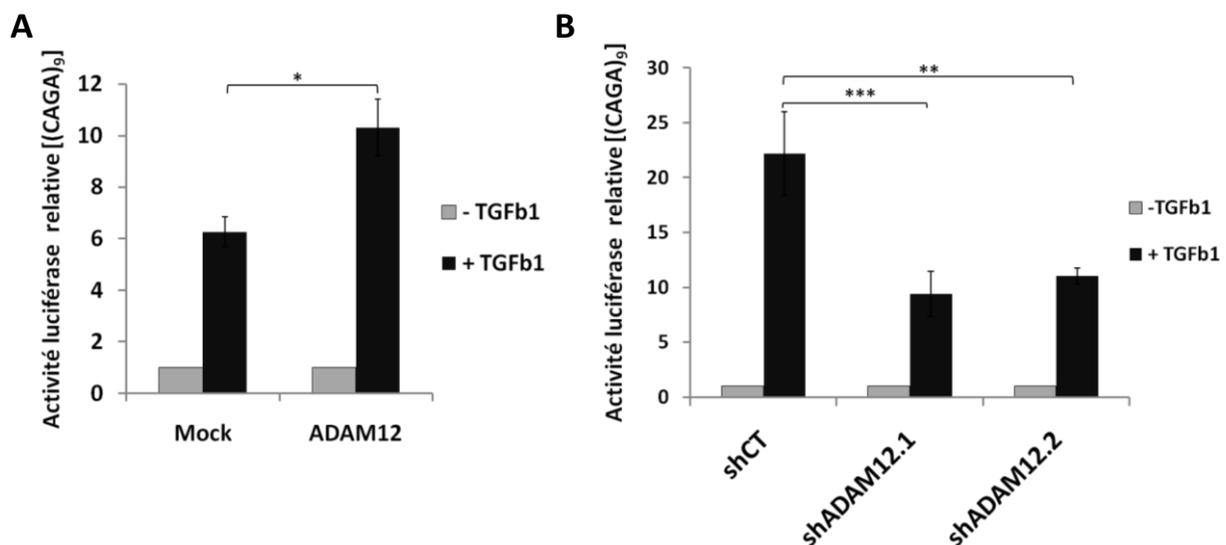


Figure 49 : Etude de l'activation de la voie des Smads en utilisant un promoteur artificiel dans les modèles MOS-J (Mock et ADAM12) et K7M2 (shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2). **A**) Les cellules MOS-J Mock et ADAM12 sont transfectées par les plasmides (CAGA)₉ et pRLTK. Après 24h de traitement avec du TGF-β1 (5 ng/ml), l'activité luciférase est mesurée et normalisée. **B**) Les cellules K7M2 shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 sont transfectées par les plasmides (CAGA)₉ et pRLTK. Après 24h de traitement avec du TGF-β1 (5 ng/ml), l'activité luciférase est mesurée et normalisée. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

2) Effet du TGF- β 1 sur la viabilité cellulaire en fonction de l'expression d'ADAM12

Le TGF- β 1 est un facteur connu pour avoir un rôle anti-prolifératif dans de nombreux types cellulaires d'origine épithéliale. Il peut également avoir un effet sur la viabilité cellulaire. Cependant, son effet sur les cellules ostéosarcomateuses (d'origine mésenchymateuse) est encore mal défini. Nous avons donc étudié les effets du TGF- β 1 sur la prolifération et la viabilité des cellules MOS-J et K7M2 (**Figure 50**). De plus, ayant précédemment montré qu'ADAM12 potentialise l'activation de la voie Smad3/4 par le TGF- β 1. ADAM12 pourrait ainsi accroître les effets biologiques du TGF- β 1.

Dans un premier temps, les cellules ont été cultivées en présence de 5ng/ml de TGF- β 1 pendant 6 jours (pour le modèle MOS-J) ou 7 jours (pour le modèle K7M2). Le nombre de cellules a été ensuite compté par la méthode d'exclusion au bleu trypan.

Après 6 jours de traitement, TGF- β 1 n'a pas d'effet significatif sur le nombre de cellules MOS-J contrôle Mock, bien que nous observons une légère inhibition [non-significatif] (**Figure 50A**). Cependant, cet effet est plus important dans les cellules MOS-J surexprimant ADAM12. En effet, le TGF- β 1 diminue le nombre de cellules du modèle Mock de 35% au jour 4 alors que cette inhibition au jour 4 atteint 65% pour le modèle MOS-J ADAM12 (**Figure 50B**). Le TGF- β 1 diminue également le nombre de cellules sur la lignée K7M2 avec une inhibition shCT de près de 60% au jour 4 (**Figure 50C**). Cette valeur diminue à respectivement 20 et 35% dans les cellules shADAM12.1 et shADAM12.2. Les cellules exprimant ADAM12 répondent donc mieux au TGF- β 1 que les cellules contrôles.

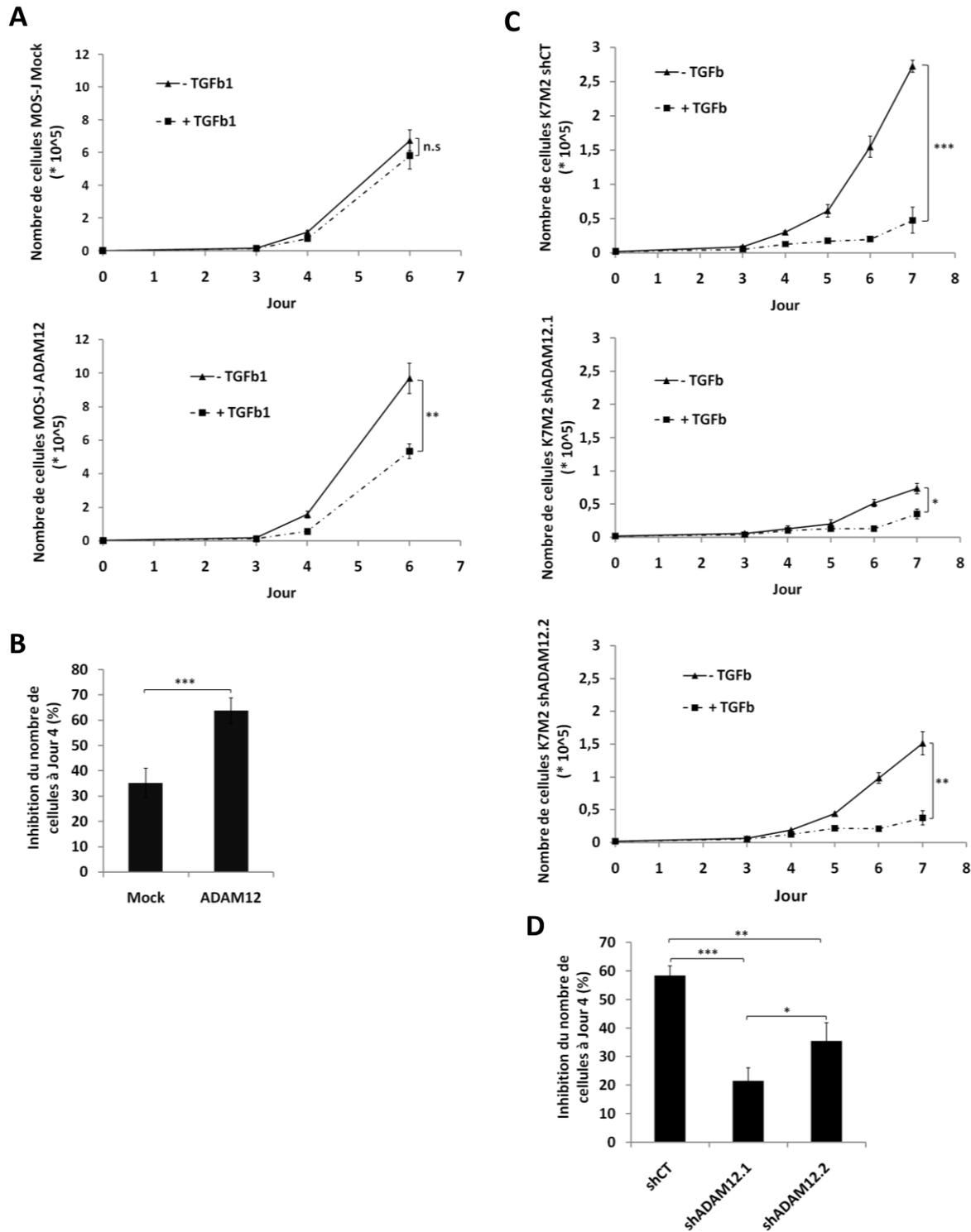
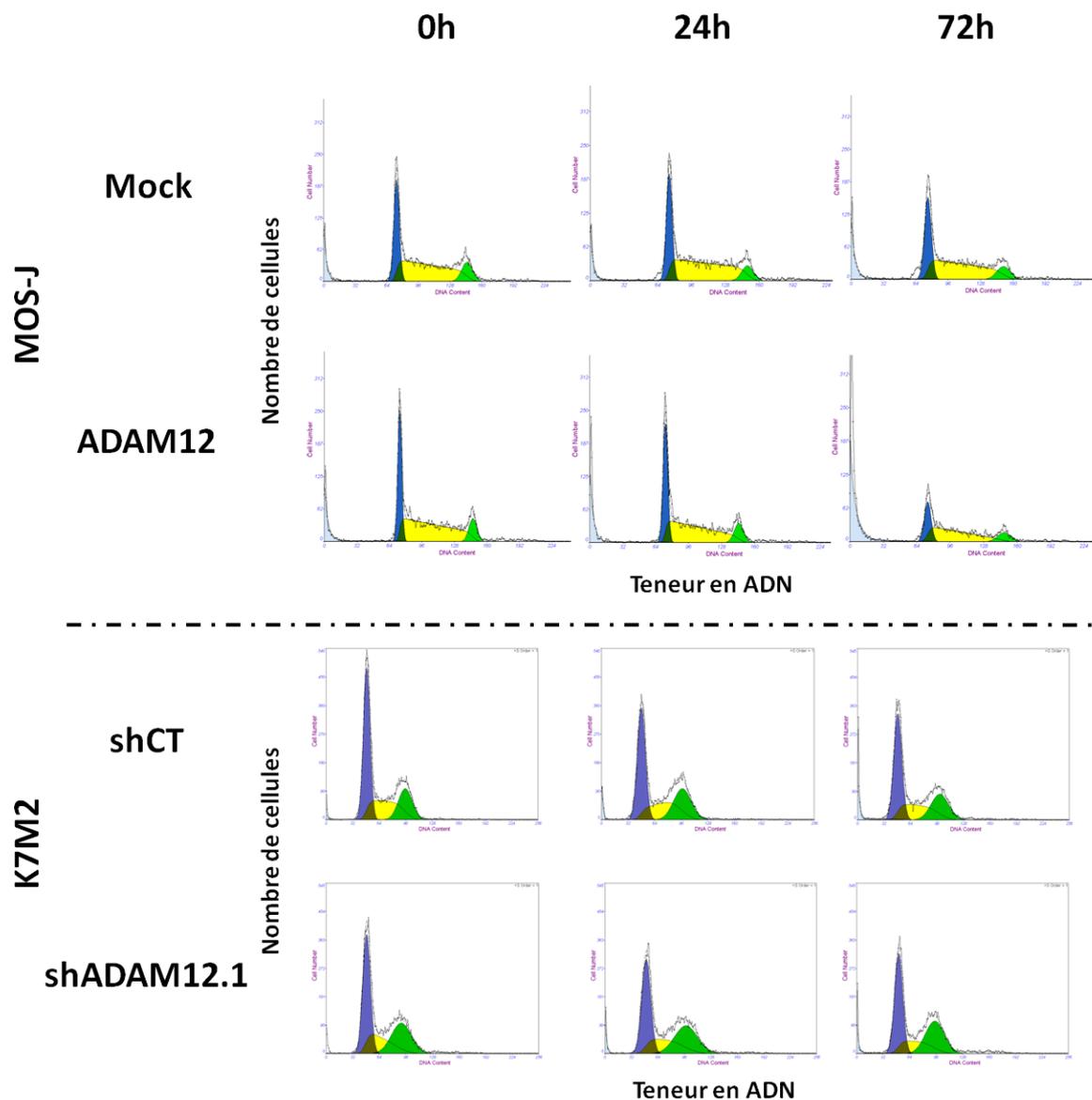


Figure 50 : Etude de l'effet du TGF- β 1 sur la viabilité des cellules MOS-J (Mock et ADAM12) et K7M2 (Parental, shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2). **A**) Comptage cellulaire par la méthode d'exclusion au bleu trypan des cellules MOS-J Mock et ADAM12 durant 6 jours en présence ou non de TGF- β 1 (5 ng/ml). **B**) Pourcentage d'inhibition du nombre de cellules MOS-J Mock et MOS-J ADAM12 induit par le TGF- β 1 après 4 jours de traitement. **C**) Comptage cellulaire par la méthode d'exclusion au bleu trypan des cellules K7M2 shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 durant 7 jours en présence ou non de TGF- β 1 (5 ng/ml). **D**) Pourcentage d'inhibition du nombre de cellules induit par le TGF- β 1 des cellules K7M2 shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 au jour 4.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette inhibition du nombre de cellules par le TGF- β 1: une baisse de la prolifération cellulaire ou une baisse de la viabilité cellulaire. Nous avons donc ensuite testé l'effet du TGF- β 1 sur la répartition des cellules MOS-J et K7M2 dans les différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 51**). Un effet anti-prolifératif induirait un blocage dans une des phases du cycle cellulaire.

Après 24 ou 72 heures de traitement au TGF- β 1 (5 ng/ml), la répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire n'est pas sensiblement modifiée, que ce soit pour les lignées MOS-J ou K7M2. Cependant, dans le modèle MOS-J, nous observons une augmentation importante de débris cellulaires (correspondant à la phase subG0) après 72 heures de traitement dans les cellules MOS-J ADAM12, contrairement aux cellules MOS-J Mock. Une observation similaire est faite pour les lignées K7M2. Le TGF- β 1 augmente le pourcentage de débris cellulaire après 72 heures de traitement et l'inhibition de l'expression d'ADAM12 semble diminuer cet effet. Le TGF- β 1 n'agit donc pas sur le cycle cellulaire mais pourrait induire la mort cellulaire et ADAM12 accroît cet effet.



		0h				24h				72h			
		SubG0 (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	SubG0 (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	SubG0 (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
MOS-J	Mock	9,4	33,7	53,8	12,4	9	33,3	57,4	9,2	13,4	34,3	55,1	10,6
	ADAM12	11,3	31,9	57,3	10,9	13,8	35,3	53,4	11,1	29,7	28,9	58,1	13
K7M2	shCT	2,11	50,39	28,2	21,4	3,3	45,6	26,9	27,5	6,2	47,6	27,4	25,2
	shADAM12.1	1,9	46,76	22,2	31,1	3,4	43,9	23	33,1	4,45	45,8	19,9	34,3

Figure 51 : Etude de l'effet du TGF- β 1 sur la répartition des cellules MOS-J (Mock et ADAM12) et K7M2 (shCT et shADAM12.1) dans les différentes phases du cycle cellulaire. Après 24 ou 72 heures de traitement avec 5 ng/ml de TGF- β 1 des cellules MOS-J (Mock et ADAM12) et des cellules K7M2 (shCT et shADAM12.1), la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux.

3) Effet du TGF- β 1 sur la migration cellulaire en fonction de l'expression d'ADAM12

Le TGF- β 1 est connu pour jouer un rôle dans la migration de différents types cellulaires tels que les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses²⁸⁶. Nous avons donc testé la capacité migratoire des lignées K7M2 shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 en présence ou non de TGF- β 1 (5 ng/ml). A cette fin, après une heure de traitement avec 4 μ g/ml de mitomycine C (qui a un effet cytostatique), une blessure du tapis cellulaire est réalisée avec un cône stérile et la vitesse de migration des deux fronts cellulaires est visualisée (**Figure 52**).

Nous observons une augmentation de la capacité migratoire des cellules K7M2 shCT en présence de TGF- β 1. Cependant, cet effet pro-migratoire du TGF- β 1 n'est plus observé chez les cellules sous-exprimant ADAM12 shADAM12.1 et shADAM12.2. ADAM12 module donc la capacité du TGF- β 1 à faciliter la migration sur les cellules d'ostéosarcome K7M2. Il s'agit cependant d'une étude préliminaire qui doit être confirmé notamment par une expérience similaire avec le modèle MOS-J.

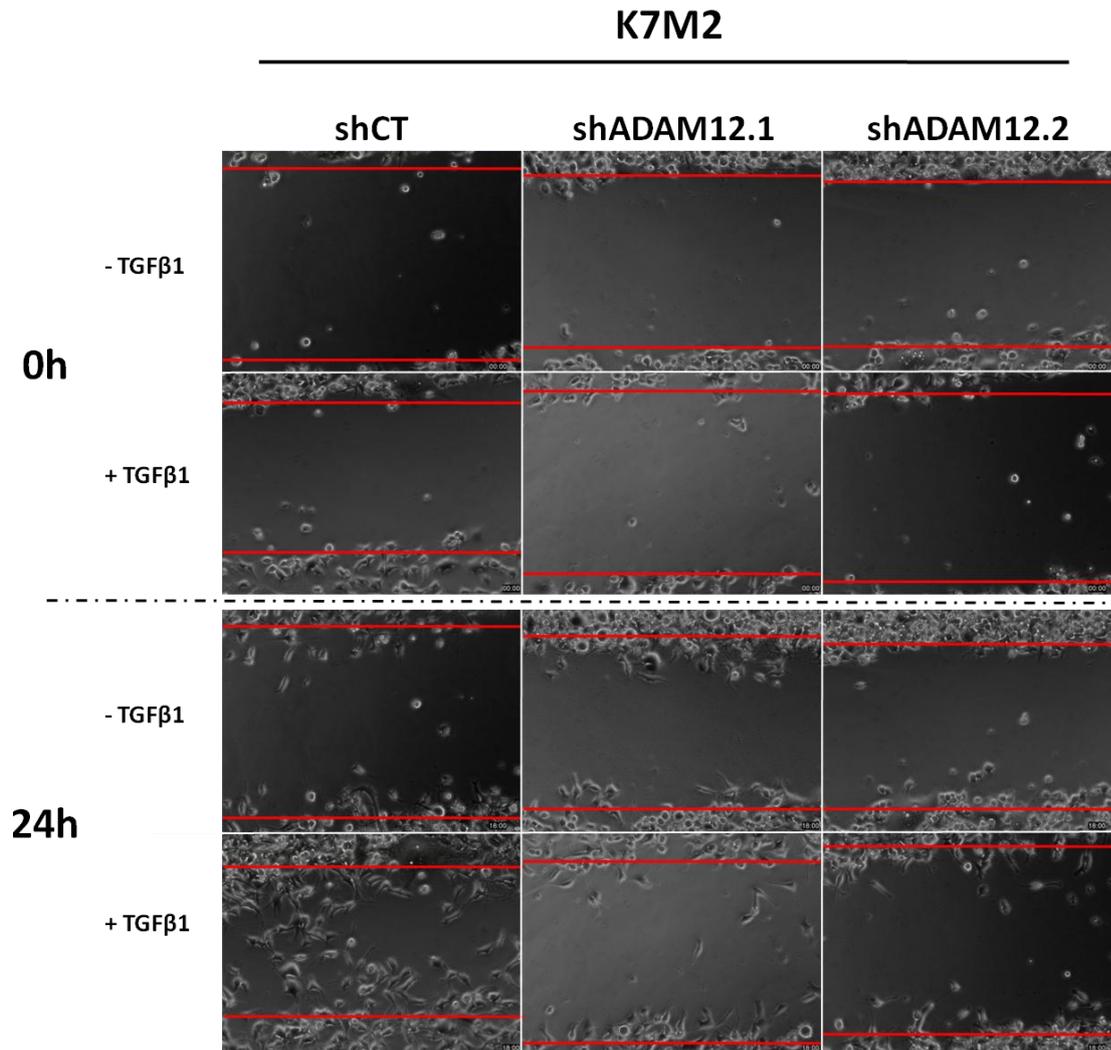


Figure 52 : Etude de l'effet du TGF-β1 sur la migration des cellules K7M2 (shCT et shADAM12.1). Après blessure du tapis cellulaire, la migration des cellules shCT, shADAM12.1 et shADAM12.2 est observée après 24h de traitement avec du TF-β1 (5ng/ml).

DISCUSSION

ADAM12 est une métalloprotéase de la famille des adamalysines et est suspectée de jouer un rôle dans le développement de nombreuses tumeurs malignes telles que le cancer du sein ²⁵², le cancer de la vessie ²⁵⁵ ou encore le glioblastome ²⁵¹. Cette protéase pourrait agir sur différents mécanismes impliqués dans la cancérogenèse comme la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. L'étude menée dans la première partie de ce travail nous a permis de mettre en évidence le rôle pro-tumoral d'ADAM12 dans l'ostéosarcome en augmentant la capacité proliférative des cellules d'ostéosarcome mais également en jouant un rôle dans l'ostéolyse associée à la tumeur, un processus connu pour faciliter le développement tumoral en site osseux.

Parmi, les différents facteurs testés présents dans le microenvironnement tumoral osseux, seul le TGF- β 1 semble pouvoir agir sur l'expression d'ADAM12 en induisant son expression dans les cellules d'ostéosarcome, comme observé dans les cellules hépatiques par Le Pabic *et al* ²³³. En effet, l'IL-1, l'IL-6, RANKL, l'OPG, l'OSM ou encore le TNF- α n'ont aucun effet sur l'expression génique d'ADAM12 dans nos conditions expérimentales. Cependant, l'effet sur le niveau protéique d'ADAM12 n'a pu être étudié du fait de l'absence d'anticorps efficaces capable de détecter la protéine murine. Le TGF- β 1 est un acteur majeur du cercle vicieux qui se met en place entre croissance tumorale et ostéolyse. En effet, la matrice osseuse est une réserve importante de TGF- β 1, et lors de l'ostéolyse, il est libéré et peut alors agir sur les cellules tumorales sur lesquelles il induit l'expression de facteurs favorisant l'ostéolyse tels que PTHrP, IL-11 et donc également ADAM12.

Le rôle du TGF- β dans les pathologies cancéreuses est complexe. En effet, le TGF- β peut agir comme un facteur anti-tumoral, particulièrement dans les stades précoces du développement tumoral en inhibant la prolifération cellulaire, ou comme un facteur pro-tumoral dans les stades plus avancés en favorisant la migration et l'invasion cellulaire des carcinomes. Ces effets paradoxaux ont été démontrés dans plusieurs cancers d'origine épithéliale. La voie de signalisation spécifique activée par le TGF- β 1 est la voie Smad qui active de nombreux gènes impliqués dans la cancérogenèse. Cette voie est donc une cible thérapeutique potentielle dans de nombreuses pathologies tumorales. Une étude menée par Atfi *et al.* a montré qu'ADAM12 participait à l'activation de cette voie par le TGF- β 1 en interagissant avec T β RII mais son rôle dans les cellules tumorales n'a pas été démontré ³²³. Nous avons mis en évidence qu'ADAM12 augmente la phosphorylation de Smad3 en réponse à un traitement au TGF- β 1 dans les cellules d'ostéosarcome mais augmente

également l'activité de cette voie de signalisation. ADAM12 pourrait donc favoriser l'activité pro- ou anti- tumorale du TGF- β 1 dans les cellules d'ostéosarcome.

Il est bien reconnu que le TGF- β inhibe la prolifération des cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques, alors qu'il stimule la prolifération des cellules d'origine mésenchymateuse comme les fibroblastes ^{324,325}. Dans un contexte tumoral, le TGF- β diminue la prolifération des cellules cancéreuses d'origine épithéliale. Ces effets inhibiteurs sont principalement attribués à l'augmentation de l'expression de CKIs (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors), comme p21CIP1/WAF1 ^{326,327} ou p15INK4B ³²⁸ (**Figure 53**). La protéine p15 inhibe la progression dans le cycle cellulaire durant la phase G1 en interagissant avec CDK4/6 empêchant ainsi son interaction avec la cycline D ³²² alors que la protéine p21 inhibe l'activité du complexe cycline E-CDK2. Cependant, nos résultats montrent que le TGF- β 1 n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire mais inhiberait cependant la viabilité cellulaire de deux lignées d'ostéosarcome murine, MOS-J et K7M2. En effet, le TGF- β 1 n'induit pas de modifications du cycle cellulaire des cellules d'ostéosarcome dans nos conditions expérimentales.

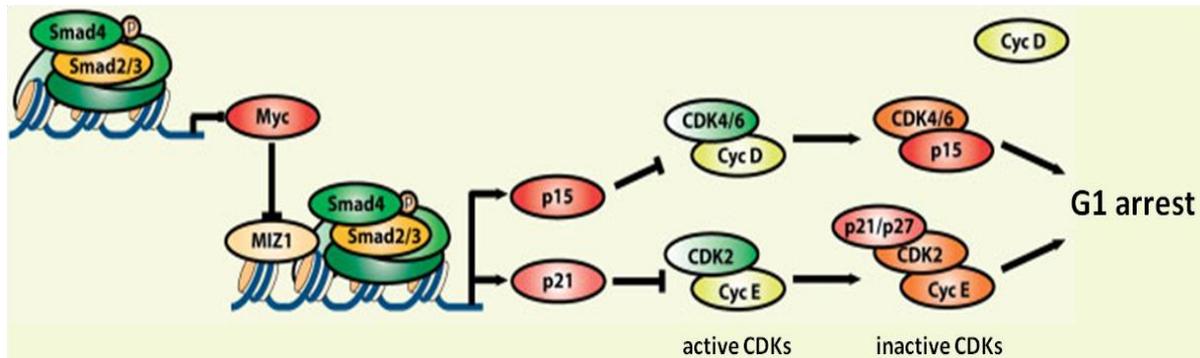


Figure 53 : Le TGF- β 1 contrôle la progression du cycle cellulaire en inhibant le facteur de transcription Myc et active la transcription des CDKIs p21 et p15 aboutissant à un blocage du cycle cellulaire en phase G1 ³²²

L'étude du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence une augmentation des débris cellulaires après 72 heures de traitement (correspondant à la phase subG0) suggérant ainsi que le TGF- β 1 n'agit pas sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome mais sur la mort cellulaire. Le TGF- β 1 a été décrit comme pouvant induire l'apoptose dans une grande variété de cellules. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables restent encore inconnus et sont donc à définir. Les cellules MOS-J surexprimant ADAM12 sont plus sensibles à cet effet du TGF- β 1. ADAM12 renforcerait donc la mort cellulaire induite par le TGF- β 1 donc le rôle anti-tumoral que ce facteur peut avoir. Il sera donc nécessaire de

définir le type de mort cellulaire provoqué par le TGF- β 1.

Le TGF- β active deux fonctions clés impliquées dans le processus métastatique; la migration et l'invasion cellulaires. Cet effet est en partie dû à l'induction de l'expression des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 via l'activation de la voie Smad ³²⁹. Grâce à ces propriétés, le TGF- β participe aux phénomènes d'intravasation et d'extravasation et donc à la dissémination métastatique de nombreux cancers ^{330,331}. Nos résultats montrent que le TGF- β 1 active la migration des cellules K7M2, et l'inhibition d'ADAM12 bloque cet effet. Ces résultats restent à confirmer et des études complémentaires sur la migration mais également sur l'invasion cellulaire sont nécessaires. ADAM12 pourrait donc être un facteur pro-métastatique indépendamment de son activité protéasique en potentialisant l'activité pro-migratoire et pro-invasive du TGF- β 1.

Etant donnée son implication au cours de la progression tumorale et métastatique, la voie du TGF- β est une cible potentielle dans de nombreux types de cancers. Il constitue donc une voie de recherche importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La production de TGF- β est souvent induite par les fibroblastes du stroma ou par la tumeur elle-même. Pour diminuer la production de TGF- β ectopique, des molécules antisens ont été utilisées. Ces molécules ont donné des résultats encourageants au cours d'essais précliniques en diminuant la tumorigénicité ^{332,333}. D'autres stratégies sont utilisées en préclinique comme l'utilisation de récepteurs solubles du TGF- β ou d'anticorps neutralisants. Ces études ont montré l'inhibition du développement de métastases pulmonaires, pancréatiques et hépatiques. Un anticorps monoclonal neutralisant le TGF- β est en développement pour des essais cliniques de phases I et II chez des patients atteints de mélanomes métastatiques ou de carcinomes rénaux. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphorylation de Smad2/Smad3 par restriction de l'activité kinase de T β RI (tels que SD-208, Ki26894 et LY2 109 761) a prouvé l'inhibition de certaines propriétés du TGF- β *in vitro* et *in vivo* sur des lignées tumorales. Ces inhibiteurs sont actuellement proposés dans différents essais cliniques ³³⁰. Nos résultats montrent l'implication d'ADAM12 dans la voie du TGF- β dans l'ostéosarcome. L'inhibition de l'expression de cette métalloprotéase pourrait constituer une nouvelle voie de recherche complémentaire. Il est cependant nécessaire de déterminer dans un premier temps le rôle exact du TGF- β dans le développement tumoral de l'ostéosarcome, notamment en s'assurant qu'il joue bien un rôle

pro-tumoral, et dans un second temps qu'ADAM12 augmente bien l'activité de la voie Smad *in vivo* et donc l'effet du TGF- β .

Le tropisme des tumeurs osseuses primitives ou métastatiques pour l'os provient en particulier de la présence de facteurs de croissance comme le TGF- β dans le microenvironnement osseux après son relargage durant le phénomène de résorption osseuse. En effet, celui-ci agit comme un composé central dans le couplage formation osseuse et résorption durant le remodelage. Le TGF- β libéré directement de la matrice stimule la résorption ostéoclastique et inhibe la différenciation ostéoblastique³³⁴ ainsi que la minéralisation par un processus Smad3-dépendant. Tous ces facteurs vont stimuler l'installation et le développement de la tumeur en site osseux, et en retour, les cellules tumorales vont produire directement ou indirectement des facteurs pro-ostéolytiques (hormones, cytokines, facteurs de croissance) via des interactions avec les cellules stromales. Parmi ces facteurs, le PTHrP va promouvoir la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes en induisant la production de RANKL par les ostéoblastes. Ainsi, l'intensification de la résorption osseuse va favoriser le cercle vicieux en induisant la libération de facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse et de cette manière, favoriser le développement de la tumeur. Par ailleurs, les propriétés de la matrice osseuse elle-même, incluant un faible taux en oxygène, un pH acide et de fortes concentrations extracellulaires en phosphate et calcium (notamment induites par la résorption osseuse) créent un environnement favorable à la croissance tumorale³³⁵. ADAM12 pourrait intervenir dans la mise en place de ce cercle vicieux en étant à la fois produit par les cellules tumorales sous l'influence du TGF- β et en potentialisant la voie du TGF- β .

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le tissu osseux est un tissu conjonctif complexe en perpétuel remaniement, reposant sur l'équilibre de deux mécanismes fondamentaux: la formation et la résorption osseuse. Tout déséquilibre entre ces processus est à l'origine de pathologies qui peuvent être ostéocondensantes ou ostéolytiques, bénignes ou malignes. L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales précédé d'une phase d'ostéolyse importante. Les traitements actuels, qui consistent en une résection chirurgicale de la tumeur et en une polychimiothérapie néoadjuvante et adjuvante (associant principalement le méthotrexate, le cisplatine, la doxorubicine et l'ifosfamide), ont permis d'améliorer les taux de survie des patients. Mais la forte toxicité des molécules de chimiothérapie utilisées, souvent mal tolérées chez les jeunes patients, le mauvais pronostic associé à la détection de métastases pulmonaires, ainsi que l'apparition de résistance rendent nécessaire le développement de nouvelles thérapies des ostéosarcomes.

Dans ce but, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles est essentielle. Les protéases sont des cibles intéressantes du fait de leurs rôles à la fois dans la physiopathologie osseuse et dans la cancérogenèse. En effet, les protéases participent activement au remodelage osseux, particulièrement via leur activité protéasique. Elles peuvent dégrader les protéines de la matrice osseuse, tels que le collagène de type I, et elles participent à la libération de facteurs essentiels dans la biologie osseuse comme RANKL, TNF- α ou encore EGF. Les protéases sont aussi importantes dans le développement de la plupart des cancers en jouant sur de nombreux processus pro-tumoraux : elles favorisent ainsi la migration et l'invasion cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation et le processus métastatique. L'action de ces protéases dans le cadre des ostéosarcomes est encore mal connue et il est donc nécessaire de mieux la définir.

L'objectif de cette thèse était donc dans un premier temps d'identifier une ou des protéases potentiellement impliquées dans le développement des ostéosarcomes, et particulièrement dans l'ostéolyse paratumorale. En établissant un profil d'expression d'une vingtaine de protéases dans trois modèles murins d'ostéosarcome, nous avons observé une expression plus forte d'ADAM12 dans les ostéosarcomes définis comme les plus ostéolytiques. Cette métalloprotéase de la famille des ADAMs a été décrite précédemment comme étant essentiellement pro-tumorale dans de nombreux cancers mais l'effet

d'ADAM12 sur le développement de tumeurs primitives ou secondaires dans un contexte osseux n'avait pas été étudié.

Comme le montrent nos expériences, ADAM12 facilite la croissance tumorale de deux modèles d'ostéosarcomes murins. Cet effet semble dû en partie à une induction de la prolifération cellulaire mais également à une augmentation de l'ostéolyse paratumorale. En effet, ADAM12 faciliterait dans un contexte tumoral l'ostéoclastogénèse et inhiberait l'ostéoblastogénèse déséquilibrant ainsi la balance résorption/formation en faveur de la dégradation osseuse. Néanmoins, les analyses histologiques et immunohistologiques réalisées ne nous permettent pas de confirmer le rôle d'ADAM12 dans l'ostéoclastogénèse et l'ostéoblastogénèse. Nous avons en effet observé ce rôle anti-ostéoblastique et pro-ostéoclastogénique qu'à des stades tardifs du développement tumoral et il est donc nécessaire de réaliser des expériences complémentaires afin de valider cet effet. De nouvelles analyses histologiques et immunohistologiques doivent donc être réalisées à des stades plus précoces. De plus, une confirmation *in vitro* est également essentielle. A cette fin, l'étude de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes matures et de la différenciation de monocytes en ostéoclastes actifs en coculture avec des cellules d'ostéosarcomes exprimant ou non ADAM12 devra être réalisée. Enfin, une forte expression d'ADAM12 semble favoriser l'implantation de la tumeur. Ainsi, par l'induction de l'ensemble de ces processus, ADAM12 participerait activement à la mise en place du cercle vicieux et augmenterait donc la croissance et la progression tumorales des ostéosarcomes.

Notre travail n'a pas permis de définir les mécanismes responsables du rôle pro-tumoral d'ADAM12, aussi bien l'augmentation de la prolifération des cellules tumorales que l'induction de la dégradation osseuse. La libération par un clivage protéolytique de facteurs induisant ces effets semble être l'hypothèse la plus probable. Parmi les substrats connus d'ADAM12, les ligands de l'EGFR, tels que l'EGF et l'HB-EGF, sont des candidats possibles. En effet, l'activation de la voie de l'EGFR augmente la prolifération de nombreux types cellulaires dont les cellules d'ostéosarcome. De plus, cette famille de ligands joue un rôle dans le remodelage osseux en inhibant la formation osseuse et en activant la résorption. Un clivage de ces ligands par ADAM12 expliquerait donc l'ensemble des effets observés. Cette hypothèse doit cependant être confirmée notamment en analysant la quantité d'EGF

ou d'HB-EGF libérée dans les surnageants de culture ainsi que dans le microenvironnement tumoral. Nous devons aussi vérifier qu'ils assurent bien les rôles définis précédemment.

Nous ne pouvons cependant pas exclure que certains des effets d'ADAM12 ne soit pas dû à ses autres activités. Il possède en effet différentes fonctions au sein de la cellule et peut par exemple activer des voies de signalisation via son domaine intracytoplasmique. Afin de s'affranchir de son rôle protéasique, des formes d'ADAM12 mutées dépourvues de leur activité catalytique doivent être produites et exprimées au sein des différentes lignées d'ostéosarcome, ayant une expression basale faible d'ADAM12. Ainsi, en réalisant des expériences similaires à celles présentées dans cette thèse, nous observerons si une forme d'ADAM12 sans activité enzymatique a la même influence sur le développement des ostéosarcomes.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié la relation qu'entretient ADAM12 avec le TGF- β , un facteur fortement présent dans le microenvironnement tumoral en site osseux. En effet, la matrice osseuse est un lieu de stockage important du TGF- β et ce facteur est relargué et activé durant les phases d'ostéolyse. Ce facteur participerait alors à la mise en place du cercle vicieux comme cela a été décrit dans les métastases osseuses en induisant la sécrétion de facteurs pro-ostéoclastiques (PTHrP, IL-11) par les cellules tumorales.

Nous avons montré que, parmi les différents facteurs étudiés impliqués dans la physiopathologie osseuse, seul le TGF- β induit l'expression d'ADAM12 dans les cellules d'ostéosarcome. En retour, ADAM12 potentialise l'activation de la voie Smad par le TGF- β . Nous avons donc ici affaire à une boucle de rétrocontrôle positif. Nous avons également observé que le TGF- β inhibe la viabilité des lignées murines d'ostéosarcome *in vitro*, contrairement à ce qui a été montré dans d'autres lignées d'ostéosarcome. Cet effet n'est cependant pas dû à un blocage du cycle cellulaire. De plus, une augmentation de la migration cellulaire en présence de TGF- β a été observée dans un des deux modèles murins d'ostéosarcome étudiés. Ces deux effets anti-viabilité et pro-migratoire du TGF- β sont en partie dépendants de l'expression d'ADAM12. En effet, ADAM12, probablement en potentialisant l'activation de la voie Smad, augmente ces deux processus induits par le TGF- β .

Différents points restent encore à éclaircir. L'effet sur la viabilité semble être dû à une induction de la mort cellulaire. Le TGF- β a été décrit comme pouvant provoquer l'apoptose et cette hypothèse doit être vérifiée dans nos modèles d'ostéosarcome. Nous devons également poursuivre notre étude sur le rôle pro-migratoire du TGF- β mais également sur son effet dans l'invasion cellulaire. En effet, le TGF- β a été décrit comme favorisant l'invasion cellulaire, notamment en augmentant l'expression de deux métalloprotéases, la MMP-2 et la MMP-9. Il serait intéressant de vérifier si cet effet, observé dans de nombreux types tumoraux, est également retrouvé dans le cadre de l'ostéosarcome. Enfin, il faudrait compléter notre travail par une approche *in vivo* afin d'appréhender le rôle du TGF- β sur le développement des ostéosarcomes dans des modèles expérimentaux. En effet, le TGF- β , qui a des effets pro-migratoires et anti-viabilité *in vitro*, pourrait avoir des effets différents *in vivo*. Cela nous permettrait également d'observer si le TGF- β exerce globalement une activité pro- ou anti-tumorale sur les ostéosarcomes.

L'ensemble de ce travail de thèse a mis en évidence l'influence d'un système composé de deux protéines, ADAM12 et le TGF- β , sur la mise en place du cercle vicieux dans le cadre des ostéosarcomes (**Figure 54**). Les cellules d'ostéosarcome ostéolytiques sont capables d'exprimer ADAM12, qui va alors d'une part induire la prolifération cellulaire et d'autre part favoriser l'ostéolyse probablement en activant l'ostéoclastogenèse. La dégradation de la matrice osseuse libère ensuite différents facteurs de croissance promouvant la croissance tumorale, parmi ceux-ci le TGF- β . Ce facteur augmente l'expression d'ADAM12 par les cellules tumorales, qui en retour potentialise l'activité du TGF- β en contribuant à l'activation de la voie des Smads. Ce processus accroît les activités pro-migratoire et anti-viabilité potentielles du TGF- β sur les cellules d'ostéosarcome. Ainsi, le système ADAM12/TGF- β constitue une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le développement des ostéosarcomes.

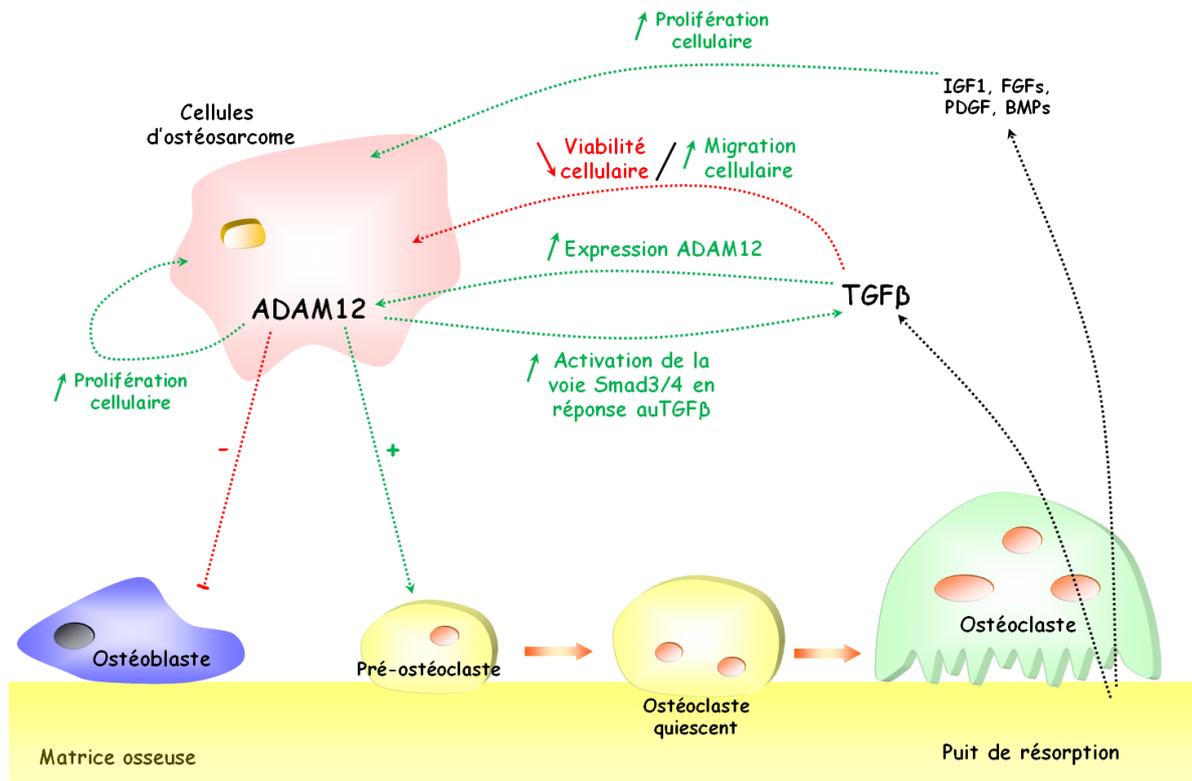


Figure 54 : Schéma récapitulatif des effets observés d'ADAM12 et du TGF- β dans le développement des ostéosarcomes

Durant ce travail de thèse, l'influence d'ADAM12 n'a été étudiée que dans des ostéosarcomes murins. Nous avons en effet observé une augmentation importante d'ADAM12 dans les ostéosarcomes murins ostéolytiques. Cependant, la majorité des patients présentent un ostéosarcome ostéoblastique, se rapprochant ainsi du modèle murin MOS-J. Ainsi, l'importance d'ADAM12 dans le développement des ostéosarcomes chez l'homme reste à démontrer, l'objectif final étant de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est donc nécessaire de poursuivre notre étude sur la pathologie humaine. A cette fin, nous devons confirmer nos résultats sur des modèles induits par l'injection de cellules humaines d'ostéosarcome chez des souris immunodéficientes. L'expression protéique d'ADAM12 devra aussi être analysée dans des biopsies humaines par immunohistologie (il existe en effet des anticorps anti-ADAM12 humain efficaces) afin, d'une part de s'assurer que les ostéosarcomes humains expriment ADAM12, et d'autre part d'étudier une corrélation entre l'agressivité de la tumeur et l'expression d'ADAM12. Enfin, notre étude peut être étendue à d'autres types de tumeurs osseuses primitives tels que le sarcome d'Ewing. Cette tumeur osseuse primitive rare, touchant une population jeune, est le plus souvent caractérisée par l'expression d'une protéine de fusion EWS-FLI1 (due à une

translocation chromosomique) qui exerce une activité oncogénique via une activation ou une inhibition anormale de gènes cibles. La présence de larges plages ostéolytiques est détectée au site de développement de ce type tumoral. La problématique biologique du cercle vicieux est donc valable dans le cas des sarcomes d'Ewing et ADAM12 pourrait avoir des effets similaires à ceux observés dans l'ostéosarcome.

ADAM12 n'est sans doute pas la seule protéase impliquée dans la mise en place du cercle vicieux dans le cadre des ostéosarcomes et plus généralement des tumeurs osseuses. L'étude du profil d'expression de différentes protéases nous a permis d'observer une plus forte expression d'ADAM12 dans les modèles ostéolytiques mais également de deux autres protéines : une autre métalloprotéase de la famille des ADAMs, ADAM8, et un inhibiteur des métalloprotéases TIMP3 (**Figure 55**).

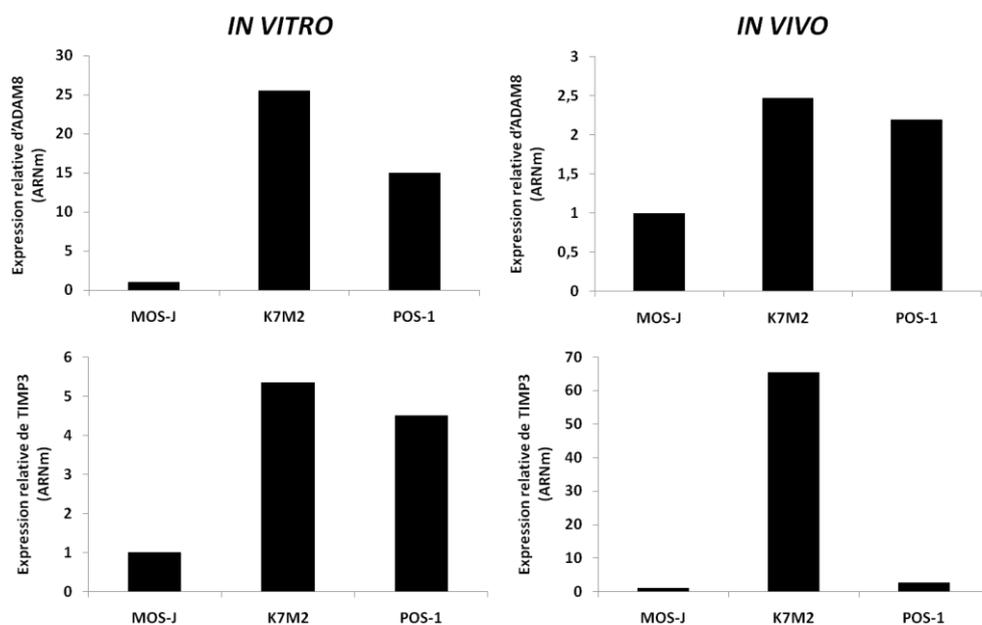


Figure 55 : ADAM8 et TIMP3 sont plus fortement exprimés par les lignées ostéolytiques K7M2 et POS-1 par rapport à la lignée ostéogénique MOS-J

ADAM8 est une métalloprotéase encore très peu étudiée. Cependant, deux de ses fonctions font de cette protéase un sujet d'étude intéressant dans le cadre des ostéosarcomes. En effet, ADAM8 est un facteur pro-tumoral dans différents types de cancer et une forte expression est corrélée avec une augmentation de l'invasion et de l'agressivité tumorale^{336,337}. Une étude a également montré qu'ADAM8 semble être un facteur de mauvais pronostic dans les ostéosarcomes³³⁸. De plus, ADAM8 exerce une activité pro-

ostéoclastique et favorise donc l'ostéolyse^{267,339}. Ainsi, par ces deux activités, ADAM8 pourrait jouer un rôle important dans le développement des ostéosarcomes en prenant part activement à la mise en place du cercle vicieux. Cette hypothèse doit cependant être validée par des approches *in vitro* et *in vivo* similaires à celles utilisées pour l'étude de l'influence d'ADAM12.

Nous avons également observé une plus forte expression de TIMP3, un inhibiteur des métalloprotéases, dans les modèles ostéolytiques POS-1 et K7M2 que dans le modèle ostéogénique MOS-J. A l'inverse d'ADAM8 et d'ADAM12, TIMP3 est considéré comme un facteur défavorable à la progression tumorale et notamment des ostéosarcomes. En effet, une hyperméthylation du promoteur du gène TIMP3, aboutissant à une baisse de son expression, a été détectée chez les patients atteints d'ostéosarcome³⁴⁰. Cependant, aucune étude de l'impact réel de TIMP3 dans le développement des ostéosarcomes n'a été menée, particulièrement sur son rôle dans l'ostéolyse paratumorale. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence de TIMP3 dans nos modèles. De plus, TIMP3 est décrit comme étant un inhibiteur de la forme soluble d'ADAM12²⁰⁴. Son activité inhibitrice n'a cependant pas été montrée sur l'isoforme membranaire d'ADAM12. Nos modèles ostéolytiques exprimant ADAM12 pourraient ainsi sécréter parallèlement son inhibiteur. Nous devons donc vérifier si TIMP3 exprimé par nos cellules d'ostéosarcome a ou non une activité inhibitrice vis-à-vis d'ADAM12. Enfin, des résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence une induction de l'expression de TIMP3 par le TGF- β et ce en fonction du temps de traitement (**Figure 56**). Le TGF- β contrôle donc à la fois l'expression d'ADAM12 et de TIMP3. Cette observation renforce l'idée qu'il est nécessaire de définir le rôle de TIMP3 dans l'ostéosarcome, notamment en étudiant les conséquences de son expression sur la croissance et l'ostéolyse paratumorale. En effet, le TGF- β pourrait avoir ainsi un effet paradoxal en exerçant une activité pro-tumorale via l'induction de l'expression d'ADAM12 et une activité anti-tumorale en augmentant l'expression de TIMP3.

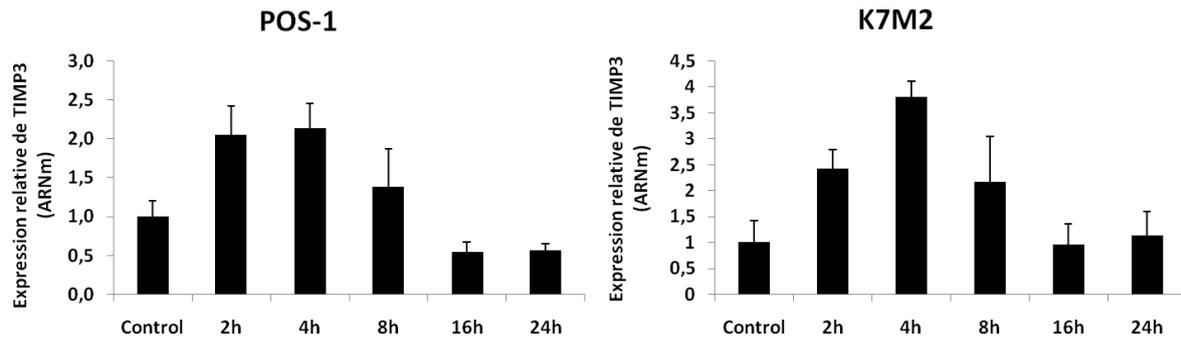


Figure 56 : Le TGF- β induit l'expression de TIMP3 dans les lignées d'ostéosarcome POS-1 et K7M2

Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois dans l'ostéosarcome le rôle d'une métalloprotéase, ADAM12, dans la mise en place du cercle vicieux entre croissance tumorale et ostéolyse. Ces données viennent ainsi compléter l'état de nos connaissances sur ce processus pro-cancéreux important dans les tumeurs osseuses. ADAM12 représente alors une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les ostéosarcomes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Toppets, V. *et al.* Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Md. vét* **148**, 1–13 (2004).
2. Marieb, E. N. & Hoehn, K. *Human Anatomy & Physiology*. (Pearson Benjamin Cummings: 2007).
3. Ruoslahti, E. Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**, 1–5 (1991).
4. Glowacki, J., Rey, C., Glimcher, M. J., Cox, K. A. & Lian, J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **45**, 292–302 (1991).
5. Swaminathan, R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta* **313**, 95–105 (2001).
6. Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E. & Klagsbrun, M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J. Biol. Chem.* **261**, 12665–12674 (1986).
7. Owen, M. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* **10**, 63–76 (1988).
8. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
9. Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q. & Wagner, E. F. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.* **122**, 685–701 (1993).
10. Wagner, E. F. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann. Rheum. Dis.* **61 Suppl 2**, ii40–42 (2002).
11. Wang, Z. Q. *et al.* Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**, 741–745 (1992).
12. Guihard, P. *et al.* Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells* **30**, 762–772 (2012).
13. Noble, B. S. *et al.* Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **284**, C934–943 (2003).
14. Brounais, B. *et al.* Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone* **44**, 830–839 (2009).
15. Hattersley, G. & Chambers, T. J. Generation of osteoclasts from hemopoietic cells and a multipotential cell line in vitro. *J. Cell. Physiol.* **140**, 478–482 (1989).
16. Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* **13**, 66–80 (1992).
17. Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P. & Osdoby, P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1404–1418 (2003).
18. Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P. & Osdoby, P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 2065–2077 (2004).
19. Lacey, D. L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165–176 (1998).
20. Suda, T. *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345–357 (1999).
21. Holliday, L. S., Bubb, M. R., Jiang, J., Hurst, I. R. & Zuo, J. Interactions between vacuolar H⁺-ATPases and microfilaments in osteoclasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 419–423 (2005).

22. Chellaiah, M. A. Regulation of podosomes by integrin α v β 3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 311–317 (2006).
23. Rousselle, A.-V. & Heymann, D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* **30**, 533–540 (2002).
24. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137 (2000).
25. Turner, C. H. & Pavalko, F. M. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* **3**, 346–355 (1998).
26. Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309–319 (1997).
27. Parfitt, A. M. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone* **26**, 319–323 (2000).
28. Hill, P. A. Bone remodelling. *Br J Orthod* **25**, 101–107 (1998).
29. Lerner, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J. Dent. Res.* **85**, 584–595 (2006).
30. Desandes, E. *et al.* Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* **43**, 749–757 (2004).
31. Capasso, L. L. Antiquity of cancer. *Int. J. Cancer* **113**, 2–13 (2005).
32. Mohseny, A. B. & Hogendoorn, P. C. W. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells* **29**, 397–403 (2011).
33. Wagner, E. R. *et al.* Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma. *Sarcoma* **2011**, 1–12 (2011).
34. Linet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E. & Devesa, S. S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1051–1058 (1999).
35. Jaffe, N., Carrasco, H., Raymond, K., Ayala, A. & Eftekhari, F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* **95**, 2202–2210 (2002).
36. Chauveinc, L. *et al.* Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet.* **22**, 77–88 (2001).
37. Varley, J. M., Evans, D. G. & Birch, J. M. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br. J. Cancer* **76**, 1–14 (1997).
38. Leonard, A., Craft, A. W., Moss, C. & Malcolm, A. J. Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome. *Med. Pediatr. Oncol.* **26**, 249–253 (1996).
39. López-Guerrero, J. A., López-Ginés, C., Pellín, A., Carda, C. & Llombart-Bosch, A. Dereglulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn. Mol. Pathol.* **13**, 81–91 (2004).
40. Fuchs, B. & Pritchard, D. J. Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 40–52 (2002).
41. Wadayama, B. *et al.* Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res.* **54**, 3042–3048 (1994).
42. Sandberg, A. A. & Bridge, J. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **145**, 1–30 (2003).
43. Wu, X., Cai, Z., Lou, L. & Zhu, Y. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol* **36**, 212–216 (2012).

44. Leaner, V. D. *et al.* Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am. J. Pathol.* **174**, 265–275 (2009).
45. Cui, J. *et al.* Epigenetic changes in osteosarcoma. *Bull Cancer* **98**, E62–68 (2011).
46. Bacci, G. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann. Oncol.* **14**, 1126–1134 (2003).
47. Bielack, S. S. *et al.* Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* **20**, 776–790 (2002).
48. Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D. & Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 49–60 (2004).
49. Moriceau, G. *et al.* Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 2981–2987 (2010).
50. Holen, I. & Coleman, R. E. Bisphosphonates as treatment of bone metastases. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1262–1271 (2010).
51. Lamoureux, F. *et al.* Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **67**, 7308–7318 (2007).
52. Lamoureux, F. *et al.* Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3389–3398 (2008).
53. Rousseau, J. *et al.* Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 2452–2462 (2011).
54. Body, J.-J. *et al.* A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1221–1228 (2006).
55. Moriceau, G. *et al.* Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res.* **70**, 10329–10339 (2010).
56. Collen, D. & Lijnen, H. R. The fibrinolytic system in man. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **4**, 249–301 (1986).
57. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
58. Mook, O. R. F., Frederiks, W. M. & Van Noorden, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1705**, 69–89 (2004).
59. Lijnen, H. R. Pathophysiology of the plasminogen/plasmin system. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **26**, 1–6 (1996).
60. Kielberg, V. *et al.* Proenzyme to urokinase-type plasminogen activator in the mouse in vivo. *FEBS Lett.* **182**, 441–445 (1985).
61. Petersen, L. C., Lund, L. R., Nielsen, L. S., Danø, K. & Skriver, L. One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 11189–11195 (1988).
62. Wun, T. C., Ossowski, L. & Reich, E. A proenzyme form of human urokinase. *J. Biol. Chem.* **257**, 7262–7268 (1982).

63. Kasai, S., Arimura, H., Nishida, M. & Suyama, T. Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J. Biol. Chem.* **260**, 12377–12381 (1985).
64. Sim, P. S., Fayle, D. R., Doe, W. F. & Stephens, R. W. Monoclonal antibodies inhibitory to human plasmin. Definitive demonstration of a role for plasmin in activating the proenzyme of urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* **158**, 537–542 (1986).
65. Danø, K. *et al.* Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **44**, 139–266 (1985).
66. Stephens, R. W. *et al.* Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J. Cell Biol.* **108**, 1987–1995 (1989).
67. Goretzki, L. *et al.* Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* **297**, 112–118 (1992).
68. Kobayashi, H. *et al.* Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J. Biol. Chem.* **266**, 5147–5152 (1991).
69. Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Kumar, A. & Saedi, M. S. Prostatic human kallikrein 2 inactivates and complexes with plasminogen activator inhibitor-1. *Int. J. Cancer* **81**, 438–442 (1999).
70. Blasi, F. & Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 932–943 (2002).
71. Samad, F., Yamamoto, K. & Loskutoff, D. J. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **97**, 37–46 (1996).
72. Alessi, M. C. *et al.* Detection of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNA in human megakaryocytes by in situ hybridization. *Thromb. Haemost.* **72**, 931–936 (1994).
73. Bode, W. & Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433–451 (1992).
74. Andreasen, P. A. *et al.* Plasminogen activator inhibitor type-1: reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* **209**, 213–218 (1986).
75. Skeldal, S. *et al.* Binding areas of urokinase-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complex for endocytosis receptors of the low-density lipoprotein receptor family, determined by site-directed mutagenesis. *FEBS J.* **273**, 5143–5159 (2006).
76. Croucher, D. R., Saunders, D. N., Lobov, S. & Ranson, M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 535–545 (2008).
77. Herz, J. & Strickland, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* **108**, 779–784 (2001).
78. Lecaille, F., Brömme, D. & Lalmanach, G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* **90**, 208–226 (2008).
79. Turk, B., Turk, D. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 98–111 (2000).
80. Turk, B. *et al.* Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 225–230 (1995).
81. Nissler, K. *et al.* Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *Biol. Chem.* **379**, 219–224 (1998).

82. Nishimura, Y., Kawabata, T., Furuno, K. & Kato, K. Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 400–406 (1989).
83. Rowan, A. D., Mason, P., Mach, L. & Mort, J. S. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**, 15993–15999 (1992).
84. Jerala, R., Zerovnik, E., Kidric, J. & Turk, V. pH-induced conformational transitions of the propeptide of human cathepsin L. A role for a molten globule state in zymogen activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 11498–11504 (1998).
85. Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251–264 (2007).
86. Linnevers, C., Smeekens, S. P. & Brömme, D. Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Lett.* **405**, 253–259 (1997).
87. Wex, T., Wex, H., Hartig, R., Wilhelmsen, S. & Malfertheiner, P. Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells. *FEBS Lett.* **552**, 115–119 (2003).
88. Vasiljeva, O. *et al.* Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 387–403 (2007).
89. Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63–88 (1997).
90. Baici, A. Inhibition of extracellular matrix-degrading endopeptidases: problems, comments, and hypotheses. *Biol. Chem.* **379**, 1007–1018 (1998).
91. Turk, V. & Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **285**, 213–219 (1991).
92. Allan, J. A. *et al.* Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem. J.* **309** (Pt 1), 299–306 (1995).
93. Fillmore, H. L., VanMeter, T. E. & Broaddus, W. C. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J. Neurooncol.* **53**, 187–202 (2001).
94. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839 (2003).
95. Lynch, C. C. *et al.* MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* **7**, 485–496 (2005).
96. Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M. & Matrisian, L. M. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* **9**, 1441–1447 (1999).
97. Yu, Q. & Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14**, 163–176 (2000).
98. d'Ortho, M. P. *et al.* Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* **250**, 751–757 (1997).
99. Seals, D. F. & Courtneidge, S. A. The ADAMs family of metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**, 7–30 (2003).
100. Iba, K. *et al.* The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J. Cell Biol.* **149**, 1143–1156 (2000).
101. Moss, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733–736 (1997).

102. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
103. Lum, L. *et al.* Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**, 13613–13618 (1999).
104. Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**, 769–779 (2004).
105. Izumi, Y. *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 7260–7272 (1998).
106. Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. & Edwards, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* **386**, 15–27 (2005).
107. Jones, G. C. & Riley, G. P. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**, 160–169 (2005).
108. Miwa, H. E. *et al.* Conserved sequence in the aggrecan interglobular domain modulates cleavage by ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 161–172 (2009).
109. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B. & Chung, D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* **98**, 1662–1666 (2001).
110. Hamze, A. B. *et al.* Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Sci.* **16**, 1905–1913 (2007).
111. Amour, A. *et al.* TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* **435**, 39–44 (1998).
112. Nagase, H. & Murphy, G. Tailoring TIMPs for Selective Metalloproteinase Inhibition. *The Cancer Degradome* 787–810 (2008).at
<<http://www.springerlink.com/content/r2650q8t56458277/abstract/>>
113. Littlewood-Evans, A. *et al.* Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* **20**, 81–86 (1997).
114. Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A. & Desnick, R. J. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**, 1236–1238 (1996).
115. Kiviranta, R. *et al.* Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1444–1452 (2001).
116. Li, Z., Hou, W.-S., Escalante-Torres, C. R., Gelb, B. D. & Bromme, D. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **277**, 28669–28676 (2002).
117. Delaissé, J.-M. *et al.* Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 504–513 (2003).
118. Itoh, Y. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* **58**, 589–596 (2006).
119. Holmbeck, K. *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81–92 (1999).
120. Ishibashi, O., Niwa, S., Kadoyama, K. & Inui, T. MMP-9 antisense oligodeoxynucleotide exerts an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption by suppressing cell migration. *Life Sci.* **79**, 1657–1660 (2006).
121. Vu, T. H. *et al.* MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411–422 (1998).

122. Lind, T., McKie, N., Wendel, M., Racey, S. N. & Birch, M. A. The hyaluronan-degrading ADAMTS-1 enzyme is expressed by osteoblasts and up-regulated at regions of new bone formation. *Bone* **36**, 408–417 (2005).
123. Miles, R. R. *et al.* ADAMTS-1: A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs is a target for parathyroid hormone in bone. *Endocrinology* **141**, 4533–4542 (2000).
124. Rehn, A. P., Birch, M. A., Karlström, E., Wendel, M. & Lind, T. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone* **41**, 231–238 (2007).
125. Naito, S. *et al.* Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol. Int.* **57**, 703–711 (2007).
126. Song, R.-H. *et al.* Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* **56**, 575–585 (2007).
127. Rao, H. *et al.* Alpha9beta1: a novel osteoclast integrin that regulates osteoclast formation and function. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1657–1665 (2006).
128. Ainola, M. *et al.* Involvement of a disintegrin and a metalloproteinase 8 (ADAM8) in osteoclastogenesis and pathological bone destruction. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 427–434 (2009).
129. Karadag, A., Zhou, M. & Croucher, P. I. ADAM-9 (MDC-9/meltrin-gamma), a member of the a disintegrin and metalloproteinase family, regulates myeloma-cell-induced interleukin-6 production in osteoblasts by direct interaction with the alpha(v)beta5 integrin. *Blood* **107**, 3271–3278 (2006).
130. Lynch, C. C. *et al.* MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* **7**, 485–496 (2005).
131. Wilson, T. J., Nannuru, K. C., Futakuchi, M., Sadanandam, A. & Singh, R. K. Cathepsin G enhances mammary tumor-induced osteolysis by generating soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Cancer Res.* **68**, 5803–5811 (2008).
132. Lum, L. *et al.* Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**, 13613–13618 (1999).
133. Hikita, A. *et al.* Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J. Biol. Chem.* **281**, 36846–36855 (2006).
134. Kwan Tat, S., Padrines, M., Théoleyre, S., Heymann, D. & Fortun, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 49–60 (2004).
135. Shiomi, T., Lemaître, V., D’Armiento, J. & Okada, Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International* **60**, 477–496 (2010).
136. Cui, X., Rouhani, F. N., Hawari, F. & Levine, S. J. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J. Immunol.* **171**, 6814–6819 (2003).
137. Chalaris, A. *et al.* ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 234–245 (2010).
138. Sahin, U. *et al.* Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* **164**, 769–779 (2004).
139. Yi, T. *et al.* Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through cross-talking with RANK signaling. *J. Cell. Physiol.* **217**, 409–422 (2008).

140. Rocks, N. *et al.* Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* **90**, 369–379 (2008).
141. Zhang, Z., Jimi, E. & Bothwell, A. L. M. Receptor activator of NF-kappa B ligand stimulates recruitment of SHP-1 to the complex containing TNFR-associated factor 6 that regulates osteoclastogenesis. *J. Immunol.* **171**, 3620–3626 (2003).
142. Singhatanadgit, W., Salih, V. & Olsen, I. Bone morphogenetic protein receptors and bone morphogenetic protein signaling are controlled by tumor necrosis factor-alpha in human bone cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1794–1807 (2006).
143. Reddy, P. *et al.* Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14608–14614 (2000).
144. Govoni, K. E. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor binding protein-5, four and a half lim-2, and a disintegrin and metalloprotease-9 expression in osteoblasts. *Growth Horm. IGF Res.* **16**, 49–56 (2006).
145. Mukherjee, A. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits osteoblast differentiation and skeletal growth by blocking insulin-like growth factor actions. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1238–1250 (2008).
146. Georges, S. *et al.* Proteases and bone remodelling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **20**, 29–41 (2009).
147. Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R. & Wewer, U. M. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 511–515 (2000).
148. Nakamura, M. *et al.* Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 1011–1016 (2005).
149. Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A. & Klagsbrun, M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J. Biol. Chem.* **272**, 31730–31737 (1997).
150. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart *et al.*, Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin. Cancer Res.* **9**, 551–554 (2003).
151. Iozzo, R. V., Zoeller, J. J. & Nyström, A. Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Mol. Cells* **27**, 503–513 (2009).
152. Bergers, G. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 737–744 (2000).
153. Göoz, P., Göoz, M., Baldys, A. & Hoffman, S. ADAM-17 regulates endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 33–38 (2009).
154. Weskamp, G. *et al.* Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes. *Circ. Res.* **106**, 932–940 (2010).
155. Ribatti, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk. Res.* **33**, 638–644 (2009).
156. Heljasvaara, R. *et al.* Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp. Cell Res.* **307**, 292–304 (2005).
157. Cornelius, L. A. *et al.* Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunol.* **161**, 6845–6852 (1998).

158. Patterson, B. C. & Sang, Q. A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* **272**, 28823–28825 (1997).
159. Manicone, A. M. & McGuire, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 34–41 (2008).
160. Luo, J.-L., Maeda, S., Hsu, L.-C., Yagita, H. & Karin, M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* **6**, 297–305 (2004).
161. Cox, J. H., Dean, R. A., Roberts, C. R. & Overall, C. M. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 19389–19399 (2008).
162. Li, Q., Park, P. W., Wilson, C. L. & Parks, W. C. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* **111**, 635–646 (2002).
163. Houghton, A. M., Hartzell, W. O., Robbins, C. S., Gomis-Rüth, F. X. & Shapiro, S. D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* **460**, 637–641 (2009).
164. Wolf, K. *et al.* Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **9**, 893–904 (2007).
165. Sabeh, F. *et al.* Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J. Cell Biol.* **167**, 769–781 (2004).
166. Weaver, A. M. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin. Exp. Metastasis* **23**, 97–105 (2006).
167. Boire, A. *et al.* PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120**, 303–313 (2005).
168. Najy, A. J., Day, K. C. & Day, M. L. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 18393–18401 (2008).
169. Betz, M. *et al.* 1.8-A crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) complexed with a peptidomimetic hydroxamate primed-side inhibitor with a distinct selectivity profile. *Eur. J. Biochem.* **247**, 356–363 (1997).
170. Macaulay, V. M. *et al.* Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin. Cancer Res.* **5**, 513–520 (1999).
171. Steward, W. P. & Thomas, A. L. Marimastat: the clinical development of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 2913–2922 (2000).
172. Sparano, J. A. *et al.* Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4683–4690 (2004).
173. Brown, P. D. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 2167–2177 (2000).
174. Levitt, N. C. *et al.* Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1912–1922 (2001).
175. Hidalgo, M. & Eckhardt, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 178–193 (2001).
176. Miller, K. D. *et al.* A randomized phase II feasibility trial of BMS-275291 in patients with early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1971–1975 (2004).

177. Dezube, B. J., Krown, S. E., Lee, J. Y., Bauer, K. S. & Aboulafia, D. M. Randomized phase II trial of matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1389–1394 (2006).
178. Krüger, A. *et al.* Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res.* **65**, 3523–3526 (2005).
179. Moss, M. L. & Bartsch, J. W. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. *Biochemistry* **43**, 7227–7235 (2004).
180. Zhou, B.-B. S. *et al.* Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* **10**, 39–50 (2006).
181. Witters, L. *et al.* Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 7083–7089 (2008).
182. Coxon, F. P., Thompson, K. & Rogers, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 307–312 (2006).
183. Mitropoulou, T. N., Tzanakakis, G. N., Kletsas, D., Kalofonos, H. P. & Karamanos, N. K. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **104**, 155–160 (2003).
184. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 55–71 (2010).
185. Troeberg, L. *et al.* Calcium pentosan polysulfate is a multifaceted exosite inhibitor of aggrecanases. *FASEB J.* **22**, 3515–3524 (2008).
186. Falardeau, P., Champagne, P., Poyet, P., Hariton, C. & Dupont, E. Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin. Oncol.* **28**, 620–625 (2001).
187. Huang, X. *et al.* Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **65**, 3470–3478 (2005).
188. Kousidou, O. C. *et al.* Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int. J. Oncol.* **26**, 1101–1109 (2005).
189. Fingleton, B. MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 61–68 (2008).
190. Cuniasse, P. *et al.* Future challenges facing the development of specific active-site-directed synthetic inhibitors of MMPs. *Biochimie* **87**, 393–402 (2005).
191. Devy, L. *et al.* Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* **69**, 1517–1526 (2009).
192. Shah, M. *et al.* An MMP13-selective inhibitor delays primary tumor growth and the onset of tumor-associated osteolytic lesions in experimental models of breast cancer. *PLoS ONE* **7**, e29615 (2012).
193. Le Gall, C. *et al.* A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* **67**, 9894–9902 (2007).
194. Shah, M. *et al.* An MMP13-selective inhibitor delays primary tumor growth and the onset of tumor-associated osteolytic lesions in experimental models of breast cancer. *PLoS ONE* **7**, e29615 (2012).
195. Kido, A. *et al.* Inhibition of spontaneous rat osteosarcoma lung metastasis by 3S-[4-(N-hydroxyamino)-2R-isobutylsuccinyl]amino-1-methoxy-3,4-dihydroc arbostyryl, a novel matrix metalloproteinase inhibitor. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 333–341 (1999).

196. Xu, J., Wu, S. & Shi, X. Expression of matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in osteosarcoma. *J. Orthop. Res.* **28**, 1621–1625 (2010).
197. Ferrari, C. *et al.* Role of MMP-9 and its tissue inhibitor TIMP-1 in human osteosarcoma: findings in 42 patients followed for 1-16 years. *Acta Orthop Scand* **75**, 487–491 (2004).
198. Foukas, A. F. *et al.* Stage-IIIB osteosarcomas around the knee. A study of MMP-9 in surviving tumour cells. *J Bone Joint Surg Br* **84**, 706–711 (2002).
199. Uchibori, M. *et al.* Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* **28**, 33–42 (2006).
200. Yagami-Hiromasa, T. *et al.* A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* **377**, 652–656 (1995).
201. Gilpin, B. J. *et al.* A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 157–166 (1998).
202. Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R. & Wewer, U. M. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **273**, 16993–16997 (1998).
203. Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. & Wewer, U. M. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J. Biol. Chem.* **274**, 13427–13433 (1999).
204. Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R. & Wewer, U. M. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 511–515 (2000).
205. Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U. M. & Murphy, L. J. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* **275**, 18574–18580 (2000).
206. Kurisaki, T. *et al.* Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 55–61 (2003).
207. Asakura, M. *et al.* Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* **8**, 35–40 (2002).
208. Horiuchi, K. *et al.* Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* **18**, 176–188 (2007).
209. Ito, N. *et al.* ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 1008–1013 (2004).
210. Dyczynska, E. *et al.* Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases. *J. Biol. Chem.* **282**, 436–444 (2007).
211. Roy, R., Wewer, U. M., Zurakowski, D., Pories, S. E. & Moses, M. A. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J. Biol. Chem.* **279**, 51323–51330 (2004).
212. Eto, K. *et al.* RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* **275**, 34922–34930 (2000).
213. Eto, K. *et al.* Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 17804–17810 (2002).
214. Zhao, Z. *et al.* Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin alpha7beta1. *Exp. Cell Res.* **298**, 28–37 (2004).

215. Huang, J., Bridges, L. C. & White, J. M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4982–4991 (2005).
216. Thodeti, C. K. *et al.* Hierarchy of ADAM12 binding to integrins in tumor cells. *Exp. Cell Res.* **309**, 438–450 (2005).
217. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F. & Wewer, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am. J. Pathol.* **154**, 1489–1501 (1999).
218. Iba, K. *et al.* The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J. Cell Biol.* **149**, 1143–1156 (2000).
219. Wiesner, S., Legate, K. R. & Fässler, R. Integrin-actin interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1081–1099 (2005).
220. Kawaguchi, N. *et al.* ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function. *J. Cell. Sci.* **116**, 3893–3904 (2003).
221. Galliano, M. F. *et al.* Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha -actinin-2, is required for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* **275**, 13933–13939 (2000).
222. Cao, Y., Kang, Q. & Zolkiewska, A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with alpha-actinin-1. *Biochem. J.* **357**, 353–361 (2001).
223. Zahnow, C. A. ErbB receptors and their ligands in the breast. *Expert Rev Mol Med* **8**, 1–21 (2006).
224. Kang, Q., Cao, Y. & Zolkiewska, A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem. J.* **352 Pt 3**, 883–892 (2000).
225. Suzuki, A. *et al.* Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene* **19**, 5842–5850 (2000).
226. Kang, Q., Cao, Y. & Zolkiewska, A. Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85alpha activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 24466–24472 (2001).
227. Harris, H. A., Murrills, R. J. & Komm, B. S. Expression of meltrin-alpha mRNA is not restricted to fusagenic cells. *J. Cell. Biochem.* **67**, 136–142 (1997).
228. Verrier, S., Hogan, A., McKie, N. & Horton, M. ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. *Bone* **35**, 34–46 (2004).
229. Gilpin, B. J. *et al.* A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 157–166 (1998).
230. Inoue, D. *et al.* Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 4180–4187 (1998).
231. Kveiborg, M. *et al.* ADAM12-S stimulates bone growth in transgenic mice by modulating chondrocyte proliferation and maturation. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1288–1296 (2006).
232. Bernstein, H.-G. *et al.* ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 12 is expressed in rat and human brain and localized to oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **75**, 353–360 (2004).
233. Le Pabic, H. *et al.* ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology* **37**, 1056–1066 (2003).

234. Le Pabic, H. *et al.* Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* **43**, 1038–1044 (2005).
235. Solomon, E., Li, H., Muggy, S. D., Syta, E. & Zolkiewska, A. The role of SnoN in transforming growth factor beta1-induced expression of metalloprotease-disintegrin ADAM12. *J. Biol. Chem.* **285**, 21969–21977 (2010).
236. Luna, C., Li, G., Qiu, J., Epstein, D. L. & Gonzalez, P. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol. Vis.* **15**, 2488–2497 (2009).
237. Li, H., Solomon, E., Duhachek Muggy, S., Sun, D. & Zolkiewska, A. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29. *J. Biol. Chem.* **286**, 21500–21510 (2011).
238. Kronqvist, P. *et al.* ADAM12 alleviates the skeletal muscle pathology in mdx dystrophic mice. *Am. J. Pathol.* **161**, 1535–1540 (2002).
239. Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K. & Sehara-Fujisawa, A. Role of meltrin {alpha} (ADAM12) in obesity induced by high-fat diet. *Endocrinology* **146**, 1752–1763 (2005).
240. Laigaard, J. *et al.* ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* **23**, 1086–1091 (2003).
241. Laigaard, J., Cuckle, H., Wewer, U. M. & Christiansen, M. Maternal serum ADAM12 levels in Down and Edwards' syndrome pregnancies at 9-12 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.* **26**, 689–691 (2006).
242. Valinen, Y. *et al.* Adding ADAM12 in risk calculation program does not improve the detection rate of trisomies 18 and 13 in first trimester screening. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **25**, 822–825 (2012).
243. Laigaard, J. *et al.* Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* **106**, 144–149 (2005).
244. El-Sherbiny, W., Nasr, A. & Soliman, A. Metalloprotease (ADAM12-S) as a Predictor of Preeclampsia: Correlation with Severity, Maternal Complications, Fetal Outcome, and Doppler Parameters. *Hypertension in pregnancy: official journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (2012).doi:10.3109/10641955.2012.690059
245. Boissy, P. *et al.* An assessment of ADAMs in bone cells: absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bones. *FEBS Lett.* **553**, 257–261 (2003).
246. Bartholin, L. *et al.* FLRG, a new ADAM12-associated protein, modulates osteoclast differentiation. *Biol. Cell* **97**, 577–588 (2005).
247. Abe, E., Mocharla, H., Yamate, T., Taguchi, Y. & Manolagas, S. C. Meltrin-alpha, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif. Tissue Int.* **64**, 508–515 (1999).
248. Rao, V. H. *et al.* A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion. *Oncogene* **31**, 2888–2898 (2012).
249. Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Roessner, A. & Röcken, C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **26**, 17–24 (2005).
250. Lendeckel, U. *et al.* Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **131**, 41–48 (2005).

251. Kodama, T. *et al.* ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.* **165**, 1743–1753 (2004).
252. Kveiborg, M. *et al.* A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res.* **65**, 4754–4761 (2005).
253. Peduto, L. *et al.* ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene* **25**, 5462–5466 (2006).
254. Fröhlich, C. *et al.* ADAM12 Produced by Tumor Cells Rather than Stromal Cells Accelerates Breast Tumor Progression. *Mol Cancer Res* **9**, 1449–1461 (2011).
255. Fröhlich, C. *et al.* Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 7359–7368 (2006).
256. Narita, D., Seclaman, E., Ursoniu, S. & Anghel, A. Increased expression of ADAM12 and ADAM17 genes in laser-capture microdissected breast cancers and correlations with clinical and pathological characteristics. *Acta Histochem.* **114**, 131–139 (2012).
257. Rocks, N. *et al.* Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC). *Br. J. Cancer* **94**, 724–730 (2006).
258. Kornberg, L. J. *et al.* Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope* **115**, 690–698 (2005).
259. Tian, B. L. *et al.* The expression of ADAM12 (meltrin alpha) in human giant cell tumours of bone. *MP, Mol. Pathol.* **55**, 394–397 (2002).
260. Baren, J. P. *et al.* mRNA profiling of the cancer degradome in oesophago-gastric adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **107**, 143–149 (2012).
261. Shiiba, M. Upregulated expression of ADAM12 is associated with progression of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* (2012).doi:10.3892/ijo.2012.1339
262. Khanna, C. *et al.* An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin. Exp. Metastasis* **18**, 261–271 (2000).
263. Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326–330 (2004).
264. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550–553 (2002).
265. Qin, X.-F., An, D. S., Chen, I. S. Y. & Baltimore, D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 183–188 (2003).
266. Ainola, M. *et al.* Involvement of a disintegrin and a metalloproteinase 8 (ADAM8) in osteoclastogenesis and pathological bone destruction. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 427–434 (2009).
267. Ishizuka, H. *et al.* ADAM8 enhances osteoclast precursor fusion and osteoclast formation in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 169–181 (2011).
268. Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0010 (2005).
269. Mioh, H. & Chen, J. K. Differential inhibitory effects of TGF-beta on EGF-, PDGF-, and HBGF-1-stimulated MG63 human osteosarcoma cell growth: possible involvement of growth factor interactions at the receptor and postreceptor levels. *J. Cell. Physiol.* **139**, 509–516 (1989).
270. Kveiborg, M., Albrechtsen, R., Couchman, J. R. & Wewer, U. M. Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1685–1702 (2008).

271. Loza, J., Carpio, L., Lawless, G., Marzec, N. & Dziak, R. Role of extracellular calcium influx in EGF-induced osteoblastic cell proliferation. *Bone* **16**, 341S–347S (1995).
272. Chien, H. H., Lin, W. L. & Cho, M. I. Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. *Calcif. Tissue Int.* **67**, 141–150 (2000).
273. Sibia, M. *et al.* Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development* **130**, 4515–4525 (2003).
274. Chan, S. Y. & Wong, R. W. Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J. Biol. Chem.* **275**, 38693–38698 (2000).
275. Raisz, L. G., Simmons, H. A., Sandberg, A. L. & Canalis, E. Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor. *Endocrinology* **107**, 270–273 (1980).
276. Marie, P. J., Hott, M. & Perheentupa, J. Effects of epidermal growth factor on bone formation and resorption in vivo. *Am. J. Physiol.* **258**, E275–281 (1990).
277. Zhu, J. *et al.* EGF-like ligands stimulate osteoclastogenesis by regulating expression of osteoclast regulatory factors by osteoblasts: implications for osteolytic bone metastases. *J. Biol. Chem.* **282**, 26656–26664 (2007).
278. Normanno, N. *et al.* Gefitinib inhibits the ability of human bone marrow stromal cells to induce osteoclast differentiation: implications for the pathogenesis and treatment of bone metastasis. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 471–482 (2005).
279. Schneider, M. R., Sibia, M. & Erben, R. G. The EGFR network in bone biology and pathology. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 517–524 (2009).
280. Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. & Sporn, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 7155–7160 (1983).
281. Roberts, A. B. TGF- β signaling from receptors to the nucleus. *Microbes and Infection* **1**, 1265–1273 (1999).
282. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* **26**, 743–774 (2005).
283. Shi, W. *et al.* GADD34–PP1c Recruited by Smad7 Dephosphorylates TGF β Type I Receptor. *J Cell Biol* **164**, 291–300 (2004).
284. Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Ye, J. Q. & Derynck, R. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1903–1918 (1998).
285. Oka, K. *et al.* The role of TGF-beta signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development. *Dev. Biol.* **303**, 391–404 (2007).
286. Tang, Y. *et al.* TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat. Med.* **15**, 757–765 (2009).
287. Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* **26**, 743–774 (2005).
288. Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G. & Derynck, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**, 2254–2272 (2001).
289. Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T. & Miyazono, K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* **23**, 552–563 (2004).
290. Takai, H. *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 27091–27096 (1998).

291. Murakami, T. *et al.* Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 747–752 (1998).
292. Quinn, J. M. *et al.* Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1787–1794 (2001).
293. Sells Galvin, R. J., Gatlin, C. L., Horn, J. W. & Fuson, T. R. TGF-beta enhances osteoclast differentiation in hematopoietic cell cultures stimulated with RANKL and M-CSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 233–239 (1999).
294. Geiser, A. G. *et al.* Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene. *Bone* **23**, 87–93 (1998).
295. Atti, E. *et al.* Effects of transforming growth factor-beta deficiency on bone development: a Fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone* **31**, 675–684 (2002).
296. Borton, A. J., Frederick, J. P., Datto, M. B., Wang, X. F. & Weinstein, R. S. The loss of Smad3 results in a lower rate of bone formation and osteopenia through dysregulation of osteoblast differentiation and apoptosis. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1754–1764 (2001).
297. Filvaroff, E. *et al.* Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* **126**, 4267–4279 (1999).
298. Qiu, T. *et al.* TGF-beta type II receptor phosphorylates PTH receptor to integrate bone remodelling signalling. *Nat. Cell Biol.* **12**, 224–234 (2010).
299. Mohammad, K. S. *et al.* Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS ONE* **4**, e5275 (2009).
300. Ikushima, H. & Miyazono, K. TGFβ signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* **10**, 415–424 (2010).
301. Massagué, J. TGFβ in Cancer. *Cell* **134**, 215–230 (2008).
302. Siegel, P. M. & Massagué, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 807–821 (2003).
303. Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117–129 (2001).
304. Grady, W. M. *et al.* Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* **59**, 320–324 (1999).
305. Izumoto, S. *et al.* Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas. *Cancer Lett.* **112**, 251–256 (1997).
306. Wang, D. *et al.* Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res.* **60**, 4507–4512 (2000).
307. Goggins, M. *et al.* Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* **58**, 5329–5332 (1998).
308. Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. & Reiss, M. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **58**, 4805–4810 (1998).
309. Padua, D. & Massagué, J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89–102 (2009).
310. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172 (2009).
311. Hagedorn, H. G., Bachmeier, B. E. & Nerlich, A. G. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int. J. Oncol.* **18**, 669–681 (2001).

312. Pertovaara, L. *et al.* Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 6271–6274 (1994).
313. Brabletz, T. *et al.* Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1155–1162 (1993).
314. Sillett, H. K., Cruickshank, S. M., Southgate, J. & Trejdosiewicz, L. K. Transforming growth factor-beta promotes ‘death by neglect’ in post-activated human T cells. *Immunology* **102**, 310–316 (2001).
315. Gorelik, L. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 46–53 (2002).
316. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
317. Yin, J. J. *et al.* TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* **103**, 197–206 (1999).
318. Guise, T. A. *et al.* Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1544–1549 (1996).
319. Kloen, P., Jennings, C. L., Gebhardt, M. C., Springfield, D. S. & Mankin, H. J. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors, TGF-beta 1 and TGF-beta 2 production and autocrine growth control in osteosarcoma cells. *Int. J. Cancer* **58**, 440–445 (1994).
320. Matsuyama, S. *et al.* SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* **63**, 7791–7798 (2003).
321. Mohseny, A. B. *et al.* The activities of Smad and Gli mediated signalling pathways in high-grade conventional osteosarcoma. *Eur. J. Cancer* (2012).doi:10.1016/j.ejca.2012.06.018
322. Meulmeester, E. & Ten Dijke, P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.* **223**, 205–218 (2011).
323. Atfi, A. *et al.* The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. *J. Cell Biol.* **178**, 201–208 (2007).
324. Massagué, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295–309 (2000).
325. Wenner, C. E. & Yan, S. Biphasic role of TGF-beta1 in signal transduction and crosstalk. *J. Cell. Physiol.* **196**, 42–50 (2003).
326. Pardali, K. *et al.* Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **275**, 29244–29256 (2000).
327. Datto, M. B. *et al.* Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5545–5549 (1995).
328. Hannon, G. J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257–261 (1994).
329. Wiercinska, E. *et al.* The TGF- β /Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 657–666 (2011).
330. Meulmeester, E. & Ten Dijke, P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.* **223**, 205–218 (2011).

331. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. & Ford, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 117–134 (2010).
332. Spearman, M., Taylor, W. R., Greenberg, A. H. & Wright, J. A. Antisense oligodeoxyribonucleotide inhibition of TGF-beta 1 gene expression and alterations in the growth and malignant properties of mouse fibrosarcoma cells. *Gene* **149**, 25–29 (1994).
333. Wu, R. S. *et al.* Comparative analysis of IFN-gamma B7.1 and antisense TGF-beta gene transfer on the tumorigenicity of a poorly immunogenic metastatic mammary carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 229–240 (2001).
334. Juárez, P. & Guise, T. A. TGF- β in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases. *Bone* **48**, 23–29 (2011).
335. Casimiro, S., Guise, T. A. & Chirgwin, J. The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. *Molecular and Cellular Endocrinology* **310**, 71–81 (2009).
336. Wildeboer, D., Naus, S., Amy Sang, Q.-X., Bartsch, J. W. & Pagenstecher, A. Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 516–527 (2006).
337. He, S. *et al.* Overexpression of a disintegrin and metalloprotease 8 in human gliomas is implicated in tumor progression and prognosis. *Med. Oncol.* (2011).doi:10.1007/s12032-011-0084-9
338. Li, Z. *et al.* Upregulation of a disintegrin and metalloprotease 8 influences tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma. *Pathol. Oncol. Res.* **18**, 657–661 (2012).
339. Choi, S. J., Han, J. H. & Roodman, G. D. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 814–822 (2001).
340. Hou, P. *et al.* Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer* **106**, 1602–1609 (2006).

ANNEXES

Liste des publications

Articles originaux soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture

Georges S., Chesneau J, Hervouet S, Taurelle J, Redini F, Padrines M, Heymann D, Fortun Y, Verrecchia F. "ADAM12 produced by tumor cells accelerates osteosarcoma tumor progression and associated osteolysis." *Soumis pour publication*

Reuves acceptées dans des journaux internationaux à comité de lecture

Georges S., Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. "Proteases and bone remodelling" (2009) *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(1):29-41.

Georges S., Heymann D, Padrines M. "Modulatory effects of proteoglycans on proteinase activities" (2012) *Methods Mol Biol.* 836:307-22