

Thèse de Doctorat

Louis-Romée LE NAIL

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Cancérologie

Unité de recherche :

Laboratoire PhyOs
INSERM UMR1238
Sarcomes osseux et remodelage
des tissus calcifiés

Soutenance le 27 octobre 2017

CARACTERISATION DE CELLULES DERIVEES D'OSTEOSARCOMES HUMAINS

JURY

Présidente du Jury :	Madame Fatima MECHTA-GRIGORIOU , Directeur de Recherche INSERM, Institut Curie, Paris
Rapporteurs :	Madame Corinne BOUVIER , Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille Monsieur Frédéric DESCHASEAUX , Maître de Recherche, EFS Pyrénées-Méditerranée, CHU de Toulouse
Examineurs :	Monsieur Philippe ROSSET , Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU de Tours Madame Fatima MECHTA-GRIGORIOU , Directeur de Recherche INSERM, Institut Curie, Paris
Directeur de Thèse :	Madame Valérie TRICHET , Maître de Conférences des Universités, Faculté de Médecine de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Monsieur Gonzague DE PINIEUX , Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU de Tours



Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire
PHY-OS, INSERM UMR 1238,
Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés,
Faculté de Médecine de Nantes.



Un soutien financier a été apporté par la Société Française de Chirurgie Orthopédique et
Traumatologique ainsi que par l'association Guillaume Perrot et InfoSarcomes.



Remerciements

A Madame Valérie Trichet. Merci de m'avoir beaucoup aidé pour ce travail, encadré, suivi, (sup)porté... Merci pour ta rigueur, ta patience, ta confiance et d'y avoir toujours cru. Je t'ai donné du souci... que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur le Professeur Gonzague de Pinieux. Merci de m'avoir co-encadré pour cette thèse. Merci pour votre aide, pour votre gentillesse, pour le partage de vos immenses connaissances anatomopathologiques. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Philippe Rosset. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci pour votre confiance, votre soutien, votre aide. J'espère un jour être digne de tout cela ainsi que de tous vos enseignements tant chirurgicaux qu'humains. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Frédéric Deschaseaux. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail et d'être venu de si loin pour cela. Tu es à l'origine de ce projet, il y a quelques années maintenant. Le temps est passé, le projet a cheminé... Que ce travail soit le témoignage de mon amitié et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Corinne Bouvier. Merci d'avoir accepté de juger ce travail, merci d'être venue de si loin également.

A Madame Fatima Mechta-Grigoriou. Merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'être venue à Nantes.

A Madame Françoise Rédini. Merci de m'accueillir dans le Laboratoire, merci pour ta gentillesse.


A Monsieur le Professeur Olivier Hérault. Merci pour toutes les analyses des PAO, pour votre confiance.

A Madame Claire Pecqueur. Merci pour toutes les analyses SeaHorse, merci pour vos explications et pour votre aide.

A Monsieur Frédéric Chibon et Monsieur Tom Lesluyes. Merci pour les analyses RNAseq, merci pour vos explications et pour la découverte de ce monde complexe.

A Monsieur le Docteur Philippe Piloquet, Monsieur le Professeur Le Caignec et Monsieur Olivier Pichon. Merci pour les analyses cytogénétiques.

A Monsieur le Professeur François Guoin et à Monsieur François Valette. Merci d'avoir été membres de mon comité de Thèse.



A Pierre Avril. Merci infiniment pour ton aide et pour tous ces bons moments passés ensemble,

A Sarah pour toute l'aide que tu m'as apporté et pour ta bonne humeur,

A Régis, merci pour ton aide, pour tes blagues évidemment... Kévin, Luciano, Romain, Audrey, Bénédicte, Meadhbh, David, Céline, Séverine, Rachel, Jérôme, Guylène, Thibault, ... merci pour votre aide précieuse, pour votre aide pour les cultures, les manip...

A tous les membres du Labo qui m'ont toujours bien accueilli malgré une présence... pas toujours régulière du fait des contraintes géographiques...

A Laurent, merci pour ta générosité, ta gentillesse, pour votre accueil avec Valérie.


A Julien Berhouet, pour l'initiation de ce travail, Alain et Nathalie Langonné, Christelle Debeissat, Elfi Ducrocq, Sophie Amard,

A tous les membres du Service d'Orthopédie du CHU de Tours,

A tous les membres du service d'Anapath à Trousseau, pour leur aide notamment pour les prélèvements de l'étude,

A tous les Collègues et Amis du CHU et en dehors du CHU,

A tous ceux qui m'ont aidé pour ce travail,



Aux malades et à leurs proches,

A tous ceux qui m'aiment et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui :

à Olga,

à Maman,

à Gabrielle et Côme



**CARACTERISATION DE CELLULES
DERIVEES
D'OSTEOSARCOMES HUMAINS**



Liste des abréviations

αMEM	Minimum Eagle Medium alpha
ASMA	Alpha Smooth Muscle Actine
bFGF	Fibroblast growth factor b
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CDOS	cellule dérivée d'ostéosarcome
CD	Cluster differentiation
CFU-F	colony forming unit – fibroblastique
CGH array	comparative genomic hybridization array
CSC	cellule souche cancéreuse
CSM	cellule souche mésenchymateuse
CSMMO	cellule souche mésenchymateuse dérivée de moelle osseuse d'un patient porteur d'un ostéosarcome
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phénylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
EGF	Epidermal Growth Factor
IL	Interleukine
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITS	Insuline-Transferrine-Sélénite de sodium
MSC	mesenchymal stem cell
OS	ostéosarcome
OSDC	Osteosarcoma derived cell
PAO	Profil Anti Oxydant
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
RNaseq	Séquençage aléatoire du transcriptome entier
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	transcription inverse, réaction en chaîne de la polymérase en temps réel
SVF	Sérum de veau fœtal
TIC	Tumor Initiating Cell

Table des matières

INTRODUCTION

PARTIE I : LA CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE	11
1. Généralités	11
2. Origine des CSM à l'âge adulte et pouvoir ostéogénique	13
3. Isolement-Characterisation	13
4. Rôle des CSM.....	14
4.1. Formation et réparation du squelette.....	14
4.2. Autres rôles	20
4.3. Cas particulier : implication dans le soutien de la croissance tumorale.....	22
5. Conclusion	26
PARTIE II : L'OSTEOSARCOMES	27
1. Généralités	27
1.1 Définition	27
1.2 Epidémiologie.....	28
2. Différents sous types	29
2.1 Ostéosarcomes de haut grade de malignité.....	29
2.2 De grade intermédiaire	37
2.3 De bas grade de malignité	38
2.4 Synthèse.....	39
3. Prise en charge et pronostic des ostéosarcomes de haut grade	39
3.1 Prise en charge.....	39
3.2 Chimiothérapie.	40
3.3 Analyse histologique	40
3.4 Pronostic.....	41
4. Prise en charge et pronostic des ostéosarcomes conventionnels de grade intermédiaire et de bas grade.....	42
5. Facteurs prédisposants.....	42
6. Eléments et marqueurs pronostiques	43
7. Origine de l'ostéosarcome	44
8. Modélisation de l'ostéosarcome	45
8.1 Modélisation de la tumorigenèse	45
8.2 Modélisation de la tumeur	47
9. Conclusion	49
PARTIE III : CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	50
1. Définition.....	50
1.1 Définition théorique	50
1.2 Définition pratique.....	51
2. Différents modèles	51
2.1 Le modèle hiérarchique	51
2.2 Le modèle stochastique.....	52
2.3 Synthèse.....	53
3. Techniques d'isolement de CSC dans l'OS.....	54
3.1 Marqueurs de surface	54
3.2 Isolement par une fonction de la cellule.....	56
3.3 Techniques de culture.....	57
3.4 Aspect morphologique.....	58
3.5 Adhérence au plastique.....	60

4. Synthèse – Implications	60
----------------------------------	----

PROBLEMATIQUES.....62

MATERIEL ET METHODE

1. Matériel d'étude	63
1.1 Cellules dérivées d'ostéosarcomes et cellules dérivées de moelle osseuse	63
1.2 Lignées d'ostéosarcome humain (MNNG-HOS)	67
1.3 Modèles animaux murins	68
2. Cultures cellulaires	70
2.1 Standard.....	70
2.2 Milieux de différenciation	71
2.3 Cultures tri dimensionnelles.....	74
3. Sénescence	75
4. Cytométrie en flux	75
5. Analyses statistiques	76
6. Milieux conditionnés et dosage des cytokines.....	76
7. Transcription inverse et Polymerase Chain Reaction quantitative (RT-qPCR)	77
7.1. Extraction d'ARN.....	77
7.2. Rétrotranscription de l'ARN.....	77
7.3. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR).....	78
8. RNA sequencing.....	79
9. Cytogénétique	80
9.1. Caryotypes	80
9.2. Comparative Genomic Hybridization (CGH).....	80
10. Métabolisme	80
10.1. SeaHorse®.....	80
10.2. Analyse du potentiel d'oxydoréduction.....	81

RESULTATS

PARTIE I : LES CELLULES DERIVEES D'OSTEOSARCOME SERAIENT DES CELLULES STROMALES..... 82

1. Les cellules dérivées d'ostéosarcome présentent des caractéristiques de CSM	82
1.1 Culture en conditions standard	82
1.2 Potentiel de différenciation	85
1.3 Analyse de l'état de différenciation des CDOS à l'état basal	88
2. Les CDOS ne présentent pas de critère de cellule cancéreuse.....	90
2.1. Analyse des caryotypes	90
2.2. Analyse de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur	91
2.3. Analyse de l'expression de gènes « souches »	92
2.4. Analyse de la formation de tumeur in vivo.....	94
3. Cellules dérivées d'ostéosarcome et fonction de soutien tumoral	95
3.1 Analyse de l'influence sur la croissance tumorale.....	95
3.2 Analyse de l'influence sur la survenue de métastases pulmonaires.....	97
3.3 Analyse de l'organisation tumorale dans les modèles de co-injection	99
3.4 Recherche de cytokines.....	101
3.5 Expression de marqueurs de cellules stromales associées à la tumeur	102
4. Conclusion du chapitre	105

PARTIE II : LES CELLULES DERIVEES D'OSTEOSARCOMES SERAIENT DES CELLULES STROMALES AVEC CERTAINES CARACTERISTIQUES DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	106
1. Analyse des capacités de croissance cellulaire.....	106
1.1 Cultures en condition d'adhérence cellulaire	106
1.2 Conditions de culture sans adhérence cellulaire	107
2. Les cellules dérivées d'ostéosarcome exprimeraient des marqueurs de cellules cancéreuses.....	108
3. Analyses cytogénétiques	109
3.1. 1 ^{er} cas : CDOS DIA.....	109
3.2. 2 ^{ème} cas : CDOS SAG	114
4. Recherche d'anomalies du métabolisme	115
4.1. Métabolisme mitochondrial	115
4.2. L'analyse du profil métabolique objective des différences entre CSMMO et CDOS...117	
5. Etude de la filiation par analyse du transcriptome.....	121
5.1. Similitudes et différences	121
5.2. Synthèse.....	124
6. Analyse des grandes fonctions	125
6.1. Analyse de « nœuds » privilégiés dans les CDOS.....	125
6.2. Analyses de « nœuds » éteints dans les CDOS	127
6.3. Synthèse.....	128
7. Conclusion du chapitre	129

DISCUSSION

1. Cellules dérivées d'ostéosarcome : cellules de soutien de la croissance tumorale	130
2. Des CSM avec des caractéristiques de CSC seraient à l'origine des OS de haut grade	135
3. Critiques de l'étude	141

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion.....	143
2. Perspectives	144

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....146

ANNEXES.....	157
ANNEXE 1.....	158
ANNEXE 5.....	187

INTRODUCTION

PARTIE I :

LA CELLULE SOUCHE MESENCHYMATEUSE

1. Généralités

La Cellule Souche Mésoenchymateuse (CSM) est souche, d'une part, donc capable d'auto renouvellement et capable de divisions asymétriques et stromale d'autre part. Par ces dernières, elle est également capable de se différencier dans les différents lignages ostéoblastiques, chondrocytaires et adipocytaires (1)(2) (Figure 1), mais aussi dans les différents autres tissus mésoenchymateux comme le tissu musculaire ou tendineux par exemple (3).

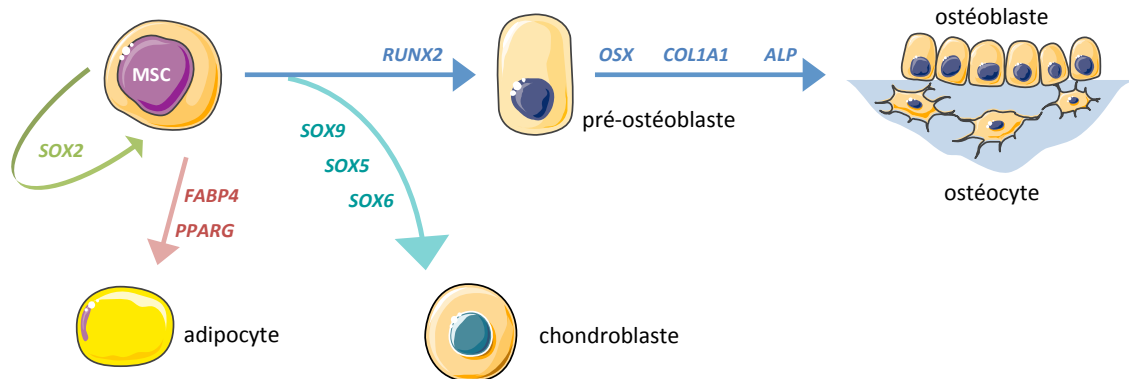



Figure 1 : arbre de différenciation de la Cellule Souche Mésoenchymateuse (CSM). La CSM est capable d'autorenouvellement d'une part en conservant son caractère indifférencié via l'expression du gène *SOX2* (SRY-related HMG-box gene). Elle peut s'engager dans la voie adipocytaire avec l'expression des gènes *FAB4* (Fatty Acid Binding Protein 4) et *PPAR gamma* (Peroxyzome Proliferator Activated Receptor Gamma). Elle peut également s'engager dans la voie chondrocytaire avec l'expression des gènes *SOX9-5-6*. Pour la voie ostéoblastique, l'engagement débute avec l'expression de *RUNX2* (Runt Related Transcription Factor), puis *OSX* (Osterix), *COL1A1* (collagène de type 1a1) et *ALP* (Phosphatase Alcaline). Adapté de Xiao et al., 2013 (2).



D'un point de vue embryologique, la CSM dérive du feuillet mésodermique (4). Celui-ci, ainsi que les feuillets endodermique et ectodermique, est individualisé au cours de la gastrulation qui survient pendant la 3^{ème} semaine après la fécondation. Le mésoderme va ensuite pénétrer toute l'étendue du disque embryonnaire. Puis différents territoires s'identifient :

- la notochorde, dont il ne restera à terme que le nucléus pulposus dans les disques inter vertébraux.
- le mésoderme latéroventral qui est à l'origine, entres autres, des paires de somites qui formeront l'appareil locomoteur (squelette, muscles, derme, hypoderme et vaisseaux)
- le mésoderme extraembryonnaire qui entoure la cavité amniotique et la vésicule vitelline.

La CSM est connue depuis le XIX^e siècle mais a été authentifiée et caractérisée initialement par Friedenstein en 1976 (5). Il s'agissait de cellules adhérentes au plastique qui portaient initialement le nom de colony forming unit–fibroblast (CFU-F) puis le terme de cellule souche mésenchymateuse (6). L'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a toutefois apporté une nuance à la définition de la CSM : le terme de « Cellules Souches Mésenchymateuses » doit être réservé aux cellules d'origine mésenchymateuse pour lesquelles les preuves de leur multipotence ont été retrouvées sur le plan biologique ou thérapeutique (7,8). Si tel n'était pas le cas, le terme de « cellules multipotentes stromales mésenchymateuses » serait plus approprié pour les cellules adhérentes au plastique. Dans le cadre de notre travail, nous avons fait le choix de parler de CSM en tant que cellule stromale souche multipotente et non pluripotente. La CSM pluripotente correspondrait plus à la CSM présente dans le tissu embryonnaire.

2. Origine des CSM à l'âge adulte et pouvoir ostéogénique

De manière générale, la division dans l'arbre de différenciation mésenchymateux entre l'axe musculaire et l'axe ostéo-chondro-adipocytaire se ferait à un stade très précoce de l'embryogenèse, c'est à dire, avant la formation des somites (9). Bien que des CSM aient été identifiées dans différents tissus (moelle osseuse, tissu adipeux, sang de cordon ombilical, placenta, peau, muscle...) (3)(10), elles n'auraient pas exactement les mêmes capacités ostéogéniques en fonction de leur origine (11)(12). Il semblerait que les CSM ayant le pouvoir ostéogénique le plus fort seraient celles de la moelle osseuse et du périoste en comparaison aux CSM dérivées de tissu adipeux, de muscle ou de cordon ombilical. Ainsi, les CSM seraient prédisposées pour former les cellules du tissu dont elles dérivent (13).

3. Isolement-Caractérisation

A partir de la moelle osseuse, l'isolement des CSM se fait grâce à leur capacité d'adhérence au plastique. La moelle totale est mise en culture et les CSM adhèrent à la flasque plastique. Elles représentent environ 0,001 à 0,01% des cellules de la moelle (1). Elles sont aussi obtenues à partir du tissu adipeux, suite à un prélèvement de graisse, comme une lipoaspiration, puis une mise en culture avec élimination progressive des cellules non adhérentes (14)(15).

En 2006, l'ISCT a défini des critères minimaux *in vitro* pour définir la CSM (8) (Tableau 1):

- adhérence au plastique en culture en conditions standard (37°C, 95% air, 5% CO₂).
- expression spécifique d'antigènes de surface : expression de CD73, CD90, CD105, associé à une absence d'expression de CD45, CD34, CD14 ou absence d'expression de CD11b, CD79 α ou absence d'expression CD19, HLA-DR. Il existe toutefois une nuance à apporter : comme nous l'avons dit précédemment, les CSM n'auraient pas

exactement les mêmes capacités de différenciation en fonction de leur tissu d'origine. Il en est de même pour le profil d'expression qui dépend de l'origine tissulaire (16).

- potentiel de différenciation multipotent (ostéoblastique, chondroblastique et adipocytaire) testé *in vitro* en conditions de différenciation.

Tableau 1 : résumé des critères d'identification des CSM selon la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT). D'après Dominici *et al*(8).

Critères d'identification des CSM (<i>International Society for cellular therapy</i>)	
1. Adhérence au plastique en condition de culture standard	
2. Phénotype:	
Positives (>95% +)	Négatives (<2% +)
- CD105	- CD45
- CD73	- CD34
- CD90	- CD14 ou CD11b
	- CD79 α ou CD19
	- HLA-DR
3. Capacité de différenciation ostéoblastique, adipocytaire, chondrocytaire <i>in vitro</i> .	

4. Rôle des CSM

4.1. Formation et réparation du squelette

4.1.1 Ostéogenèse

A l'état embryonnaire, le feuillet mésenchymateux est à l'origine des différents tissus suivants (4):

- les tissus conjonctifs spécialisés, comme, par exemple: le squelette (os, cartilage), les tendons et ligaments, le tissu adipeux, les muscles (striés et lisses), le système cardiovasculaire et lymphatique, les cellules sanguines, les reins, les voies urinaires

hautes, l'appareil génital (gonades, voies génitales), le péricarde, la plèvre, le péritoine, la rate, les corticosurrénales, les cornées...

- les tissus conjonctifs lâches non spécialisés comme le derme et les tissus de soutien des différents organes.

En ce qui concerne la formation du squelette, au stade embryonnaire, il existe deux types de processus d'ossification: endoconjonctive et endochondrale. Le premier est à l'origine des os du massif facial, du crâne et d'une partie des clavicules et omoplates. Le second est à l'origine des os des membres, vertèbres, côtes, bassin.

Lors du processus **d'ossification endoconjonctive** les condensations de progéniteurs mésenchymateux se différencient directement en ostéoblastes sans jamais former de chondroblastes. En même temps que la vascularisation se développe, ces ostéoblastes vont produire une matrice ostéoïde riche en collagène de type I qui, progressivement, se minéralise et forme la pièce osseuse.

Lors du processus **d'ossification endochondrale**, tout débute également par la formation de condensations de cellules progénitrices mésenchymateuses qui se différencient en chondrocytes. Ces derniers produisent une matrice extra cellulaire riche en collagène de type II. Les chondrocytes centraux deviennent hypertrophiques et synthétisent le collagène de type X qui permet la minéralisation de l'ensemble de la matrice enchondrale. En périphérie de ces chondrocytes hypertrophiques, le mésenchyme périchondral se différencie en ostéoblastes à l'origine de la formation de l'os cortical. Ce processus s'apparente à l'ossification endo conjonctive. Cette ébauche de la pièce osseuse, ou noyau d'ossification primaire (future diaphyse et métaphyses), est perforée par un réseau vasculaire. Par ce réseau vasculaire, les différents éléments constitutifs de la moelle osseuse pourront pénétrer la pièce osseuse, notamment les précurseurs des monocytes qui formeront aussi les ostéoclastes. La matrice cartilagineuse calcifiée est ensuite résorbée par les ostéoclastes et remplacée par une matrice osseuse calcifiée formée par les ostéoblastes. Aux extrémités de la pièce osseuse apparaissent ensuite les noyaux d'ossification secondaires, qui forment les épiphyses. Entre l'épiphyse et la métaphyse se situe la **plaque de croissance** qui assure la croissance osseuse longitudinale. Elle est formée par plusieurs strates de chondrocytes : tout d'abord des chondrocytes plats puis des chondrocytes proliférant formant des colonnes longitudinales puis des chondrocytes hypertrophiques plus quiescents. Ces

derniers sécrètent entre autre du collagène de type X qui favorise la minéralisation de la matrice extra cellulaire cartilagineuse.

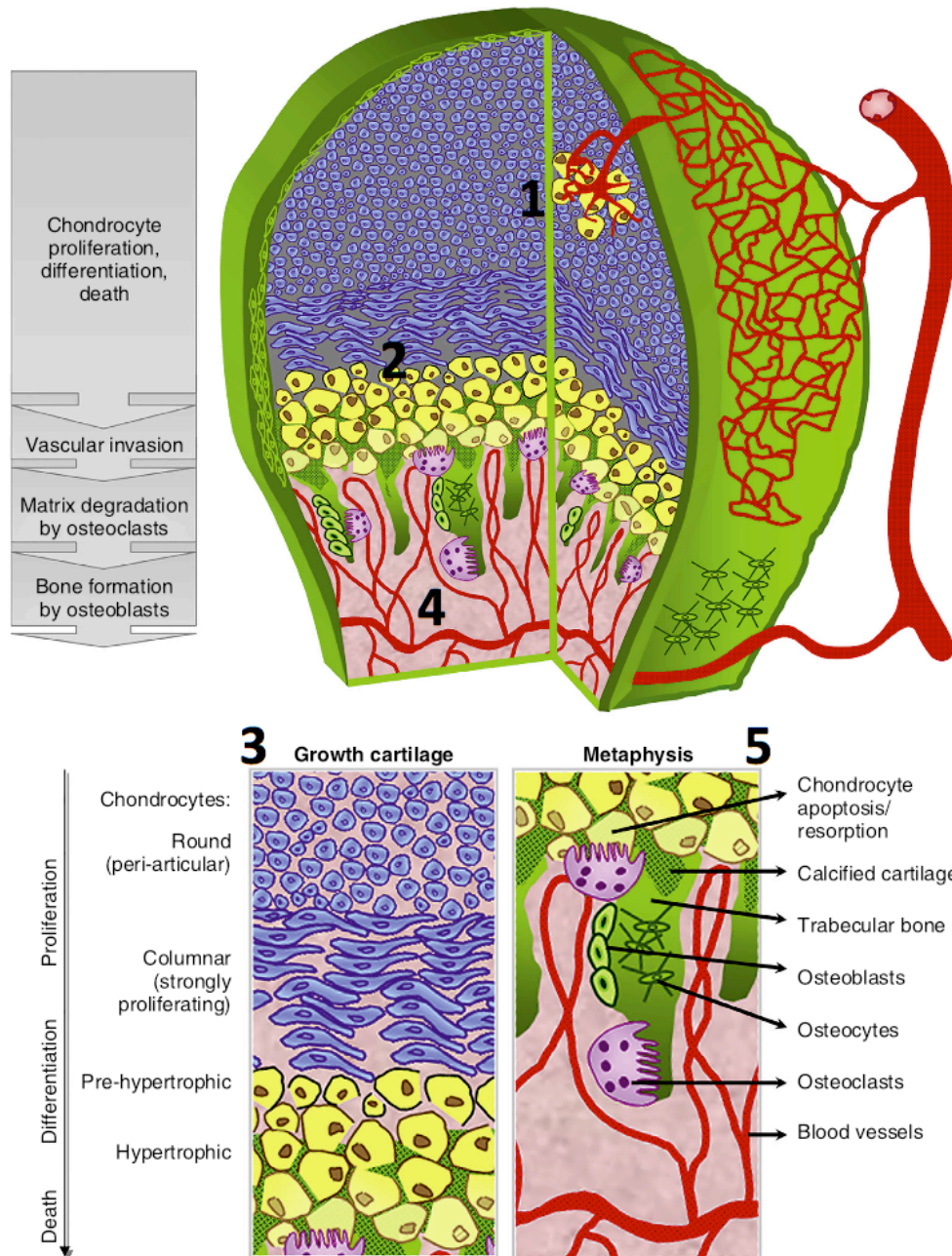


Figure 2 : vue schématique d'une extrémité d'un os long en cours de croissance. Le noyau d'ossification secondaire apparaît dans l'épiphyse (1). La plaque de croissance (2) est constituée de chondrocytes dont le détail est présenté en (3). La métaphyse apparaît ensuite (4), détaillée en (5). Tiré de Maes et Kronenberg, 2016 (17).

Enfin, au contact de la métaphyse, ces chondrocytes deviennent apoptotiques et la matrice cartilagineuse ossifiée est dégradée au profit d'une matrice osseuse (os

spongieux) formée par les ostéoblastes. Cette plaque de croissance se ferme à la fin de la croissance, pendant l'adolescence (Figure 2) (17,18).

4.1.2 Exemple de réparation : injection percutanée de moelle concentrée autologue après fracture ouverte de tibia.


En traumatologie osseuse, lorsque survient une fracture, il existe deux situations :

- soit le foyer de fracture présente un écart inter fragmentaire (diastasis) plus ou moins grand ce qui représente la majorité des cas. Un hématome périfracturaire est constitué. Rapidement, celui-ci devient un tissu de granulation fibro vasculaire qui devient ensuite un cal mou. Ce dernier correspond à un manchon souple du foyer de fracture. En sous périosté, les CSM se différencient en ostéoblastes à distance du foyer (comme durant le processus d'ossification endo conjonctive) et en chondroblastes au contact du foyer (comme au cours du processus d'ossification endochondrale). Une matrice cartilagineuse ossifiée est formée, qui correspond au cal dur, puis résorbée par les ostéoclastes et remplacée par une matrice osseuse calcifiée d'origine ostéoblastique.

- soit le foyer de fracture est réduit chirurgicalement et de manière anatomique, c'est à dire que l'anatomie est parfaitement restaurée. La consolidation osseuse se fait alors par la reprise de l'activité des unités multicellulaires de remodelage osseux, ou Bone Modelizing Unit. Il s'agit de petites unités qui forment une sorte de tête foreuse constituée d'ostéoclastes qui progressent dans l'os et qui sont suivies par des ostéoblastes qui assurent la reconstruction osseuse (19).

En traumatologie courante, certaines fractures présentent parfois des retards de consolidation et/ou une absence de consolidation. L'absence de consolidation 6 mois après la fracture avec une absence d'évolution favorable du foyer de fracture du 3^e au 6^e mois définit une pseudarthrose en France (20). Une intervention chirurgicale est donc nécessaire afin d'obtenir la consolidation osseuse.

Les retards de consolidation et pseudarthroses concernent préférentiellement les diaphyses des os longs avec une nette prédominance pour les fractures du tibia. Des facteurs de risques de pseudarthrose ont été identifiés comme le caractère ouvert de la



fracture par exemple. Le traitement standard des pseudarthroses consiste à ouvrir chirurgicalement le foyer, réaliser une décortication et apporter une autogreffe d'os spongieux autologue prélevé au dépend de la crête iliaque. Cependant, le prélèvement du greffon peut être à l'origine de complications infectieuses, de douleurs séquellaires et de cicatrice inesthétique. Ce prélèvement diminue également le stock osseux du patient, potentiellement nécessaire pour d'autres interventions ultérieures.

Ainsi, l'idée initiale de Paley en 1986 d'injecter des cellules ostéoinductrices prélevées par ponction de moelle osseuse sur le bassin, dans le foyer de fracture chez le lapin permettait de s'affranchir des complications en lien avec le prélèvement de la greffe tout en relançant le processus de consolidation (21). Connolly eu l'idée ensuite d'augmenter le taux de progéniteurs injectés dans le foyer de pseudarthrose en concentrant la moelle prélevée avant de la greffer (22). Hernigou *et al.* ont ensuite appliqué cette technique à l'Homme, avec un taux de consolidation de 88% à 12 semaines de l'injection (20)(23). En présence de facteurs de risque de pseudarthrose du tibia, une injection de moelle osseuse concentrée autologue ou IMOCA peut être proposée avant que ne survienne cette pseudarthrose, à titre préventif, comme l'a évoqué Connolly (24).

Nous avons analysé nos résultats du Service de Chirurgie Orthopédique du CHU de Tours avec une étude rétrospective de 43 cas d'IMOCA en traitement d'une pseudarthrose ou d'un retard de consolidation ou en prévention d'un retard de consolidation dans les suites d'une fracture ouverte du tibia opérée initialement dans le service (Figure 3).

Nous avons observé que les malades pour qui l'IMOCA avait permis la consolidation, avaient reçu significativement plus de CFU-F que ceux pour qui l'IMOCA n'avait pas permis la consolidation (469 vs 153.10³, p=0.013). Les IMOCA réalisées après 110 jours post fracture avaient plus de chance de succès (73%) que celles réalisées avant 110 jours (47%). Il n'y avait pas eu de complication en lien avec cette technique, qui s'avère être réalisable lors d'une hospitalisation courte, sans complication, sans amoindrir le stock osseux, et qui évite l'ouverture du foyer de pseudarthrose pouvant être à l'origine de complications infectieuses. De plus une intervention et hospitalisation pour IMOCA présente un coût inférieur à celui d'une intervention chirurgicale pour une autogreffe cortico-spongieuse.

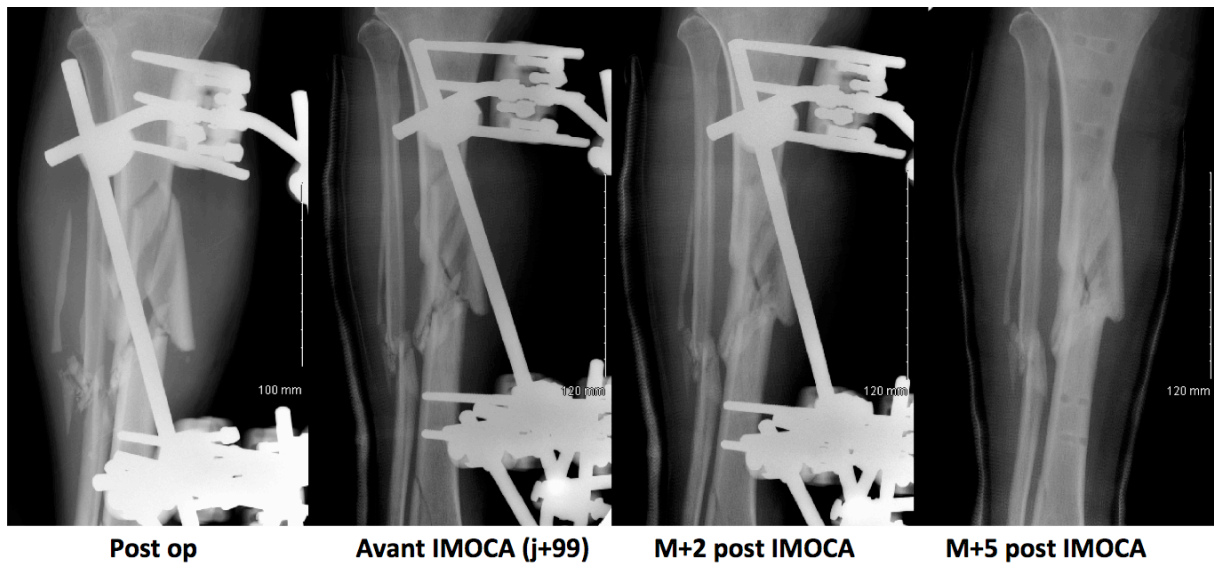


Figure 3 : exemple d'un homme de 55 ans victime d'une fracture ouverte de jambe dans les suites d'un accident de la voie publique. Réduction et ostéosynthèse en urgence par fixateur externe. A 99 jours post opératoire, pas de signe évident de consolidation traduisant un retard de consolidation. Réalisation d'une IMOCA. A 2 mois (M+2) après le geste, le contrôle radiographique montre une consolidation osseuse en cours, qui permettra l'ablation du matériel à 5 mois (M+5) post IMOCA lorsque la consolidation aura été complète.


Nous avons également pu mettre en évidence l'effet positif sur la consolidation osseuse des CFU-F (qui correspondent aux CSM) avec une corrélation positive entre le nombre de CFU-F greffées et le taux de consolidation.

Pour nous, cette technique doit faire partie de l'arsenal thérapeutique de la prise en charge des pseudarthroses des os longs avant de s'engager dans des procédures plus invasives (Figure 3).

L'article entier est présenté en annexe 1 (25).

4.1.3 Autres utilisations des CSM en chirurgie orthopédique réparatrice

Comme nous l'avons vu précédemment, les CSM peuvent être prélevées sur la crête iliaque puis réinjectées dans le foyer de pseudarthrose avec ou sans geste de concentration associé. Elles sont également utilisées dans les ostéonécroses aseptiques de tête fémorale. Il s'agit d'une pathologie souvent bilatérale, atteignant l'adulte entre 30



et 50 ans, dont la physiopathologie est mal connue et qui aboutit à l'effondrement de la tête fémorale, ce qui est à l'origine de douleurs et d'une impotence fonctionnelle. Le traitement est alors l'implantation d'une prothèse totale de hanche. Aussi, la recherche s'oriente vers un traitement qui viserait à régénérer les tissus osseux nécrosés, afin de conserver la sphéricité de la tête fémorale et lui restaurer une architecture osseuse vivante et solide permettant la marche en plein appui. Ainsi, certaines équipes proposent de réaliser un forage de la tête fémorale et d'implanter des CSM, associées ou non à un biomatériau. Toutefois, les CSM posent le problème de leur rareté dans la moelle osseuse. On estime leur présence à 0,01% des cellules mononuclées de la moelle osseuse. D'où l'idée de réaliser une expansion par culture *ex vivo* avant de les réinjecter au patient dans un site de pseudarthrose ou d'ostéonécrose.

Dans cette revue récente que nous présentons, nous récapitulons les différentes utilisations des CSM en chirurgie orthopédique réparatrice, CSM associées ou non à des structures tridimensionnelles synthétiques.


L'article entier est présenté en annexe 2 (26).

4.2. Autres rôles

4.2.1 Rôle physiologique dans la niche endostéale

L'hématopoïèse a lieu au sein de la moelle osseuse « rouge ». Chez l'enfant, la moelle osseuse de tous les os est concernée. Chez l'adulte, seule la moelle osseuse des os plats, des vertèbres et de la partie proximale des os longs proches des ceintures est concernée. Les autres secteurs médullaires intra osseux involuent et n'ont plus de fonction hématopoïétique. Ils sont colonisés par des adipocytes ; il s'agit de la moelle « jaune ».

Dans de la niche endostée « rouge », différents éléments sont présents, au sein d'un cadre constitué par une trame osseuse tridimensionnelle, qui correspond à l'os spongieux, tapissée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Les différentes « logettes » contiennent des petits capillaires bordés par des cellules endothéliales et des péricytes,



des précurseurs hématopoïétiques, des CSM (cellules souches stromales au sens adulte et non embryologique), des adipocytes, des macrophages, des neurones du système nerveux sympathique, le tout dans la matrice extra cellulaire.

Outre leur rôle dans l'ostéogenèse, les CSM ont également un rôle d'homéostasie de la niche endostée. En effet, les CSM contribuent au maintien du pool de précurseurs hématopoïétiques. Par ailleurs, la présence par adhésion des précurseurs hématopoïétiques devient possible via la matrice extra cellulaire synthétisée par les CSM. Enfin, les CSM interviennent au même titre que les autres éléments de la niche endostéale (par exemple les précurseurs hématopoïétiques, adipocytes, macrophages, ostéoblastes, ostéoclastes, péricytes) dans la régulation de l'hématopoïèse (27,28).

4.2.2 Rôle immunomodulateur

Les CSM isolées à partir des différents tissus n'expriment pas de marqueurs hématopoïétiques ni de marqueurs du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui leur confère la capacité de ne pas être immunogéniques (13).

Les CSM ont des capacités immunomodulatrices sur le système immunitaire inné avec une activité suppressive de l'activation des macrophages vers la voie M1 et une favorisation de leur activation vers la voie M2, une inhibition de la dégranulation des mastocytes et une inhibition de l'activation, la différenciation et de la fonction effectrice des cellules Natural Killers et des cellules dendritiques. En ce qui concerne le système immunitaire acquis, les CSM inhibent la prolifération, l'expression de récepteurs aux chimiokines et la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B. Pour les lymphocytes T CD8, les CSM inhibent leur prolifération, leur production de cytokines, et leur cytotoxicité. Enfin, en ce qui concerne les lymphocytes T CD4, les CSM inhibent leur prolifération et leur orientation Th1 et Th17 au profit des Th2 et Treg, qui ont des activités anti inflammatoires (29). A titre d'exemple, ce rôle immunomodulateur des CSM a été utilisé lors d'essais thérapeutiques en hématologie dans les greffes de moelle pour limiter les risques de réaction du greffon contre l'hôte (30).



4.3. Cas particulier : implication dans le soutien de la croissance tumorale

4.3.1 Rôle de soutien direct de la croissance tumorale

Nous venons donc d'aborder les rôles très variés des CSM, tant directs, par la formation et la réparation de tissus comme l'os par exemple, que indirects par leurs rôles de maintien de l'homéostasie de la niche endostée et de l'immunomodulation.

Les CSM jouent également un rôle dans la croissance tumorale. En effet, il a été montré que les CSM de rat ou humaines avaient la capacité de promouvoir la croissance tumorale et la survenue de métastases dans des modèles d'ostéosarcome (31)(32)(33). L'ostéosarcome (OS) est une tumeur primitive osseuse maligne que nous présentons dans la deuxième partie de l'introduction. Notre équipe a décrit un cas de récurrence locale d'un OS de l'humérus proximal chez une jeune femme en rémission, apparu après injection de tissu adipeux localement à des fins esthétiques (15).

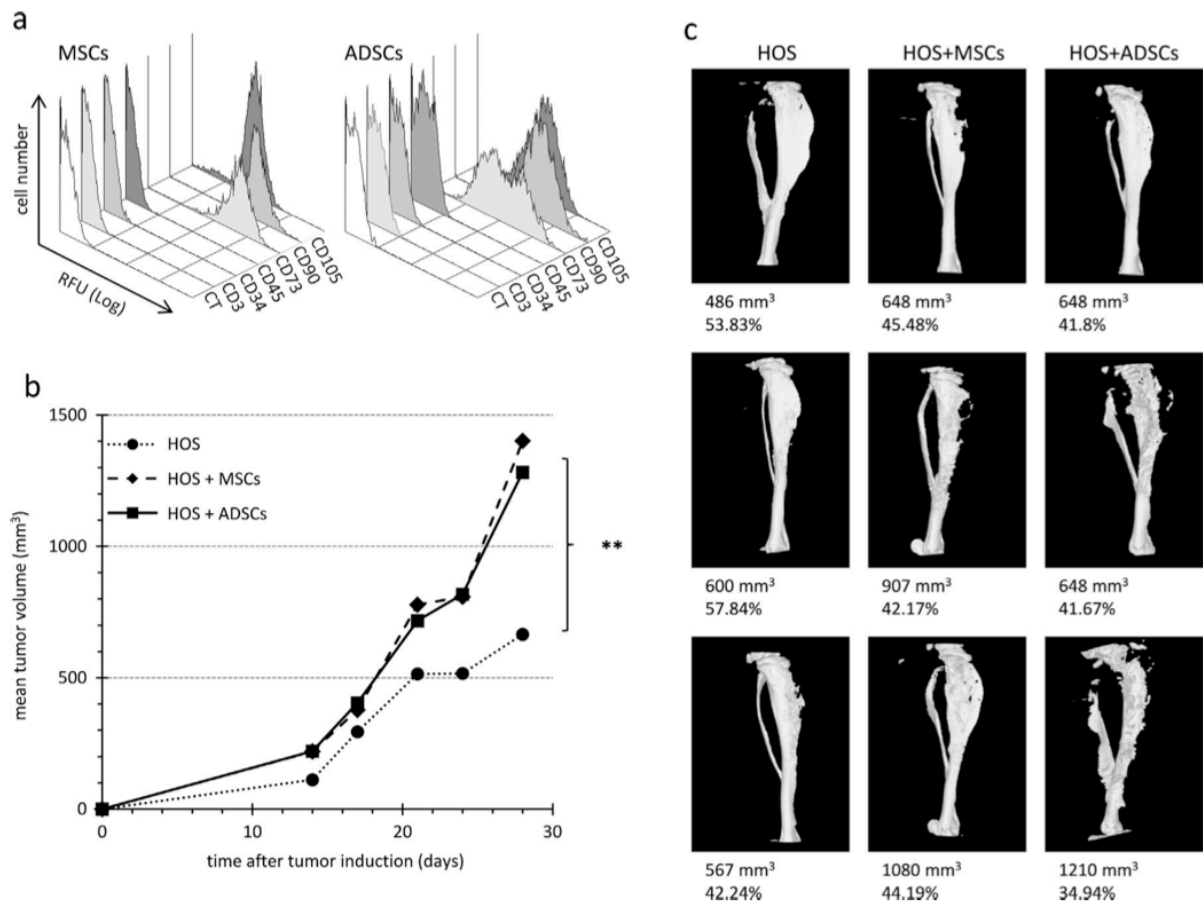


Figure 4 : coinjection de cellules de la lignée d'ostéosarcome humain MNNG-HOS avec des CSM dérivées de graisse (ADMSC) ou de moelle osseuse (MSC) chez la souris Nude. (a) Caractérisation des MSC et ADMSC en cytométrie en flux. (b) Les volumes tumoraux moyens des différents groupes de souris (n=8) en mm³ sont représentés en fonction du temps en jour depuis l'injection para tibiale. Les tumeurs du groupe HOS étaient obtenues par l'injection de 2.10⁶ cellules MNNG-HOS. Les tumeurs du groupe HOS+MSCs et HOS+ADMSCs étaient obtenues par l'injection respectivement de 2.10⁶ cellules MNNG-HOS associées à 5.10⁵ MSCs ou ADMSCs respectivement. Les différences significatives sont uniquement indiquées pour le groupe HOS avec les autres groupes au 30^{ème} jour (**: p<0,01). (c) Reconstructions de coupes scannographiques des tibias au contact desquels avaient été injectés les cellules. Le volume tumoral (mm³) et le volume d'os (%) sont indiqués.

Suite à ce cas clinique de récurrence locale d'un OS, nous avons voulu analyser l'effet des CSM dérivées de tissu adipeux sur le pouvoir tumorigène d'une lignée humaine d'OS, la lignée MNNG-HOS (décrite dans Matériel et Méthode au chapitre 1.2). Nous avons également analysé l'effet des pré ostéoclastes qui sont connus pour être impliqués dans la progression tumorale et métastatique (34)(35)(36). Dans notre étude, les pré-ostéoclastes n'avaient pas d'influence sur la croissance tumorale *in vivo* ni sur la survenue de métastases. En revanche, les CSM dérivées de tissu adipeux entraînaient une augmentation de taille des tumeurs induite par MNNG-HOS. L'ostéolyse tumorale et la progression métastatique n'étaient pas influencées par ces CSM (Figure 4). *In vitro*, nous avons analysé l'effet paracrine des CSM sur des lignées de cellules

ostéosarcomateuses, en culture en conditions d'adhérence en flasque et également en culture sans adhérence (qui permet la formation de sphères). L'addition de 50% de milieu conditionné de CSM dérivées de tissu adipeux augmentait significativement la prolifération de deux lignées d'ostéosarcome (MNNG-HOS et SaOS2), sans diminuer la proportion de cellules en phase G0. Ainsi nous avons confirmé l'effet des CSM sur la croissance *in vitro* et *in vivo* de l'OS mais nous n'avons toutefois pas pu apporter la preuve que les CSM pouvaient induire une sortie de quiescence (de phase G0) de cellules tumorales dormantes et donc que les CSM étaient responsables de la récurrence tumorale observée.

L'article entier est présenté en annexe 3 (37).

4.3.2 Possible origine des cellules de soutien de la croissance tumorale

Des cellules fibroblastiques du stroma soutenant la croissance tumorale sont rapportées dans la littérature. Il s'agit des Cancer Associated Fibroblast (CAF). A l'état physiologique, les fibroblastes sont des cellules du stroma qui dérivent des CSM, et qui synthétisent et remodelent la matrice extra cellulaire. Ils synthétisent également des facteurs de croissance. Ils sont impliqués de manière ponctuelle dans la cicatrisation des tissus mous avec une activation temporaire en myofibroblastes. Ils expriment alors l'Actine Smooth Muscle alpha (ASMA) et acquièrent des capacités de prolifération augmentées (38).

Dans les cancers solides d'origine épithéliale, les CAF correspondent à des fibroblastes activés, mais de manière permanente, sans retour à l'état antérieur et sans évoluer vers l'apoptose (39)(40). Le rôle des CAF serait de soutenir la croissance tumorale, recruter des cellules endothéliales pour la néoangiogenèse, favoriser la dissémination métastatique (39). L'origine des CAF serait multiple : les CSM d'une part, mais également les cellules épithéliales via la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules endothéliales via la transition endothélio-mésenchymateuse (39).

Il n'y aurait pas de marqueur unique spécifique pour identifier les CAF. Xing *et al.* rapportent les différents marqueurs de CAF exprimés décrits dans la littérature (39) :

- ASMA (marqueur myofibroblastique),
- Vimentine,
- FAP (Fibroblast Activation Protein, exprimé dans les fibroblastes activés mais également dans certains sarcomes, qui aurait une activité de destruction de la matrice extra cellulaire),
- Thy-1 (ou CD90, impliqué dans l'adhésion et la communication cellulaire),
- S100A4 (ou FSP1, protéine impliquée dans la mobilité, l'invasion, la polymérisation de la tubuline),
- négativité des marqueurs épithéliaux comme les cytokératines et marqueurs endothéliaux comme le CD31.

Dans la mesure où notre propos porte sur les CSM, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux CAF qui dériveraient des CSM, étudiés par Spaeth *et al.* (41). Ils ont travaillé sur la définition de ce qu'ils appelaient les Tumor Associated Fibroblast (TAF). Nous utiliserons le terme de CAF par simplification. Spaeth *et al.* ont défini des critères de caractérisation suivants:

- expression de marqueurs fibroblastiques : FAP et FSP (ou CXCL1, cytokine impliquée dans l'inflammation),
- expression de la MMP3 (métalloprotéase impliquée dans la dégradation de la matrice extra cellulaire),
- expression de marqueurs myofibroblastiques comme l'ASMA ou la Desmine,
- sécrétion de facteurs de soutien de la croissance tumorale : HGF (Hepatocyte Growth Factor, ayant un rôle angiogénique notamment), EGF (Epidermal Growth Factor, impliqué dans la croissance et la progression tumorale), IL6 (Interleukine 6, cytokine pro inflammatoire).

Les CAF présentent donc un enjeu important dans le traitement des cancers solides et pourraient également représenter des cibles thérapeutiques. Tout comme les CSM, ils ne présentent pas de marqueur unique spécifique pour les identifier.



5. Conclusion

La CSM ne présente pas de critère spécifique pouvant l'identifier aisément. Elle joue un rôle central tant lors de la croissance que dans le remodelage et la réparation des tissus. D'autres fonctions sont moins bien connues comme par exemple son rôle dans l'immunomodulation et dans le soutien de la croissance tumorale.

La CSM étant à l'origine des précurseurs ostéoblastiques, elle pourrait être impliquée directement ou indirectement dans la genèse et la croissance des tumeurs malignes primitives osseuses.

INTRODUCTION

PARTIE II : L'OSTEOSARCOME

1. Généralités

1.1 Définition

L'ostéosarcome (OS) est une tumeur osseuse primitive maligne constituée de cellules sarcomateuses produisant une matrice ostéoïde et de l'os immature (42).

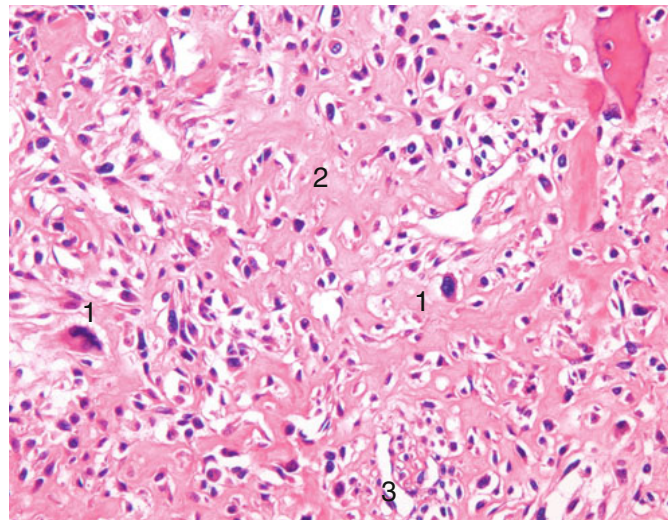


Figure 5 : Coupe histologique d'un ostéosarcome conventionnel. Le diagnostic repose sur l'observation de cellules sarcomateuses (1), avec une matrice ostéoïde (2). Il existe également une néovascularisation avec des capillaires dysmorphiques (3). D'après Picci *et al*, 2014 (43).

Pour le diagnostic, il n'y a pas de marqueur spécifique comme dans le sarcome d'Ewing par exemple où il existe un transcrite de fusion spécifique (44). Le diagnostic repose uniquement sur l'observation microscopique, alliée à la confrontation anatomo-radio-clinique (Figure 5).

1.2 Epidémiologie

L'OS est la tumeur primitive maligne la plus fréquente, suivie par le chondrosarcome, puis le sarcome d'Ewing (Figure 6). On estime son incidence à 2-3 nouveaux cas par million d'habitants par an, ce qui représente entre 150 et 200 nouveaux cas par an en France. L'OS représente 0,2% de tous les cancers (43). L'OS concerne préférentiellement l'adolescent et l'adulte jeune. Lorsque qu'il survient chez des malades plus âgés, il s'agit plus souvent de formes secondaires. Il existe une prédominance masculine (45).

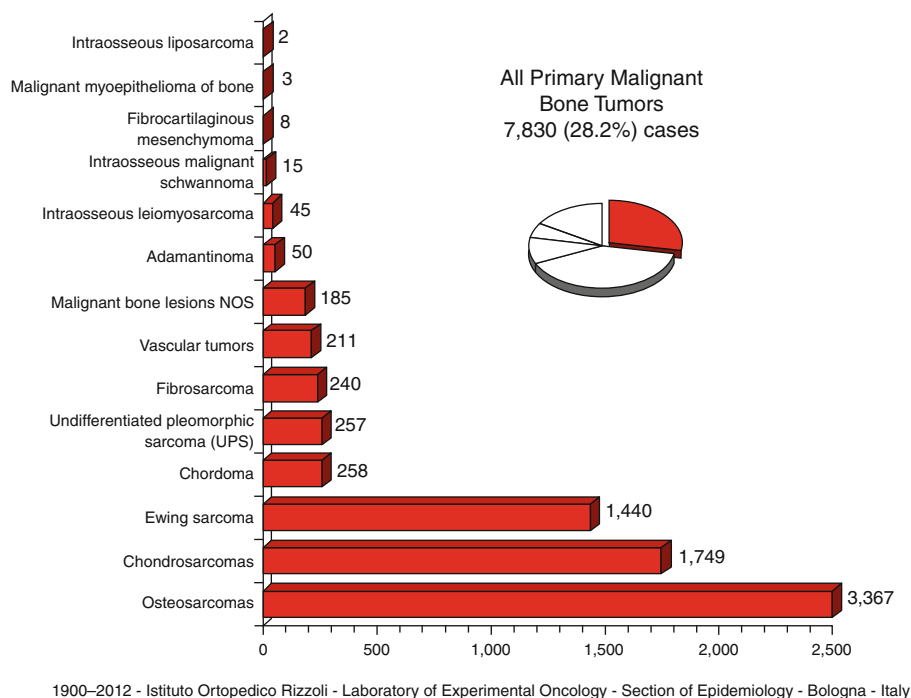


Figure 6 : incidence des sarcomes primitifs osseux. D'après Picci *et al*, 2014 (43).

De manière générale, l'OS se développe dans la région métaphysaire des os longs. Dans 70% des cas, l'OS survient autour du genou (c'est à dire au fémur inférieur ou au

tibia supérieur). Il peut se développer également à l'épaule (c'est à dire au niveau de l'humérus supérieur). Pour les 30% des cas restant, toutes les localisations sur le squelette ont été décrites.

2. Différents sous types

La classification de la Fédération Nationale De Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), attribue un grade de I à III pour les sarcomes des tissus mous en fonction du nombre de mitoses observées, du pourcentage de nécrose tumorale et de la différenciation cellulaire (46).

En ce qui concerne les 3 principaux sarcomes primitifs osseux, ayant chacun une histoire naturelle et un comportement différent, ils n'y a pas de classification commune. Le sarcome d'Ewing est toujours de haut grade. La classification histologique de O'Neal et Ackerman (grade I à III) est utilisée pour les chondrosarcomes centraux (47). Enfin, pour l'OS, l'analyse histologique corrélée aux éléments cliniques et radiologiques permet de les classer de la façon suivante (42) :

- OS de haut grade de malignité comprenant les sous types histologiques conventionnel, télangiectasique, de haut grade de surface et à petites cellules. Sur le plan clinique, des formes multi-focales et secondaires sont décrites.
- OS de malignité intermédiaire correspondant à l'OS périosté
- OS de bas grade de malignité comprenant l'OS parostéal et l'OS central de bas grade.

2.1 *Ostéosarcomes de haut grade de malignité*

Ce sont des tumeurs agressives, définies par un risque élevé de récurrence locale et d'évolution métastatique, même après un traitement bien conduit. Les poumons sont les premiers sites de localisations métastatiques, suivis du squelette. Une spécificité de l'OS de haut grade est la présence possible de « skip métastase ». Il s'agit de métastases situées dans le même os que celui où siège la tumeur primitive.

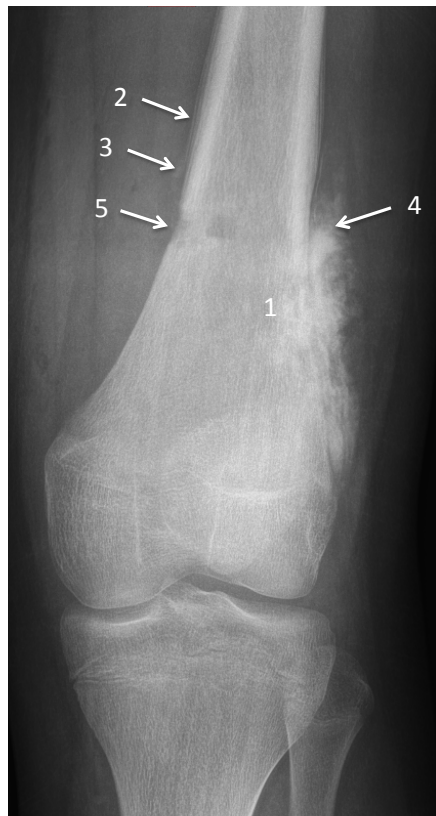


Figure 7 : radiographie de fémur inférieur gauche de face d'un garçon de 15 ans. Cet examen montre une tumeur à point de départ intra osseux, dans la région métaphysaire du fémur inférieur, avec des plages d'ostéolyse et d'ostéocondensation (1). L'analyse du fémur au dessus de la tumeur permet de voir une réaction périostée (2) avec un éperon de Codman (3) et des images en feu d'herbe en cours d'ossification (4). La biopsie chirurgicale (5) a permis de poser le diagnostic d'OS conventionnel à prédominance ostéoblastique.

2.1.1 Conventionnel

L'OS de haut grade de malignité conventionnel est la forme la plus fréquente (Figure 7). Il représente approximativement les $\frac{3}{4}$ des OS. En fonction du territoire histologique prédominant, trois principaux sous-types sont décrits : ostéoblastique, chondroblastique et fibroblastique (Figure 8).

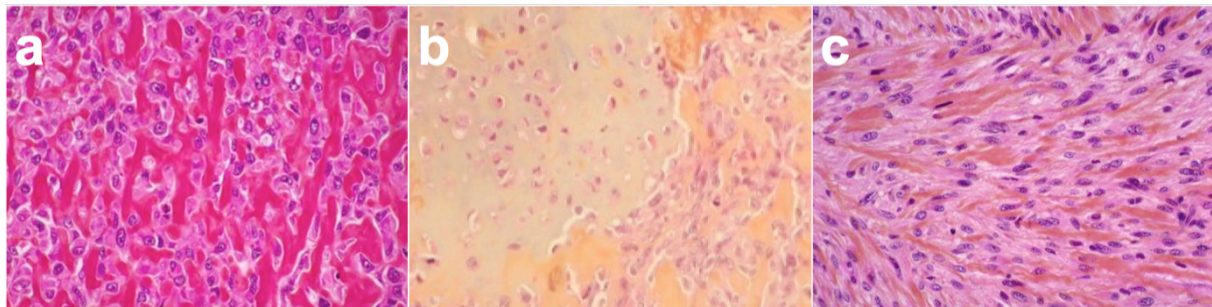


Figure 8 : illustrations histologiques des 3 sous types d'ostéosarcomes conventionnels les plus fréquents. (a) OS ostéoblastique. (b) OS chondroblastique - présence de territoires d'OS ostéoblastiques minoritaires qui permettent de faire le diagnostic d'OS. La présence de territoires chondroblastiques majoritaires (à gauche de l'image), permet de poser le diagnostic de sous type d'OS chondroblastique. (c) OS fibroblastique : les cellules tumorales sont fusiformes, la matrice ostéoïde moins importante que dans les deux premiers sous types. Coloration à l'Hématoxyline, Eosine, Safran.

Cliniquement, les patients se plaignent souvent de douleurs de rythme inflammatoire qui évoluent depuis plusieurs semaines. Les signes généraux comme la fièvre ou l'altération de l'état général sont exceptionnels. L'examen clinique physique retrouve souvent une tuméfaction, parfois chaude, au site concerné. Il existe également une impotence fonctionnelle et des douleurs importantes à la palpation et à la mobilisation de l'articulation adjacente. Il n'est pas rare qu'une fracture pathologique survienne après plusieurs semaines de douleurs.

L'examen radiographique permet souvent d'évoquer le diagnostic, bien que seule la biopsie permette un diagnostic formel. De manière courante, cet examen met en évidence des plages d'ostéolyse et/ou d'ostéocondensation intra-médullaires dans la région métaphysaire, avec une rupture corticale et un envahissement des parties molles adjacentes. Souvent, un aspect de réaction périostée est observé avec rupture du périoste à l'endroit où la tumeur franchit la corticale, appelé éperon de Codman. Dans les parties molles adjacentes, sont parfois retrouvées des images en « feu d'herbe » qui sont des ossifications spiculées, perpendiculaires à la corticale et qui correspondent à la réaction des tissus mous adjacents à l'envahissement tumoral (Figure 7). L'Imagerie par

Résonance Magnétique (IRM) est un complément d'imagerie indispensable pour l'analyse de l'étendue de la tumeur dans l'os. Elle permet aussi de préciser l'extension aux parties molles et à l'articulation adjacente (Figure 9).

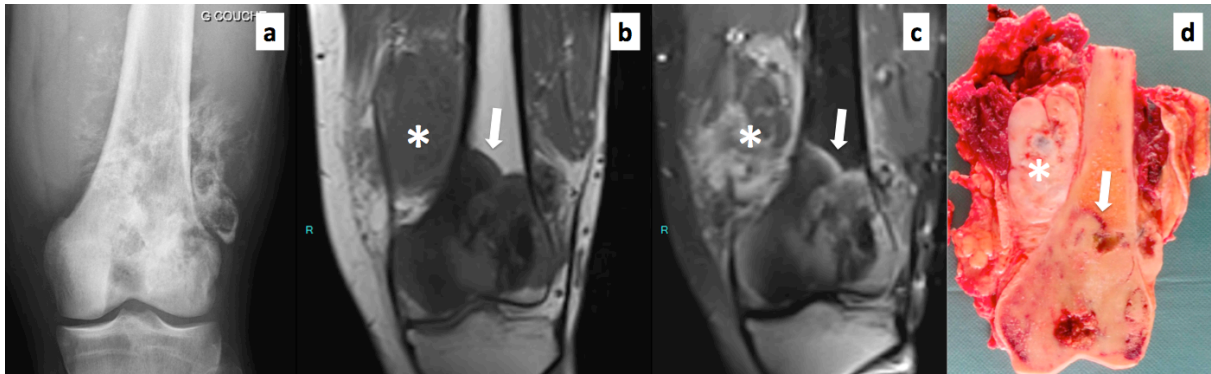


Figure 9 : Homme de 36 ans présentant un OS conventionnel à prédominance ostéoblastique avec un bourgeon extra-médullaire chondroblastique (astérisque blanche). La radiographie standard montre une tumeur ostéoformatrice développée au dépend de la métaphyse et de l'épiphyse du fémur inférieur, avec envahissement des parties molles adjacentes (a). L'IRM pondérée en séquence T1 permet de délimiter la tumeur dans la médullaire (flèche blanche) (b). L'IRM pondérée en séquence T2 avec saturation du signal de la graisse et injection de gadolinium permet de mieux apprécier l'extension aux parties molles (astérisque blanche) (c). Photographie de la pièce d'exérèse en coupe frontale corrélant les constatations faites à l'IRM (d).

Sur le plan anatomopathologique, il s'agit d'une tumeur présentant une diversité morphologique extrêmement large. Les cellules tumorales peuvent présenter différents aspects avec des atypies cyto-nucléaires le plus souvent très importantes : épithélioïde, plasmocytoïde, fusiforme, pléomorphe, voire même à petites cellules rondes. La matrice osseuse tumorale synthétisée est elle aussi d'aspect et d'abondance très variables, pouvant former un lacis ou de petites travées irrégulières de substance ostéoïde (Figure 10).

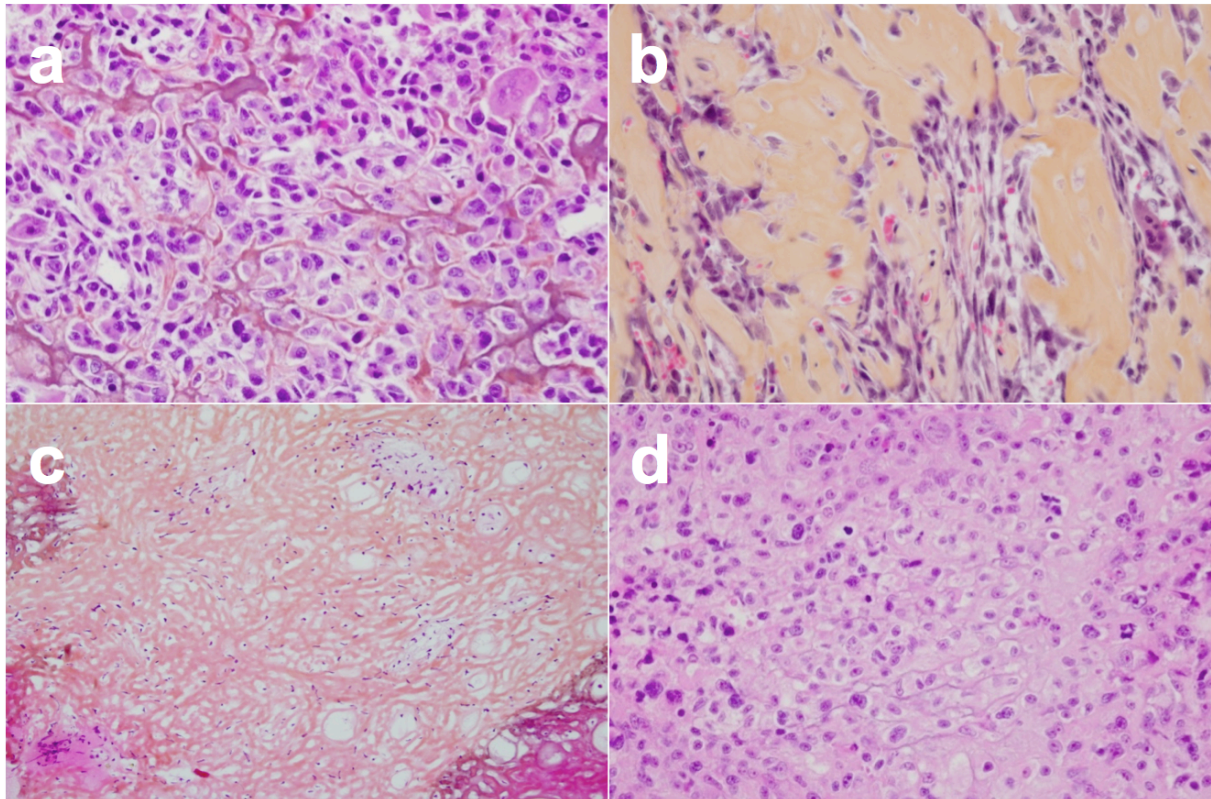


Figure 10 : illustration anatomopathologique de différents types de matrice ostéoïde pouvant être présents dans l'ostéosarcome conventionnel. La matrice ostéoïde peut se présenter sous la forme d'un fin laciis ostéoïde (a), d'un épais dépôt de substance ostéoïde (b) ou prendre un aspect très dense et sclérosant (c). Elle peut être parfois focale et réduite (d). Coloration à l'Hématoxyline, Eosine, Safran.

Sur le plan cytogénétique, les cellules tumorales présentent des anomalies caryotypiques très importantes tant numériques que structurales avec une instabilité chromosomique majeure (48). Ces anomalies sont illustrées par la Figure 11 (49). Il existe des délétions, des amplifications multiples. A titre d'exemple, l'oncogène *MYC* situé en 8q24.21 est amplifié dans environ la moitié des tumeurs. Dans 40% des cas, il existe une perte d'hétérozygotie ou une délétion de *TP53* située en 17p13.1. Il n'y a pas d'anomalie constante retrouvée qui puisse être un marqueur spécifique pour le diagnostic.

Il n'y a pas de différence d'agressivité connue entre les 3 sous-types histologiques (42)(43)(50).

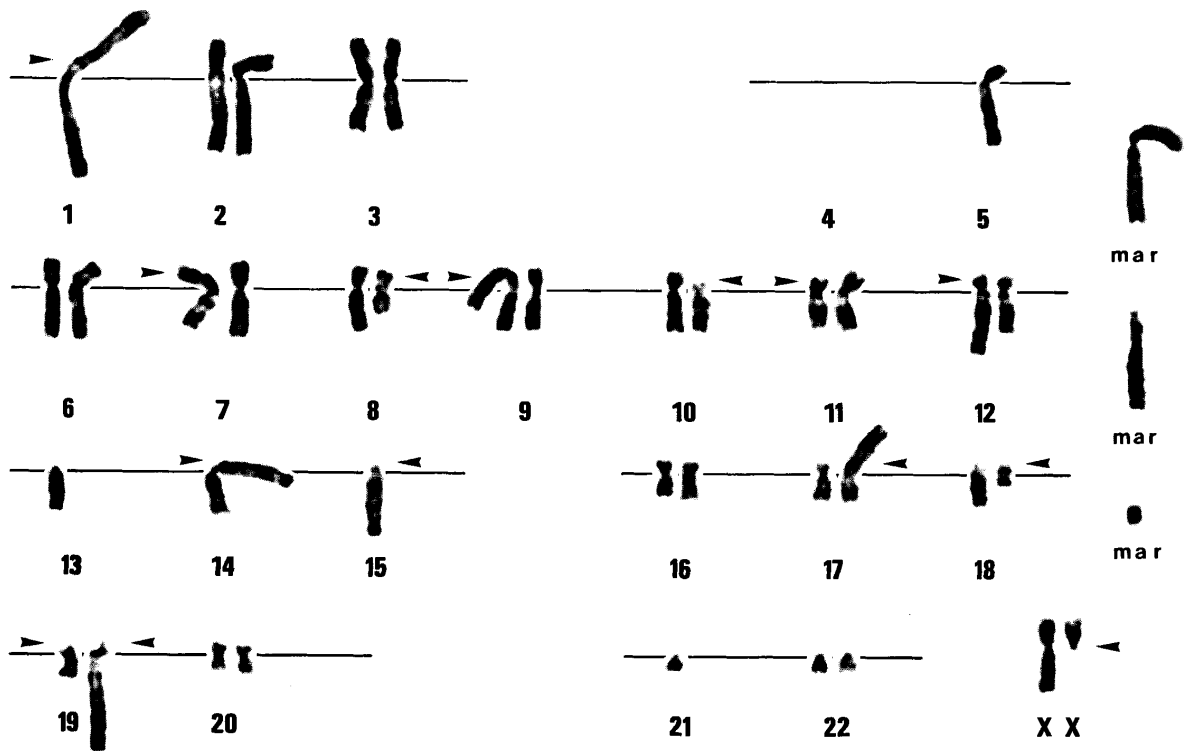


Figure 11: caryotype d'un ostéosarcome conventionnel montrant de multiples anomalies numériques et structurales. Tiré de Mandahl *et al* 1984 (49).

2.1.2 Télangiectasique

L'OS de haut grade de malignité télangiectasique est une forme plus rare, représentant 6% des OS. Il s'agit d'une forme de diagnostic difficile qui comprend des territoires kystiques à l'imagerie et qui peut être diagnostiquée à tort comme un kyste anévrysmal, qui est une tumeur bénigne. L'OS télangiectasique est une tumeur hypervascularisée, plutôt destructrice à l'imagerie.

Sur le plan anatomopathologique, la tumeur est constituée de cavités vides ou remplies de sang. La présence de cellules malignes parfois rares, dans les cloisons ou flottantes, permet d'en faire le diagnostic. Sur le plan génétique, compte tenu de la rareté de ce sous type d'OS, peu de données sont rapportées, mais il s'agit également d'une tumeur à génétique complexe

Le pronostic est similaire à celui de l'OS conventionnel (43).

2.1.3 De haut grade de surface

L'OS de haut grade de malignité de surface est une forme rare également. Elle atteint plus volontiers la diaphyse fémorale et tibiale. Cet OS se développe à la surface de l'os avec un aspect d'ostéocondensation, généralement non circonférentiel.

Sur le plan histologique, il présente le même aspect que l'OS conventionnel. Sur le plan génétique, compte tenu de la rareté de ce sous type d'OS, il n'y a pas d'information sur les anomalies potentiellement présentes (42)(51).

2.1.4 A petites cellules

L'OS de haut grade de malignité à petites cellules est une tumeur extrêmement rare, qui pose le problème essentiellement de son diagnostic différentiel avec les autres sarcomes à cellules rondes, en particulier le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome mésenchymateux, et de sa classification. Bien que n'ayant pas de transcrite de fusion rapporté dans ce type tumoral il s'agirait plutôt d'une tumeur à génétique simple. Selon certains auteurs, cette tumeur serait plus proche du sarcome d'Ewing que de l'OS (42)(52).

2.1.5 Multifocal

L'OS de haut grade de malignité multifocal est une forme très rare (0,6% de tous les OS), touchant préférentiellement l'enfant et l'adolescent. Lors du diagnostic, plusieurs localisations osseuses sont découvertes (Figure 12).

Sur le plan anatomopathologique, le même sous-type histologique correspondant à un OS conventionnel est retrouvé aux différents sites.

Sur le plan de l'histogénèse se pose le problème du diagnostic différentiel entre une authentique tumeur multifocale et une évolution métastatique osseuse d'un OS conventionnel. Toutefois, les localisations multiples sur les cartilages de croissance sont évocatrices du diagnostic d'OS multifocal (53).

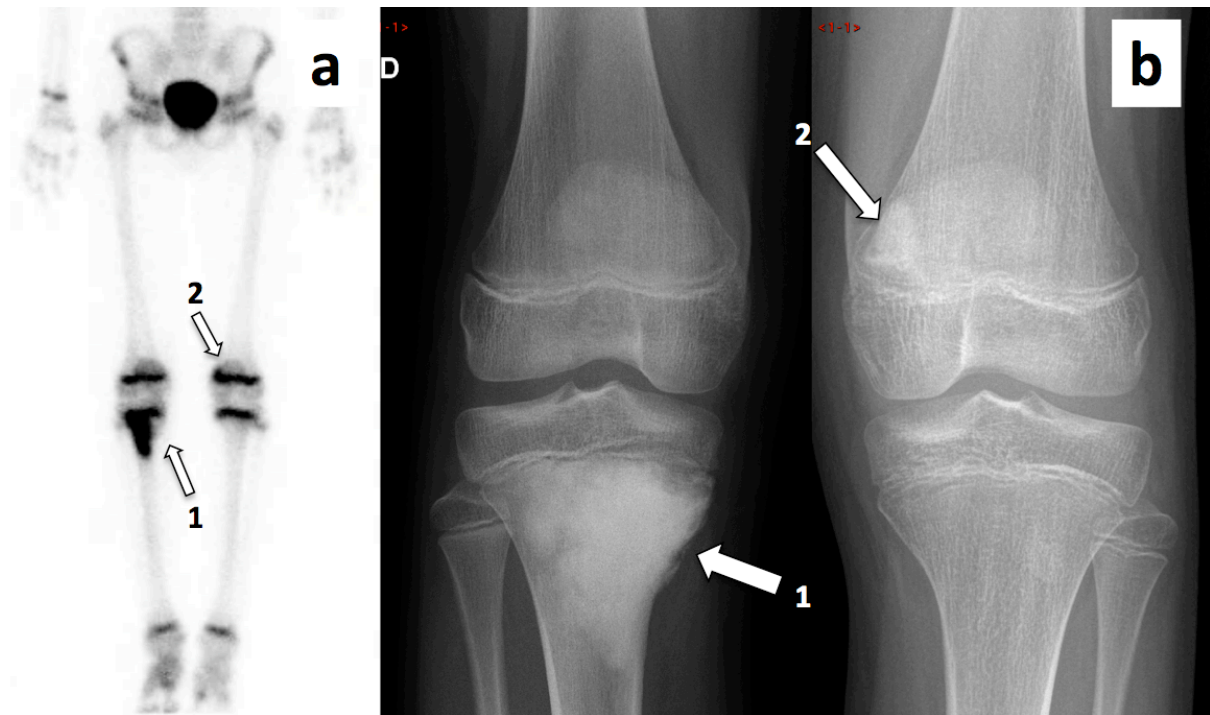


Figure 12 : garçon de 15 ans présentant un OS conventionnel ostéoblastique du tibia proximal droit. La scintigraphie osseuse au Technétium^{99m} retrouvait une lésion hyperfixante située au tibia proximal droit (a, 1), confirmant les constatations radiographiques (b, 1). Elle mettait en évidence également une discrète hyperfixation sur le bord interne du cartilage de croissance du fémur distal gauche (a, 2). La radiographie du genou gauche confirmait la présence d'une tumeur osseuse (b, 2). La biopsie chirurgicale des deux lésions a permis de poser le diagnostic d'OS multifocal.

2.1.6 Secondaire

Les OS de haut grade de malignité secondaires correspondent aux OS qui se développent sur un os pathologique iatrogène (post irradiation) ou acquis.

Les OS radio induits surviennent généralement à partir de 5 ans après un traitement par radiothérapie d'une autre pathologie, dans le territoire d'irradiation ou en bordure de champ de l'irradiation (Figure 13) (54).




Figure 13 : coupe scannographique axiale claviculaire gauche d'une malade de 46 ans qui a comme antécédent une maladie de Hodgkin à l'âge de 18 ans. Une radiothérapie comprenant entre autre les creux sus claviculaires et creux axillaires avait été réalisée. L'examen scannographique a été demandé devant la présence de douleurs de l'épaule gauche. Cette imagerie montre un aspect d'image en feu d'herbe sur le bord postérieur du 1/3 externe de la clavicule. La biopsie chirurgicale a permis de poser le diagnostic d'OS conventionnel secondaire radio induit.

En cas de pathologie osseuse sous-jacente, comme la dysplasie fibreuse ou la maladie de Paget, il peut être observé l'apparition d'authentique OS conventionnels.

2.2 De grade intermédiaire

Les OS de grade intermédiaire sont représentés par l'OS périosté. Il s'agit d'un sous-type rare, survenant dans la 2^{ème} décade de la vie principalement et atteignant essentiellement la diaphyse du tibia ou du fémur. La croissance tumorale est plus lente que celle de l'OS conventionnel.

Sur le plan anatomopathologique, une matrice cartilagineuse atypique est prédominante, pouvant faire évoquer un chondrosarcome. Sur le plan génétique, les



rare observations rapportent globalement des anomalies chromosomiques complexes (42)(43).

2.3 De bas grade de malignité

Les OS de bas grade de malignité sont des tumeurs à agressivité locale uniquement.

2.3.1 Parostéal

L'OS de bas grade de malignité parostéal est une tumeur rare, survenant principalement dans la 3^{ème} décennie de la vie, exceptionnelle avant la fin de la croissance. Il survient dans 2/3 des cas environ à la face postérieure et inférieure du fémur. Une extension ossifiée est retrouvée dans les parties molles et est souvent étendue du fait de la croissance tumorale lente. On retrouve une interposition périostée entre le corps de la tumeur et la diaphyse, ce qui permet de faire la différence avec un OS périosté. L'atteinte endoméduillaire est rare. Les diagnostics différentiels principaux de l'OS parostéal sont l'OS périosté et l'OS de haut grade de surface.

Sur le plan anatomopathologique, la tumeur associe dans des proportions variées une composante osseuse et une composante fibreuse. La composante fibreuse est peu cellulaire, constituée des cellules fusiformes avec des atypies modérées. La composante osseuse est constituée de travées osseuses assez bien différenciées. Ces OS sont à génétique simple. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs chromosomes en anneau, et il s'agit souvent de la seule altération. L'analyse par hybridation génomique comparative montre qu'il existe un amplicon au niveau de la région 12q13-15. Les gènes CDK4 et MDM2 sont inclus dans cet amplicon et sont co-amplifiés et sur-exprimés dans une assez grande proportion de cas, ce qui constitue un marqueur diagnostique sensible et spécifique des OS de bas grade (55).

2.3.2 Central de bas grade

L'OS central de bas grade de malignité ressemble à l'OS parostéal mais dans une forme centromédullaire. Il survient dans la 3^{ème} décennie de la vie principalement, atteint préférentiellement le fémur distal, le tibia proximal. Il se développe principalement aux métaphyses, mais également aux épiphyses. L'aspect radiographique est mixte : condensant et lytique.

Les caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires de l'OS de bas grade de type central sont similaires à celles de l'ostéosarcome de bas grade de type parostéal (42)(43).


2.4 Synthèse

L'OS est donc une tumeur très complexe et son diagnostic n'est pas toujours aisé, ce d'autant qu'il n'y a pas de marqueur spécifique d'une part et qu'il existe une grande diversité anatomopathologique d'autre part. Le diagnostic requiert en conséquence une expérience et une expertise importante ainsi qu'une corrélation des différents éléments cliniques et d'imagerie.

3. Prise en charge et pronostic des ostéosarcomes de haut grade

3.1 Prise en charge

La prise en charge débute par l'établissement du diagnostic et par le bilan d'extension. Pour le diagnostic, un bilan d'imagerie du site pathologique est nécessaire avec des radiographies standard et une IRM. Puis le diagnostic formel est établi par la biopsie avec analyse anatomopathologique. Ensuite le bilan d'extension recherchera des métastases viscérales et/ou osseuses. Une IRM de l'os pathologique entier recherchera



une « skip métastase ». La scintigraphie osseuse au Technetium^{99m} permet une analyse du squelette entier. Enfin, le scanner thoraco abdomino pelvien permet l'analyse des parties molles axiales.

Le traitement actuel repose sur une chimiothérapie néo adjuvante puis une résection carcinologique de la tumeur puis enfin une chimiothérapie adjuvante basée sur la réponse histologique de la tumeur.

3.2 Chimiothérapie.

Initialement, la chirurgie était le traitement exclusif avec bien souvent une amputation. Il faut attendre les années 1970 pour que la chimiothérapie apparaisse dans le traitement en complément. La conservation de membre étant peu à peu privilégiée, il fallait attendre que la prothèse sur mesure pour la reconstruction soit fabriquée, ce qui nécessitait plusieurs semaines d'attente. C'est ainsi que se développe la chimiothérapie néoadjuvante. Elle devient prépondérante à partir du début des années 1980.


Les drogues ayant fait la preuve de leur efficacité dans le traitement de l'OS localisé sont le méthotrexate à haute dose, le cis-platine, l'ifosfamide et, dans une moindre mesure, la doxorubicine. Il a été proposé l'adjonction de bi-phosphonates dans le protocole de chimiothérapie dans l'essai clinique « OS 2006 » devant des résultats très prometteurs chez l'animal. Malheureusement ces résultats n'ont pas été confirmés dans cet essai de phase 3 (56).

Il n'y a pas de place pour la radiothérapie dans le traitement conventionnel de l'OS de haut grade (57)(58).

3.3 Analyse histologique

L'analyse de la pièce opératoire de résection est un élément déterminant. Elle est exhaustive et analyse en premier lieu la taille de la tumeur et les marges de résection. Trois types de marges de résection sont décrits :

- les marges peuvent être saines



- la tumeur peut venir au contact de la limite de résection : marge microscopiquement contaminées,

- les marges peuvent être macroscopiquement contaminées.

Ensuite, la tumeur est étudiée dans sa totalité, subdivisée en de multiples sous régions qui seront analysées chacune avec quantification des cellules tumorales résiduelles viables (59). Une bonne réponse histologique est définie lorsqu'il y a moins de 10% de cellules tumorales résiduelles viables sur l'ensemble de la pièce ; tandis qu'une mauvaise réponse histologique au traitement correspond à plus de 10% de cellules tumorales résiduelles viables.

3.4 Pronostic

Avant l'apparition de la chimiothérapie, la survie globale à 5 ans était inférieure à 20%. Actuellement, avec la chimiothérapie associée à la chirurgie, le pronostic avoisine 70% de survie pour les malades ne présentant pas de métastase au diagnostic. Dans le cas contraire, elle est alors de 30%. Pour les malades présentant une tumeur associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie, le pronostic avoisine les 40% de survie à 5 ans.

En ce qui concerne l'OS multicentrique, il s'agit d'une pathologie de mauvais pronostic avec une survie à 5 ans inférieure à 15%.

Le pronostic des OS secondaire est généralement moins bon que celui de l'OS conventionnel notamment du fait d'un âge des malades plus élevé et donc de l'impossibilité de réaliser une chimiothérapie qui comprend du méthotrexate à haute dose (43)(50)(60).


4. Prise en charge et pronostic des ostéosarcomes conventionnels de grade intermédiaire et de bas grade

La prise en charge diagnostique est identique à celle des OS conventionnels de haut grade. Le traitement est quand à lui exclusivement chirurgical avec la réalisation d'une exérèse carcinologique sans traitement complémentaire nécessaire. Lorsque les marges chirurgicales sont en zone saine, le risque de récurrence locale est minime. Le risque métastatique est inférieur à 10% (43)(55).

5. Facteurs prédisposants

Comme nous l'avons discuté précédemment, certaines pathologies osseuses prédisposent à la survenue d'un OS ou alors certaines situations acquises comme une zone qui a reçu une radiothérapie sont des facteurs prédisposants de survenue de l'OS. Sur le plan constitutionnel, sans pathologie osseuse sous jacente, certaines autres pathologies prédisposent également à la survenue de l'OS et nous allons détailler les principales.

Le gène codant pour la protéine P53, situé sur le chromosome 17p13.1, joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire. Dans 40% des OS, *P53* est mutée ou altérée et dans 10% des cas, *MDM2*, antagoniste de *P53* est amplifié (42). Aussi, les malades qui présentent une anomalie constitutionnelle de P53 sont à haut risque de développer un OS. C'est le cas dans le syndrome de Li-Fraumeni qui est une maladie génétique rare, autosomique dominante à pénétrance haute, où il existe une délétion ou une mutation de la protéine P53 de manière constitutionnelle. L'incidence de l'OS dans cette pathologie est de 12%. Il y aurait en réalité une incidence plus grande du syndrome de Li-Fraumeni avec près de 10% des malades de moins de 20 ans présentant un OS qui auraient une mutation systémique de *P53* (61)(62).



Dans la forme familiale du rétinoblastome, une mutation est retrouvée sur un gène suppresseur de tumeur appelé *RB*, situé en 13q14. Ce gène est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Le rétinoblastome est une maladie autosomique dominante à pénétrance quasi complète. Le risque de développer un OS est de 12% sur 20 ans (63).

D'autres syndromes rares avec augmentation de l'incidence de l'OS sont décrits: syndrome de Rothmund-Thomson, syndrome de Bloom, syndrome de Werner. Ces syndromes ont en commun des anomalies des protéines impliquées dans la stabilisation du génome (61).

6. Eléments et marqueurs pronostiques

Dans toute pathologie grave, des marqueurs pronostiques sont recherchés afin d'adapter la prise en charge, tant pour le traitement que pour la prise en charge.

Dans l'OS de haut grade, des marqueurs de mauvais pronostic en analyse multivariée ont été retrouvés dans différentes études : une tumeur située sur le squelette axial, un taux élevé de phosphatase alcaline sérique au diagnostic, un volume tumoral estimé à plus de 200 mL des marges de résection non satisfaisantes (c'est à dire contaminées ou limites), une mauvaise réponse histologique à la chimiothérapie. Ces éléments étaient indépendamment corrélés à une diminution de la survie sans événement (50)(64)(65). Des éléments comme le sous-type histologique (ostéoblastique, chondroblastique ou fibroblastique) ne semblent pas avoir d'influence sur le pronostic (50).

En cas de maladie métastatique au diagnostic, les éléments de mauvais pronostic sont : le nombre de sites métastatiques (20 % de survie sans événement à 5 ans en cas de site métastatique unique, 5% pour les malades présentant plusieurs sites), le taux élevé de phosphatase alcaline sérique au diagnostic, des marges de résection des métastases contaminées. En présence d'au moins un élément de mauvais pronostic, la

survie sans événement est de 5% à 5 ans contre 30% pour les malades non métastatiques (p=0,0023)(66)(67).

Sur le plan biologique, d'autres marqueurs ont été décrits. Ainsi un réarrangement du locus 17q21 (délétion ou amplification) codant pour la Topoisomérase 2A est corrélé à une bonne réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (68).

L'expression de l'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α , facteur de transcription régulé par l'hypoxie) et de l'Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) par la tumeur avant chimiothérapie sont corrélées à un mauvais pronostic (69). De même, l'hyper expression du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est corrélée à un mauvais pronostic (70).

Des éléments du microenvironnement tumoral sont également rapportés comme étant des marqueurs pronostiques. L'infiltration de la tumeur par les macrophages CD163 positifs sur la biopsie était corrélée à une meilleur survie globale et une meilleur survie sans maladie (71).

7. Origine de l'ostéosarcome

L'ostéoblaste, cellule capable de former la matrice ostéoïde, dérive de la CSM comme nous l'avons détaillé dans l'introduction (partie I, Généralités). De plus, la CSM étant multipotente, elle est également capable de se différencier dans le lignage chondrocytaire et fibroblastique ce qui pourrait expliquer les différents sous-types d'OS conventionnels. Tous ces éléments concordent pour que la CSM, à un stade précoce de différenciation dans la voie ostéoblastique, soit bien à l'origine de l'OS (72). De manière intéressante, *in vivo*, des OS sont obtenus chez la souris qui présente une extinction de *P53* dans ses progéniteurs ostéoblastiques. L'extinction de *PRB* isolée n'entraîne pas la formation d'OS (73). Par ailleurs, Mohseny *et al* avaient pu obtenir la formation d'un OS murin à partir de CSM murines saines en culture. Seulement les CSM de souris

présentent une instabilité en culture prolongée à l'origine de la formation d'OS. Ce modèle n'est pas transposable à l'Homme car les CSM sont stables en culture (74).


Récemment, Wang *et al.* ont pu obtenir de manière reproductible la formation d'OS à partir de CSM humaines de patients sains (75). Dans ces CSM, *RB* avait été éteint en combinaison avec une hyperexpression de *C-Myc*. La tumeur formée *in vivo* dans un modèle murin orthotopique correspondait à un OS avec la possible production d'une matrice ostéoïde (non interprétable sur les coupes histologiques fournies). L'analyse transcriptomique de ces cellules transformées était similaire à celle de lignées d'OS humain. Il n'y a toutefois pas eu d'analyse cytogénétique à la recherche d'une instabilité chromosomique, caractéristique de l'OS.

Tous ces éléments nous orientent donc sur l'origine de l'OS : la CSM, à un certain niveau de différenciation dans la voie ostéoblastique. De nombreuses questions demeurent toutefois non résolues : comment passer d'une cellule pré-tumorale à une cellule tumorale à génétique complexe, comment une tumeur à génétique complexe peut-elle survivre et proliférer. Nous tenterons d'y répondre dans la discussion.

8. Modélisation de l'ostéosarcome

8.1 Modélisation de la tumorigenèse

Afin de mieux appréhender et étudier l'OS, la modélisation est une étape indispensable. L'objectif est de reproduire la tumeur au plus près de la réalité clinique. Elle doit être reproductible, obtenue dans un délai court et permettre l'utilisation de drogues afin de réaliser des essais thérapeutiques. La tumeur doit présenter des caractéristiques d'OS comme l'expression de marqueurs de l'ostéogenèse et la production d'une matrice ostéoïde. Elle doit également présenter une évolution naturelle vers la dissémination métastatique pulmonaire (76). La modélisation doit permettre de mieux connaître la tumeur et ses mécanismes de développement. L'origine et la pathogénie de l'OS étant mal connues, il est difficile d'obtenir un modèle reproduisant formellement cette pathogénie.



Les modèles canins ont l'avantage d'être très proche des OS humains tant sur le plan morphologique que biologique. Par ailleurs, l'OS survient de manière sporadique comme chez l'Homme. Toutefois, les OS canins concernent les chiens d'âge avancé. Ils concernent des chiens de race donc avec une sélection génétique importante entraînant des biais. Ces modèles ont également un coût important et une disponibilité moins importante par rapport aux modèles murins.

Les modèles d'OS de souris ont été largement étudiés. Par des procédés d'irradiation ou d'exposition à des agents chimiques, des OS secondaires peuvent être obtenus. L'origine secondaire de ces OS rend le modèle moins attrayant du fait du caractère non primaire. Différents modes d'obtention d'OS primaires ont été expérimentés. Les modèles murins s'approchant au plus près de l'histoire naturelle de l'OS sont l'utilisation de souris génétiquement modifiées. La délétion ou l'extinction de *P53* est indispensable pour la survenue d'OS, alors que celle de *RB* ne l'est pas. La délétion hétérozygote de *P53* dans les cellules germinales entraîne la formation spontanée d'OS dans 25% des souris. La délétion homozygote est à l'origine d'une mortalité importante et de la survenue de lymphomes précoces essentiellement. Les délétions homozygote de *P53* et monoallélique de *RB* entraînent l'apparition d'OS quasiment systématiquement (92%). Toutefois, l'inconvénient d'une mutation germinale est le risque de développement d'autres pathologies cancéreuses. Afin d'éviter ce risque, il a été proposé d'éteindre ou réaliser une délétion de *P53* uniquement dans les cellules exprimant un marqueur de progéniteur ostéoblastique (*Ostérix*), ce qui permet d'obtenir la formation spontanée d'OS. A la différence de *P53*, l'extinction de *RB* dans les progéniteurs mésenchymateux n'entraînent pas la formation d'OS (73).

Etudier l'OS murin permet d'avoir des éléments d'orientation sur l'origine de l'OS mais il persiste la barrière de l'espèce. Les processus de cancérogénèse ne sont pas parfaitement superposables entre la souris et l'Homme. L'étude de la cancérogénèse de l'OS humain *in vivo* est donc nécessairement faite chez l'animal qui fera office de « bioréacteur » même s'il persiste le problème de l'environnement tumoral qui est un élément important. En effet, le microenvironnement de la tumeur n'interagira pas de manière syngénique avec cette dernière.

8.2 Modélisation de la tumeur

Afin d'étudier plus spécifiquement l'OS humain une fois constitué, pour tester un traitement par exemple, des modèles de tumeurs d'origine humaine sont nécessaires. Pour cela, des lignées d'OS humains ont été décrites et 12 sont disponibles à l'ATCC (American Type Cell Collection). Seulement toutes ne sont pas tumorigènes *in vivo*. Par exemple, la lignée CAL72 décrite en 1999 par Rochet *et al* (77) présente les caractéristiques d'une population tumorale ostéosarcomateuse *in vitro* avec notamment l'instabilité chromosomique caractéristique de l'OS, mais n'est pas tumorigène *in vivo* (Figure 14).

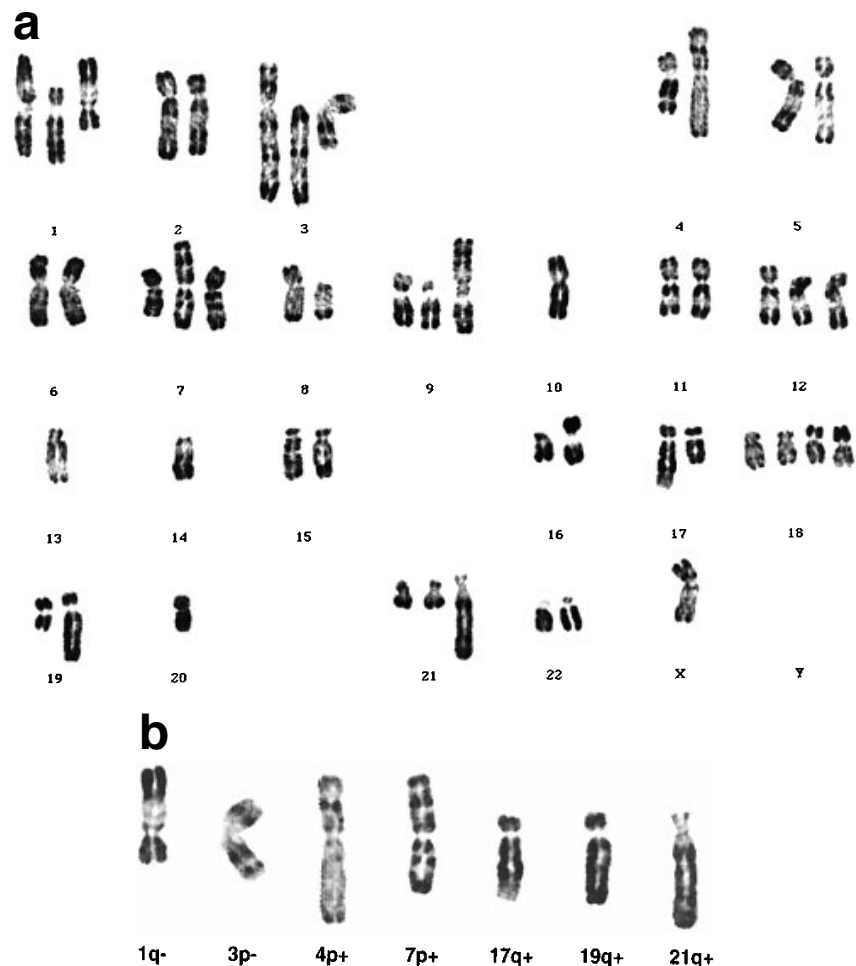


Figure 14 : caryotype de la lignée d'ostéosarcome humain CAL 72. Tiré de Rochet *et al*, 1999 (77).

Il en est de même pour la lignée HOS : cette lignée a requis une transformation soit virale soit chimique afin d'être tumorigène chez la souris (nous en parlerons au chapitre Matériel et Méthode). Nous utilisons couramment le modèle de tumeur induite par la lignée MNNG-HOS (lignée HOS rendue tumorigène par l'agent chimique MNNG) injectée à la souris Nude, en para tibial avec avivement périosté lors de l'injection. Ce modèle a l'avantage d'être reproductible et d'entraîner, outre la formation d'une tumeur au site d'injection, la formation de métastases pulmonaires. Le problème est qu'il n'y a pas de formation de matrice ostéoïde au sein de la tumeur (Figure 15). Il s'agit là d'un problème important puisque cette matrice est nécessaire au diagnostic d'OS. Dans la littérature, cet élément est bien souvent mal ou pas renseigné.

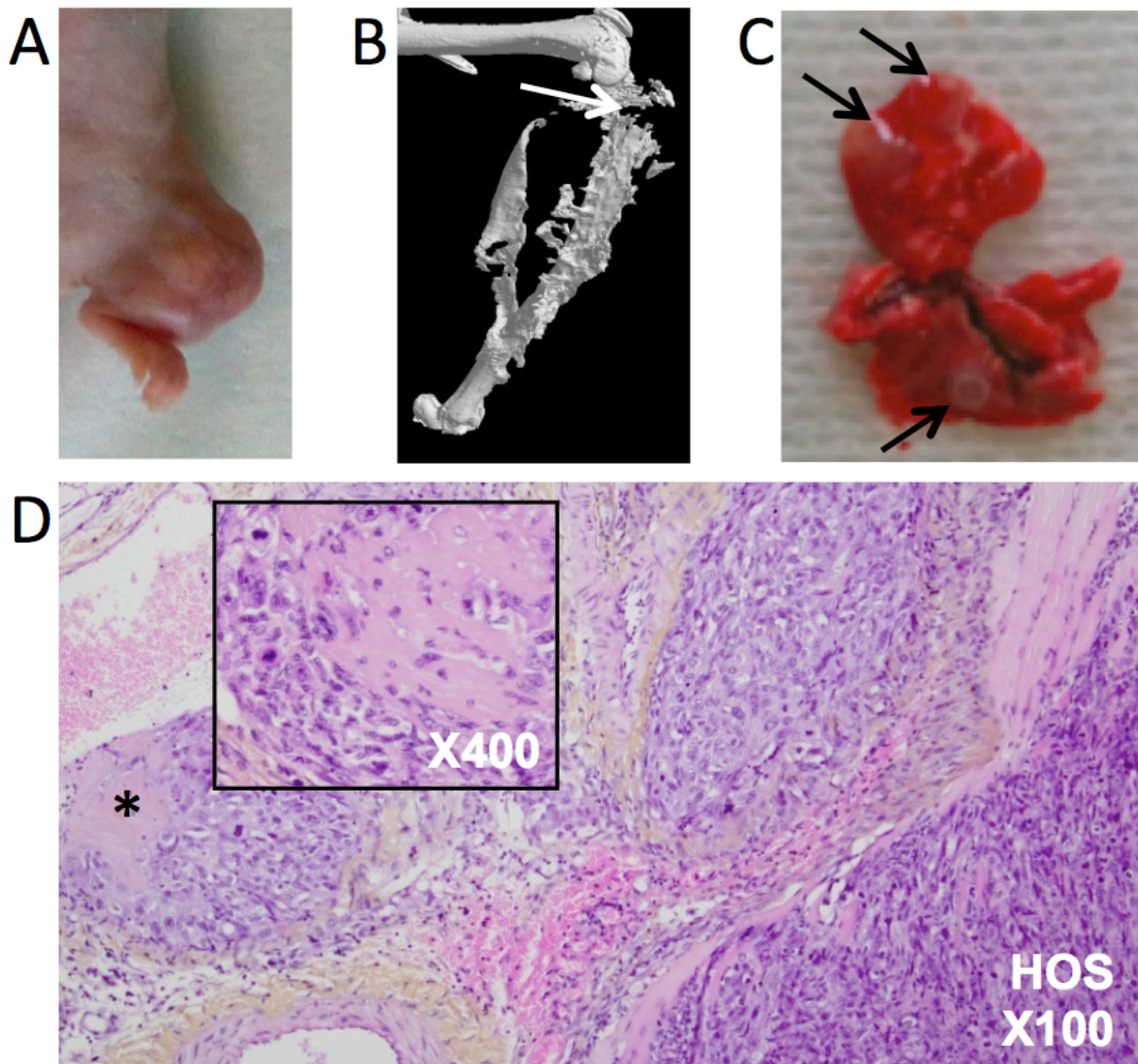



Figure 15 : modèle d'OS induit chez la souris Nude par l'injection para tibiale de 10^6 cellules de la lignée d'OS humain MMNG-HOS. (A) Photographie de la patte postérieure gauche, avec le développement tumoral. (B) Reconstruction tridimensionnelle après réalisation d'un



microscanner montrant l'ostéolyse du tibia et du péroné induite par la tumeur. (C) Photographie des poumons montrant des métastases pulmonaires (flèches noires). (D) Coupe histologique avec coloration Hématoxyline, Eosine et Safran (HES) montrant des plages de tumeur de type sarcome avec grandissement d'un embolie vasculaire (astérisque) associé à des dépôts de fibrine et non à une matrice ostéoïde.

9. Conclusion

L'OS est une tumeur très complexe. Il présente différents aspects morphologiques et est donc difficile à appréhender de ce fait. Les éléments clés du diagnostic sont la production de matrice ostéoïde par des cellules sarcomateuses et la présence de remaniements cytogénétiques systématiques et très complexes. Le mécanisme de cancérogenèse n'est pas élucidé à ce jour. Il est difficile à modéliser de ce fait.



INTRODUCTION

PARTIE III :

CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

1. Définition

1.1 Définition théorique

En 2006, un groupe d'experts a statué sur la définition d'une cellule souche cancéreuse (CSC) (78): il s'agit d'une cellule maligne qui a une capacité d'auto renouvellement d'une part et une capacité à former les différents lignages de cellules cancéreuses qui constituent la tumeur d'autre part. Une attention spéciale avait été portée sur le fait que la prolifération n'était pas synonyme d'auto renouvellement : les CSC ont des capacités de division symétrique en deux CSC mais également asymétrique avec une cellule conservant des capacités souches et l'autre s'engageant dans un processus de différenciation pour former la tumeur.

D'autre part, une CSC pourrait se développer à partir d'une cellule souche normale mais également à partir d'une cellule plus différenciée qui aurait accumulé des mutations et/ou des changements de phénotype lui conférant des capacités de cellule souche.

1.2 Définition pratique

Kreso et Dick ont apporté un 3^{ème} élément indispensable à la définition des CSC, en plus du caractère souche et de celui de former l'ensemble de la tumeur : il s'agit de la possibilité de purifier et d'isoler ces cellules (79). Pour faire la preuve de la présence de CSC, la tumorigénicité objectivée chez la souris SCID est requise. Kreso et Dick ajoutent qu'il est nécessaire d'avoir des épreuves de repopulation clonale *in vivo* en série.

Cependant plusieurs limites existent : d'une part, certains facteurs de croissance murins ne sont parfois pas efficaces sur des cellules humaines (80). D'autre part, l'isolement des CSC peut être difficile, toutes les manipulations *ex vivo* étant très éloignées des conditions réelles *in vivo*; les cellules doivent donc survivre à toutes ces manipulations et conditions de culture. Enfin, les cellules isolées sont injectées sans leur microenvironnement propre. Ainsi, de réelles CSC peuvent ne pas être mise en évidence et caractérisées du fait de ces limites (81).

2. Différents modèles

Afin d'illustrer le mode de développement d'une tumeur maligne, deux modèles ont été proposés (Figure 16).

2.1 Le modèle hiérarchique

Le modèle de développement embryonnaire des tissus normaux est transposé au processus de développement tumoral hiérarchique: par divisions asymétriques, la CSC garde ses capacités de cellule souche et parallèlement donne naissance aux différents lignages de la tumeur, sans que ces cellules engagées n'aient de capacité « souche ». Afin de prouver qu'une tumeur se développe sur un modèle hiérarchique, il est nécessaire de prouver qu'elle est formée de cellules fonctionnellement distinctes qui peuvent être isolées et quantifiées (79).

2.2 Le modèle stochastique

Dans ce modèle, la tumeur est biologiquement homogène. Toutes les cellules ont la possibilité d'être des CSC. Certaines cellules deviendraient des CSC soit par des facteurs intrinsèques (voies de signalisation par exemple), soit par des facteurs extrinsèques (microenvironnement, réponse immunitaire par exemple). L'hétérogénéité fonctionnelle serait induite par des comportements aléatoires de chaque cellule au sein de la tumeur. L'isolement et l'enrichissement en CSC d'une population tumorale ne serait donc pas réalisable dans ce modèle (81).

A titre d'exemple, à partir de lignées cellulaires de cancer du sein, Gupta *et al.* en 2011 ont démontré qu'il existait des sous populations différenciées, toutes capables de reformer l'ensemble de la tumeur (82).

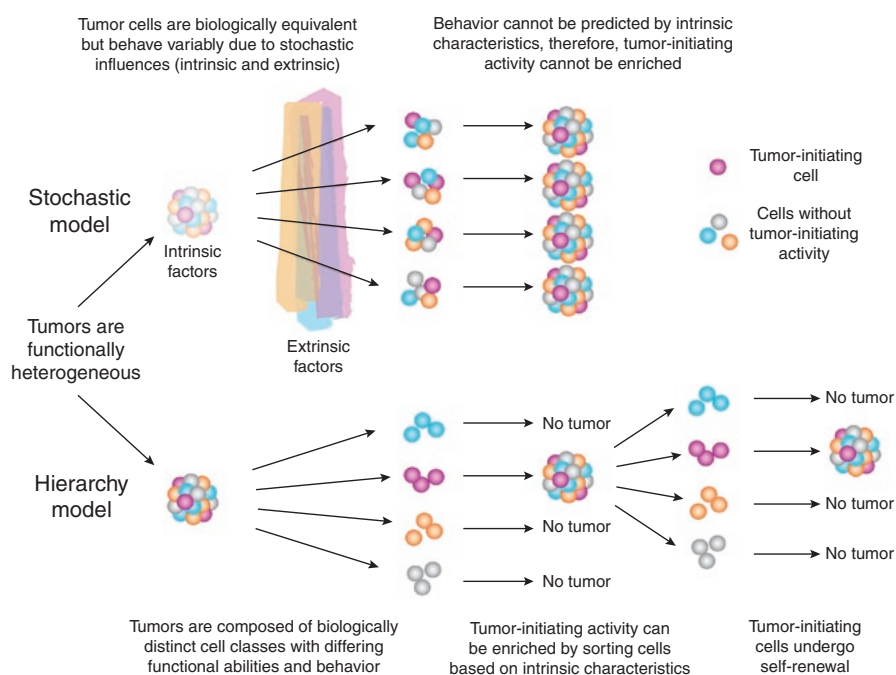


Figure 16 : représentation des deux modèles de compréhension des cellules souches cancéreuses (CSC) : le modèle stochastique en haut où les cellules tumorales sont toutes similaires. Ce sont des facteurs intrinsèques et extrinsèques qui vont être à l'origine des CSC. Le modèle hiérarchique, en bas, où la tumeur contient un petit contingent de CSC dès l'origine de la tumeur, biologiquement distinct des autres cellules tumorales, et qui présente la capacité de reformer l'ensemble de la tumeur.

Tiré de Dick, 2009 (81).

2.3 Synthèse

Le concept de CSC est en fait connu depuis 1937 et est revenu au premier plan depuis les années 1990 (83). En réalité, les différents mécanismes pourraient être intriqués, le tout dans une dynamique évolutive rapide, avec une pression de sélection notamment par le système immunitaire de l'hôte et les traitements en cours (Figure 17).

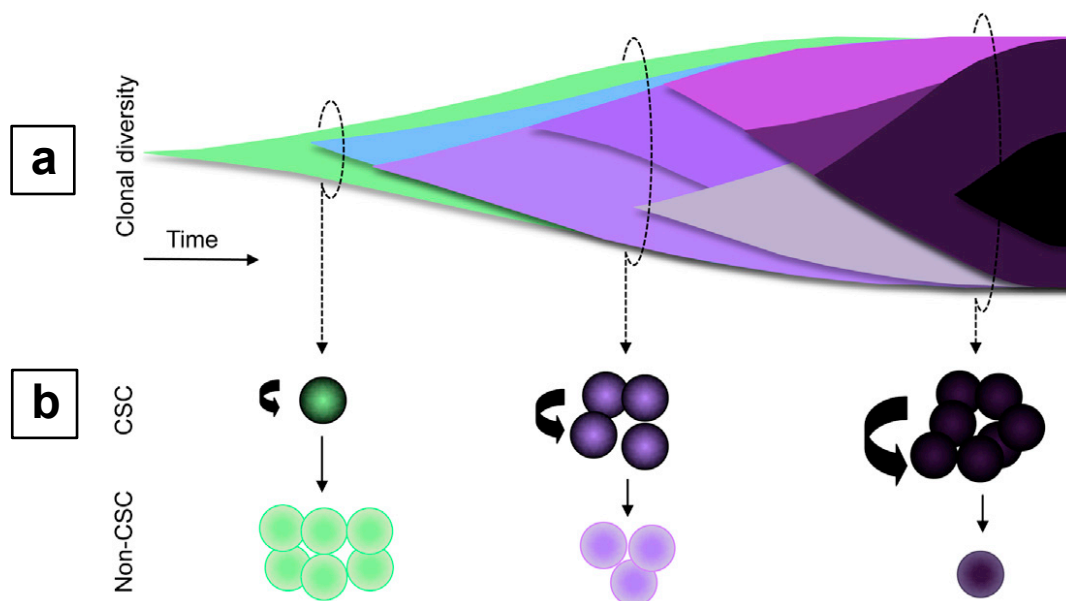


Figure 17 : représentation unifiée du modèle d'évolution clonale des CSC. D'après Kreso & Dick, 2014 (79).

(a) Acquisition d'une mutation favorisant l'apparition d'un clone correspondant à la cellule souche cancéreuse fondamentale. En parallèle, une autre cellule peut acquérir une mutation différente lui permettant de devenir un nouveau sous clone. Avec le temps, les mutations génétiques s'accumulent et les sous clones évoluent en parallèle.

(b) Les CSC ne seraient pas des entités statiques mais pourraient évoluer au cours de l'histoire naturelle de la tumeur tout comme des modifications génétiques pourraient influencer la fréquence des CSC. Certains sous clones pourraient avoir un comportement hiérarchique où il n'existerait que quelques CSC au sein d'une large majorité de cellules tumorales non CSC (à gauche). Certains autres sous clones pourraient avoir un comportement hiérarchique intermédiaire où le nombre de CSC serait relativement important, mais évoluant toujours sur le mode hiérarchique (milieu). Certains sous clones auraient des mutations génétiques qui leur confèreraient un potentiel d'auto renouvellement élevé, et la majorité des cellules seraient

tumorigènes. Dans ce contexte, l'application du concept de CSC à de tels sous clones homogènes ne serait pas approprié car la majorité des cellules présenteraient des capacités d'auto renouvellement et peu d'entre elles génèreraient des cellules tumorales non CSC.

3. Techniques d'isolement de CSC dans l'OS

Afin de pouvoir parler de CSC, il est nécessaire de les isoler et de les caractériser. Dans le cadre de l'OS, différentes techniques sont rapportées (79)(84).

3.1 Marqueurs de surface

L'utilisation des marqueurs de surface est la technique la plus couramment utilisée. Elle s'appuie sur un tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre de flux. Tirino *et al.* ont résumé les marqueurs individualisés dans la littérature pour certains cancers solides (Figure 18) (84).

Tumor type	CSC phenotype
Breast cancer	CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} , spheres
Glioblastoma	CD133 ⁺ , spheres
Melanoma	CD20 ⁺ , spheres
Prostate cancer	CD44 ⁺ /α ₂ β ₁ ^{hi} /CD133 ⁺ , spheres
Ovarian cancer	SP ⁺ , spheres
Gastric cancer	CD44 ⁺ , SP ⁺
Lung cancer	CD133 ⁺ , SP ⁺ , spheres
HNSCC	SP ⁺ , CD44 ⁺
Osteosarcoma	CD133 ⁺ , CD117 ⁺ , Stro-1 ⁺ , SP ⁺ , ALDH ⁺ , spheres
Chondrosarcoma	CD133 ⁺ , SP ⁺ , spheres
Synovial sarcoma	CD133 ⁺
Ewing's sarcoma	CD133 ⁺ , ALDH ⁺
Rhabdomyosarcoma	CD133 ⁺
Mesenchymal neoplasms	SP ⁺

Figure 18: Phénotype des CSC dans différents cancers humains solides. A2β1 : intégrine impliquée dans l'adhésion cellulaire, ALDH : aldéhyde déshydrogénase, SP : Side Population. Tiré de Tirino *et al.* 2013 (84).


En ce qui concerne l'OS, plusieurs marqueurs ont été étudiés.

3.1.1. CD117 associé à Stro1

Le CD117 appelé également cKit ou Stem Cell Growth Factor Receptor (SCFR) est un marqueur de cellule hématopoïétique, tandis que STRO-1 correspond à un marqueur de CSM. Adhikari *et al.* ont mis en évidence une sous population double positive pour ces 2 marqueurs, présentant les critères de CSC dans différentes lignées cellulaires d'OS humains, mais également dans une lignée appelée BCOS qu'ils ont isolées à partir d'un OS (85). Les cellules doubles positives de cette population BCOS représentaient moins de 5% de la population cellulaire globale. Elles avaient la capacité de former des sphères en culture tridimensionnelle, ce qui serait un élément en faveur d'authentiques CSC (voir la partie II de l'introduction, chapitre 3.3 Techniques de culture). De plus seulement 1000 cellules étaient capable de former une tumeur chez la souris immunodéprimée, tout comme la lignée MNNG-HOS double positive pour CD117 et STRO1. A noter que l'injection de 500 cellules de la lignée KHOS double positive permettait l'obtention d'une tumeur. Toutefois aucun renseignement sur la méthode d'obtention, l'analyse cytogénétique, morphologique, fonctionnelle n'est rapportée pour ces cellules BCOS dérivées d'un OS de haut grade du radius qui correspond à une localisation atypique. D'autre part aucune information n'est également présentée concernant le type d'ostéosarcome (sarcome indifférencié ou OS ostéoblastique, fibroblastique ou chondroblastique) développé chez la souris.

3.1.2. CD133

Il s'agit d'une protéine transmembranaire exprimée entre autre par les cellules souches hématopoïétiques (86). Dans des lignées d'OS humain, Tirino *et al.* ont mis en évidence une sous population inférieure à 8% de la population globale exprimant le CD133 qui présentait des caractéristiques de CSC *in vitro* avec notamment la production de sphères, mais sans capacité à induire de croissance tumorale *in vivo* (87). Dans une étude qui faisait suite, l'absence de capacité à induire une croissance tumorale *in vivo* a aussi été observée pour 2 populations cellulaires dérivées de biopsies d'OS humains



(88). Dans une autre étude, Skoda *et al.* ne retrouvait pas ce caractère discriminant du CD133 pour sélectionner des CSC dans trois lignées d'OS dérivées de biopsies d'OS humain (89). Toutefois, il y a peu de renseignement sur ces trois lignées, dont une seule était tumorigène *in vivo*, notamment leur caractérisation cytogénétique n'a pas été réalisée ou présentée.

3.1.3. CD271

Il s'agit d'un marqueur de surface des CSM exprimé dans moins de 10% de cellules de lignées d'OS humains. Les cellules CD271+ présentaient des caractéristiques de CSC *in vitro* et *in vivo* (90). Cependant, aucune étude sur des prélèvements frais d'OS n'a été réalisée à l'aide de ce marqueur.

3.2 Isolement par une fonction de la cellule

Partant du concept que les CSC présentent des capacités de résistance à la chimiothérapie, un des mécanismes possibles pour cela est la présence de transporteurs transmembranaires d'efflux des drogues appelés ATP-binding cassette (ABC). En appliquant un agent intercalant coloré (Hoechst 33342) sur une population cellulaire puis une analyse au cytomètre de flux, une population cellulaire ayant évacué ce colorant peut être distinguée car faiblement marquée. Elle est appelée Side Population (SP)(84).

Cette technique a permis d'isoler des cellules dérivées de trois OS humains qui présentaient des critères de CSC mais de manière non discriminante, puisque les cellules non-SP étaient également tumorigènes *in vivo* même si elles l'étaient deux fois moins que les cellules SP (91). Dans cette étude, il avait été montré que les cellules SP présentaient une expression plus importante du gène de la protéine d'efflux ABCG2. Toutefois, dans une autre étude, le marqueur ABCG2 n'était pas associé à la tumorigénicité de lignées primaires dérivées de trois OS humains (89).

3.3 Techniques de culture

Les cellules d'origine mésenchymateuses croissent *in vitro* en condition d'adhérence au plastique.

En 2005, Gibbs *et al.* ont transposé aux sarcomes osseux la technique d'isolement des CSC d'origine neuro ectodermique décrite par Reynolds *et al.* en 1992 (92)(93). Cette technique s'appuie sur le potentiel de croissance de certaines cellules, en l'absence de possibilité d'adhérence et de sérum. Ainsi, à partir de lignées d'OS humain (MG63), ils ont isolé des cellules qui ne différaient pas des autres cellules sur le plan morphologique, mais qui étaient capables de former des sphères dans ce milieu de culture semi-solide et qui exprimaient des gènes « souches » tels que *NANOG*, *OCT3/4*.

A partir de ces travaux, plusieurs équipes ont travaillé en utilisant cette technique sur des lignées d'OS humains (87)(94). A partir de biopsies d'OS humains, seulement une équipe a pu établir une lignée tumorigène *in vivo* : Adhikari *et al.* ont utilisé cette technique de sélection par la culture avant de réaliser un tri cellulaire sur la base du double marquage CD117 et STRO-1 afin d'isoler la lignée BCOS (85). Cependant, les anomalies génomiques sont prépondérantes dans l'OS qui est une maladie à génétique complexe et il n'est pas fait mention d'analyses cytogénétiques pour la lignée BCOS.

Il est à noter que cette technique de culture induit un changement de phénotype des cellules en croissance avec l'expression de gènes « souches » comme nous l'avons précédemment montré (Figure 19)(37).

Aussi, il est nécessaire de garder une certaine prudence dans l'analyse de l'expression de ces gènes « souches » en fonction du type de culture. Ces éléments rejoignent les conclusions de Brune *et al.* qui ont tenté d'isoler des lignées d'OS à partir de 6 biopsies d'OS par cette technique, sans succès. Ils arrivaient à la conclusion que cette technique permettait d'isoler des CSM et non des CSC. Cependant, dans cette même étude, une population cellulaire sur les 6 analysées présentait des remaniements chromosomiques majeurs tant numériques que structurels (95).

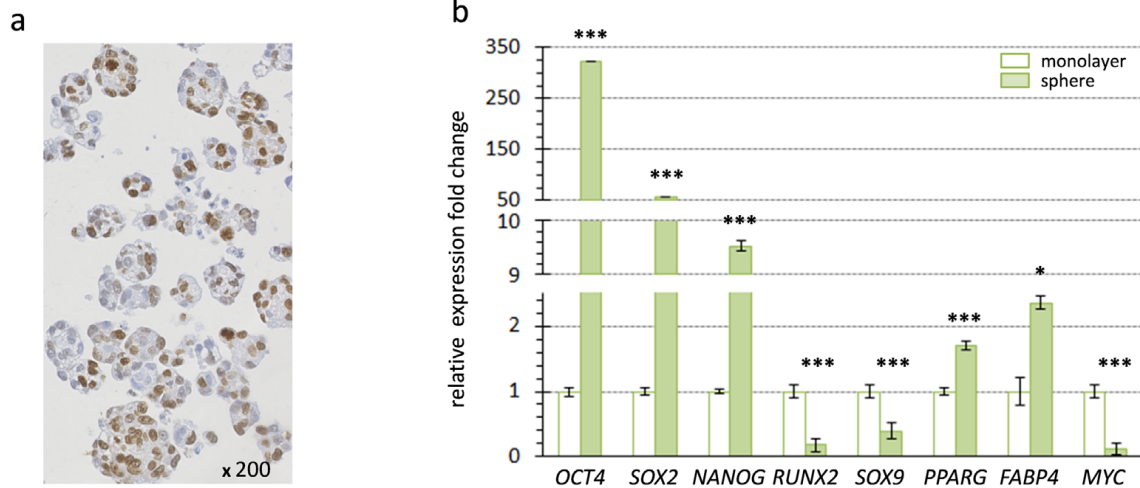


Figure 19 : illustration du changement de phénotype induit par la technique de culture cellulaire. (a) Culture de la lignée d'ostéosarcome MNNG-HOS en conditions de croissance sans adhérence, avec détection du Ki-67 par immunohistochimie. Seulement 50% des cellules sont en cours de multiplication alors qu'en culture avec adhérence, 90% de ces cellules sont en division. (b) Analyse en transcription inverse et PCR quantitative de l'expression de gènes « souche » (*OCT4*, *SOX2* et *NANOG*) et de gènes d'engagement dans les voies ostéoblastique (*RUNX2*), chondrocytaire (*SOX9*) et adipocytaire (*PPARG* et *FABP4*) exprimés par la lignée MNNG-HOS en culture en conditions d'adhérence et en culture sans adhérence. Les conditions de culture sans adhérence induisent l'expression de gènes « souche », la diminution de l'expression de gènes exprimés dans les lignages de différenciation ostéoblastique et chondrocytaire, témoignant d'un changement de phénotype d'une cellule à un stade de début de différenciation à un stade de cellule plus indifférenciée. Tiré de Avril *et al*, 2016 (37).

3.4 Aspect morphologique

Certaines équipes proposent l'isolement de cellules tumorales ostéosarcomateuses sur le seul critère morphologique, en éliminant les cellules « fibroblasts like » en cultures adhérentes au plastique. Péreira *et al.* ont ainsi pu isoler une lignée d'OS, avec la confirmation d'un caryotype très anormal (Figure 20), et Yang *et al.* ont pu en isoler trois, sans confirmation du caryotypique réarrangé, mais avec la confirmation de la tumorigénicité *in vivo* pour les deux études (91)(96).

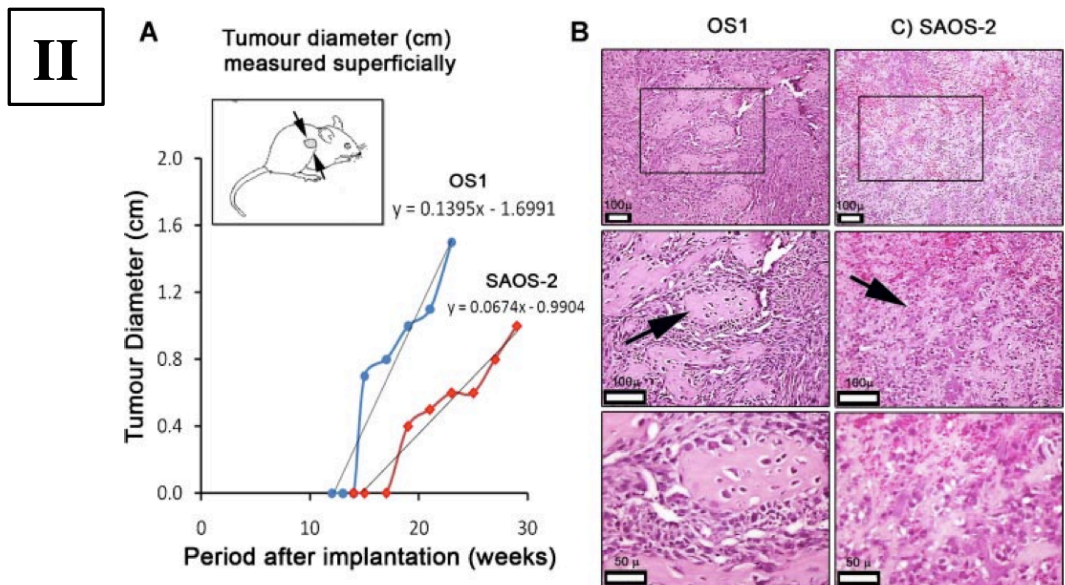
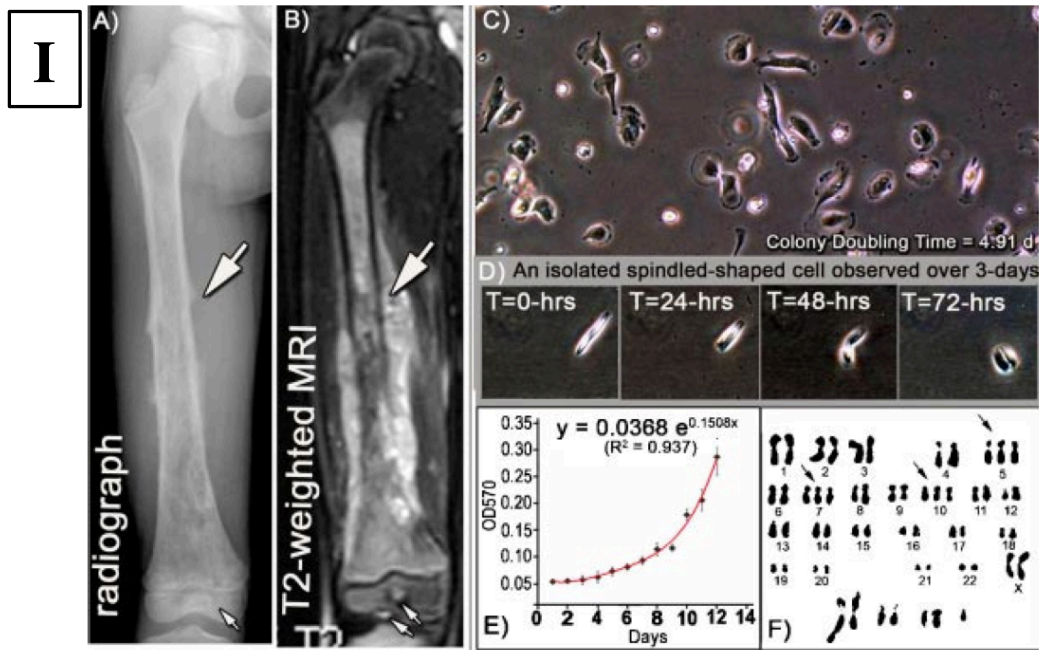


Figure 20 : Caractérisation de la lignée OS1.

I: OS1 dérive d'un ostéosarcome du fémur (A et B). Les cellules primaires issues de la biopsie étaient adhérentes en culture (C). Photographie de cellules tumorales représentatives de la lignée isolée (D). Après 50 passages, présence d'une courbe de croissance exponentielle de la lignée OS1 avec un temps de doublement de 4,9 jours (E). Photographie d'un caryotype de cellules OS1 montrant de multiples anomalies numériques et morphologiques chromosomiques, très caractéristiques de l'OS (F).

II: (A) L'injection sous cutanée de cellules de la lignée OS1 chez la souris SCID permettait l'obtention d'une tumeur qui présente les caractéristiques d'un OS (B) avec la formation d'une matrice ostéoïde, retrouvée également avec la lignée d'OS humain SAOS-2 (C). Coloration Hématoxyline Eosine. Tiré de Pereira *et al*, 2009 (96).

3.5 Adhérence au plastique


Enfin, une équipe rapporte la sélection d'une lignée d'OS uniquement en cultivant les cellules adhérentes issues d'un fragment de biopsie. A partir de 4 biopsies en culture, en posant la tumeur sur le plastique de la flasque avec un milieu de culture standard et en cultivant ensuite les cellules adhérentes qui en provenaient, une lignée avait été obtenue (OSA-13) qui était tumorigène (89)(97). Toutefois aucune données concernant d'éventuelles analyses cytogénétiques ni de recherche d'une matrice ostéoïde sécrétée *in vivo* ne sont disponibles.

4. Synthèse – Implications

Il existe un intérêt croissant pour la découverte, l'identification et la caractérisation des CSC. En effet, elles sont potentiellement à l'origine de la résistance aux traitements et de l'évolution métastatique. Ainsi, l'intérêt de la découverte de l'existence de CSC permettrait de rechercher des marqueurs spécifiques qui pourraient faire l'objet de thérapies ciblées et ainsi diminuer le risque de récurrence locale tardive et d'évolution métastatique.

Il existe une grande variabilité entre les différents cancers. Les CSC ont été largement étudiées dans les carcinomes. Dans la cancérogenèse épithéliale, les cellules doivent réaliser une transition épithélio-mésenchymateuse afin de pouvoir franchir la membrane basale et diffuser dans le chorion puis rejoindre les capillaires. Pour ce faire, les cellules épithéliales rompent les jonctions intercellulaires. Elles perdent également leur polarité et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses (98)(99). Cette transition n'est pas nécessaire dans les sarcomes qui sont des tumeurs d'origine mésenchymateuse. Il est donc nécessaire de rester prudent sur les généralisations de techniques d'isolement de CSC. Nous nous sommes ainsi uniquement intéressés aux techniques d'isolement qui concernent l'OS.

La définition des CSC est stricte : il s'agit de cellules avec des capacités « souches » d'une part et capables de reformer l'intégralité de la tumeur, d'autre part. Leur définition comprend également la possibilité de les isoler, les purifier et de tester



leur tumorigénicité *in vivo*. En cas d'absence de tumorigénicité *in vivo*, le terme de cellules initiatrices de la tumeur ou Tumor Initiating Cells (TIC) serait recommandé (79). Cependant, ce terme ne nous semble pas adapté car il ne nous semble pas possible de parler de TIC au sujet de cellules non tumorigène. Afin d'isoler et caractériser des CSC, différentes manipulations et techniques de sélection *ex vivo* sont nécessaires. Elles peuvent être à l'origine de la perte de CSC (par exemple le colorant Hoechst (78)), ou à l'origine d'un changement ou d'une sélection de certains phénotypes, avec les cultures sans adhérence par exemple. Du fait des différences entre la souris et l'Homme, la preuve de la tumorigénicité d'authentiques CSC ne pourra potentiellement pas être réalisable *in vivo*. On ne peut également pas concevoir une évolution des CSC sans l'environnement avec des échanges et modifications réciproques entre la CSC, la tumeur et l'hôte (100).

Il existe donc de nombreux obstacles pour isoler et caractériser d'authentiques CSC mais nous n'avons pas d'autre choix à l'heure actuelle.



PROBLEMATIQUES

L'ostéosarcome est une tumeur osseuse maligne complexe tant sur sa présentation, que sur les différents aspects histologiques qu'il peut revêtir, que sur les anomalies cytogénétiques qu'il présente. Il s'agit également d'une maladie rare et grave.

Afin de progresser dans la connaissance de l'ostéosarcome, tout particulièrement sur son origine et son processus de cancérogenèse, nous avons privilégié une étude de cellules qui dérivent de la tumeur fraîche et non l'étude de lignées d'OS, potentiellement plus « éloignées » de la tumeur initiale dont elles émanent.

La cellule souche stromale/mésenchymateuse étant très vraisemblablement à l'origine de l'ostéosarcome, nous avons souhaité utiliser comme outil de comparaison aux cellules dérivées d'ostéosarcomes (CDOS), les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse des mêmes patients (CSMMO) afin d'avoir un témoin intra patient. Nous avons donc choisi de comparer les CDOS aux propres CSMMO des patients.

Notre première problématique était de savoir si les cellules dérivées d'OS étaient des cellules stromales, issues du microenvironnement tumoral.

Notre deuxième problématique était de savoir si les cellules dérivées d'OS ne pouvaient pas être d'authentiques cellules souches cancéreuses ou des cellules souches à un stade précoce de la cancérogenèse.

MATERIEL ET METHODE

1. Matériel d'étude

1.1 Cellules dérivées d'ostéosarcomes et cellules dérivées de moelle osseuse

1.1.1 Origine – modalités d'obtention

Après obtention du consentement écrit du malade et de ses représentants légaux s'il était mineur, nous avons pu prélever un échantillon tumoral pour 9 malades qui présentaient un OS conventionnel de haut grade et prélever 6 échantillons de moelle osseuse. Chaque prélèvement était dénommé par 3 lettres majuscules. Leurs caractéristiques ainsi que celles de chaque prélèvement sont rapportées dans le Tableau 2. Tous les malades ont été pris en charge dans le Service de Chirurgie Orthopédique Adulte à l'Hôpital Trousseau du CHU de Tours s'ils avaient 15 ans et plus et dans le Service de Chirurgie Orthopédique Pédiatrique de l'Hôpital Gatien de Clocheville du CHU de Tours s'ils avaient moins de 15 ans.

Tableau 2 : renseignements cliniques et présentation de l'origine du matériel d'étude (M : masculin, F : féminin, OB : ostéoblastique, CH : chondroblastique, F : fibroblastique, T : télangiectasique, DOD : died of disease (décédé de la maladie), pulm : pulmonaire, Amp : amputation, cons de mb : conservation de membre, NA : non applicable, chimio : chimiothérapie)

NOM	DEL	BAR	DIA	LEG	BAY	RAV	SAG	PIN	JUL
Âge (années)	21	18	16	23	18	30	36	14	14
Sexe	F	M	M	M	M	F	M	M	M
Localisation	Humérus proximal	Fémur distal	Fémur distal	Tibia distal	Tibia proximal	Bassin	Fémur distal	Tibia proximal	Fibula proximale
Année du diagnostic	2007	2010	2010	2014	2015	2014	2015	2015	2015
Type histologique	F	OB, CH, F	OB	OB	OB, CH, F	CH	OB, CH	OB	OB, T
Métastases au diagnostic	Oui sous pleurale	non	non	Non	Oui	Non	Non		Non
Type de chirurgie	Cons de mb	Amp	Cons de mb	Amp	Cons de mb	Cons de mb	Cons de mb	Cons de mb	Cons de mb
Réponse à la chimio (% cellules viables)	BR 6%	MR 55%	BR 7%	MR 20%	BR <1%	MR 30%	BR 8%	MR 52%	MR 11%
Evolution	Récidive locale	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
	Apparition de métastases	Oui (pulm)	Oui (pulm)	Oui (pulm)	Oui (pulm)	Non	Oui (pulm)	Non	Non
Recul maximum (années)	NA	NA	5	NA	2	2	2	2,3	1,5
Etat au dernier recul	DOD	DOD	Vivant avec métastases	DOD	Vivant sans maladie	Vivant avec métastases	Vivant sans maladie	Vivant	Vivant sans maladie
Prélèvement pour l'étude	Zone	F	F	OB	OB	OB, CH, F	CH	CH	OB
	Avant/après chimio	Après	Après	Après	Après	Après	Avant	Après	Après
Prélèvement de moelle osseuse		Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
	Avant/après chimio		Avant	Après	Après	Avant	Avant	Avant	

1.1.2 Prélèvement tumoral

1.1.2.1 Conditionnement initial

Lorsque le prélèvement tumoral était réalisé lors de la biopsie chirurgicale, un fragment de la biopsie était conservé et conditionné de manière stérile au bloc opératoire. S'il était réalisé sur la pièce de résection, cette dernière était conditionnée stérilement puis apportée au Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Tours. La pièce était orientée et analysée avec le Pathologiste, puis un prélèvement était réalisé dans des conditions stériles par une voie d'abord qui ne compromettait pas l'analyse ultérieure de la pièce. Dans le cas des patients PIN et DIA, la pièce a d'abord été sciée dans le plan frontal, lavée à l'eau du robinet puis le prélèvement a été réalisé en endomédyllaire par la tranche de section.

Le prélèvement était ensuite fragmenté en copeaux infra centimétriques au bistouri et conditionné dans un milieu.

1.1.2.2 Traitement du prélèvement

Les caractéristiques de chaque prélèvement et de leur prise en charge sont résumées dans le Tableau 3.

- Pour les patients DEL, BAR et DIA, les échantillons ont été pris en charge dans les 12 heures qui ont suivi le prélèvement. Ils ont été transportés à 4°C jusqu'au Laboratoire dans un Falcon 15 mL contenant du milieu α MEM, de la Pénicilline 1% et de la Streptomycine 1%. Puis les échantillons, à l'exception de DEL, étaient traités par de la Collagénase I (InVitrogen, Fisher Bio Block Scientific, Illkirch, France) pendant 1 à 4 heures, en fonction de la consistance du prélèvement, à l'incubateur, en l'agitant régulièrement. Puis le tube était centrifugé à 600 G pendant 5 minutes et un comptage des cellules nucléées était réalisé. Les cellules étaient ensuite mises en culture dans un milieu liquide standard ou en milieu semi solide que nous détaillerons plus bas.

- Pour les patients LEG, RAV et SAG, le prélèvement a été introduit dans un Falcon 15 mL sur glace contenant un mélange de sérum de veau fœtal (SVF 90%) et de

Diméthylsulfoxyde (DMSO 10%) puis congelé dans les 10 minutes qui suivaient à -80°C, et enfin acheminé au Laboratoire dans les jours ou semaines suivants en carboglace.

- Pour les patients PIN, JUL, BAY, le prélèvement était introduit dans un Falcon 15 mL contenant un milieu de conservation (MACS Tissue Storage Solution, Miltenyi Biotech). Il était acheminé au Laboratoire à 4°C dans les 24 à 48 heures (jusqu'à 72 heures) puis dissocié avec un mélange d'enzymes (MACS tumor dissociation kit human, Miltenyi Biotech). Les fragments tumoraux étaient recoupés en échantillons de 2 à 4 mm puis traités par le mélange d'enzymes et dissociées dans l'appareil GentleMACS à 37°C pendant 1 heure. Le contenu était ensuite filtré sur un tamis avec des pores de 70 µm, puis centrifugé 5 min à 1500 tours/min. Les globules rouges étaient lysés et les cellules mises en culture dans un milieu liquide standard ou en milieu semi solide.

Tableau 3 : caractéristiques de la prise en charge de chaque prélèvement d'ostéosarcome

Nom	DEL	BAR	DIA	LEG	BAY	RAV	SAG	PIN	JUL
Date prélèvement	7/1/2008	30/11/10	13/7/10	3/9/14	9/9/15	30/9/14	9/7/15	21/7/15	8/1/16
Date de prise en charge	<12h	<12h	<12h	19/11/14 17/7/15	11/9/15	19/11/14	17/7/15	23/7/15	11/1/16
Congélation intermédiaire	Non	Non	Non	Oui SVF 90% + DMSO 10%	Non	Oui SVF 90% + DMSO 10%	Oui SVF 90% + DMSO 10%	Non	Non
Traitement de l'échantillon	Non	Collagénase I 3h Agitation régulière	Collagénase I 3h Agitation régulière	Kit de dissociation Miltenyi Biotech	Kit de dissociation Miltenyi Biotech	Collagénase A 3h Agitation régulière	Kit de dissociation Miltenyi Biotech	Kit de dissociation Miltenyi Biotech	Kit de dissociation Miltenyi Biotech
Filtration	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Tris immédiat	Non	Non	Non	Non	Non	Non	ABCB5	ABCB5	Non
Culture	Flasque	Flasque	Flasque et ½ solide	Flasque et ½ solide	Flasque	Flasque et ½ solide	Flasque et ½ solide	Flasque et ½ solide	Flasque et ½ solide

Les cultures primaires de cellules dérivées d'OS étaient appelées « cellules dérivées d'ostéosarcomes » ou CDOS.

1.1.3 Prélèvement de moelle osseuse autologue

Les 6 prélèvements de moelle osseuse ont été prélevés et pris en charge selon la même technique. Un trocart de Jamshidi® 11 Gauges était introduit dans la crête iliaque postérieure ou antérieure, en fonction de la position du malade sur la table opératoire

lors de l'anesthésie générale. Environ 10 mL de moelle osseuse étaient prélevés à l'aide d'une seringue de 20 mL préalablement héparinée (1 à 2 mL). Afin de ne pas diluer le prélèvement par du sang veineux périphérique, la ponction était réalisée de manière douce en déplaçant régulièrement le trocart tout en conservant le même orifice de pénétration corticale. La seringue était ensuite agitée doucement et régulièrement et acheminée dans le même temps au Laboratoire de Microenvironnement de l'hématopoïèse des cellules souches à la Faculté de Médecine de Tours.

La moelle totale était initialement diluée au demi ou au quart avec du milieu de culture, puis filtrée sur tamis, rincée avec du milieu puis centrifugée 10 min à 1500 tr/min. Le surnageant était ensuite aspiré et la moelle diluée au 1/10^e dans le Lazarus (acide acétique et bleu de méthylène) pour lyser les hématies. Les cellules mononuclées étaient comptées puis la moelle mise en culture en flasque de culture de 150 cm² (Falcon®, BD Biosciences, VWR, Strasbourg, France) à 100 à 200 000 cellules/cm² dans du milieu Minimum Essential Medium alpha (αMEM sans ribonucléoside, inVitrogen), 1% (v/v) Pénicilline, 1% (v/v) streptomycine, 1% (v/v) glutamine (InVitrogen), 0,01% Fungizone (BMS, Rueil Malmaison, France) et 1 ng/mL de bêta-Fibroblaste Growth Factor 2 (bFGF2, AbCys, Paris, France). Le milieu était changé 2 fois par semaine jusqu'à confluence des Colony Forming Units Fibroblastics (CFU-F), ce qui représente environ 15 jours de culture. Puis les cellules étaient décollées à la Trypsine, comptées puis congelée avec 90% (v/v) de SVF (Perbio Hyclone, Logan, USA), DMSO 10%, en azote liquide.

Les cultures primaires de cellules dérivées de la moelle osseuse du bassin des malades ayant un OS inclus dans notre étude étaient appelées « cellules souches mésenchymateuse dérivées de moelle osseuse » ou CSMMO. Les CSM de patients sains n'avaient pas d'appellation propre.

1.2 Lignées d'ostéosarcome humain (MNNG-HOS)

Nous avons utilisé la lignée de cellules d'OS humain MNNG-HOS (CRL-1547) provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit de la lignée HOS transformée par le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. HOS était issue de la biopsie d'un OS ostéoblastique d'une jeune fille de 13 ans, décédée de la maladie. HOS a été

décrite en 1970 par McAllister *et al.* (101). Par l'action du MNNG, cette lignée est devenue tumorigène (102).

Nous l'appellerons HOS par simplification.

Pour l'utilisation de cellules HOS dans les modèles murins détaillés plus bas, une transduction lentivirale avait été réalisée pour intégrer de manière stable les gènes codant pour la protéine EGFP et l'enzyme luciférase. Ainsi, les cellules HOS présentaient une fluorescence spontanée analysable au microscope à fluorescence d'une part et une possibilité d'analyse *in vivo* par l'injection intra-péritonéale de luciférine d'autre part, dont la technique sera détaillée plus bas.

1.3 Modèles animaux murins

Toutes les manipulations *in vivo* ont été réalisées dans l'Unité de Thérapeutique Fondamentale de la Faculté de Médecine de Nantes. L'accord du comité d'éthique a préalablement été demandé et obtenu (CEEA-Pdl-06).

Une période de quarantaine d'une semaine était systématiquement observée avant toute manipulation. Toutes les manipulations autres que les mensurations du volume tumoral étaient réalisées sous anesthésie générale (inhalation d'isofurane 5%).

1.3.1 Modèle SCID

Afin de tester la tumorigénicité d'une population cellulaire, nous avons utilisé des souris femelles SCID (Severe Combined Immuno Deficiency – Laboratoire Charles River). Il s'agit d'animaux qui présentent une immunodéficienc e des lymphocytes T et B par la mutation du gène *Prkdc*.

Nous avons retenu un modèle d'injection (de 1 à 5 millions de cellules en phosphate buffered saline (PBS)) dans le coussinet d'une patte postérieure, qui permet de contenir les cellules et d'éviter leur diffusion (modèle testé dans le Laboratoire).

1.3.2 Modèle Nude

Pour tester l'effet d'une population cellulaire stromale sur la croissance tumorale, nous avons utilisé un modèle de co-injection chez la souris Nude (Laboratoire Janvier). Il s'agit de souris rendues athymiques par la mutation du gène *Foxn1* et qui, par conséquent, sont déficientes pour les lymphocytes T. Nous avons utilisé un modèle d'injection de la lignée HOS au contact du tibia (paratibial), en avivant le périoste diaphysaire tibial lors de l'injection par la loge antérieure de jambe. La lignée HOS est connue du laboratoire pour être tumorigène dans ce modèle. Lors de l'injection initiale, nous avons associé une population cellulaire stromale d'intérêt dans une proportion de 1 pour 2 cellules HOS. Des groupes de 8 animaux étaient réalisés pour chaque population cellulaire.

Les tumeurs étaient mesurées 3 fois par semaine au pied à coulisse. Les souris étaient sacrifiées par élongation cervicale sous anesthésie générale dès que le volume tumoral atteignait 2500 mm³.

1.3.3 Analyses

1.3.3.1 Tumeur

Pendant la phase de croissance tumorale, le volume tumoral (V en mm³) était calculé selon la formule suivante :

$$V = (l^2 \times L) / 2$$


où l et L en mm représentent respectivement le plus petit et le plus grand diamètre.

Lorsque les animaux étaient sacrifiés, les pattes tumorales étaient prélevées et radiographiées puis fixées en formol, puis décalcifiées et incluses en paraffine. Deux pattes non tumorales étaient conservées également pour réaliser le témoin.

A titre systématique, l'absence de métastases macroscopiques ganglionnaires iliaques homolatérales, hépatiques et spléniques était vérifiée.

1.3.3.2 Métastases pulmonaires

Trois techniques de quantification des métastases ont été utilisées.



La première était la quantification par bioluminescence. Les souris étaient anesthésiées et recevaient une injection intrapéritonéale de Luciférine D (10mg/mL) à la dose de 1 mg/g. L'euthanasie était réalisée 7 minutes plus tard, les poumons explantés rapidement puis la bioluminescence était analysées grâce à l'appareil NightOwl LB981 selon les paramètres suivants : filtre 560 nm, pixels de 12x12, exposition 2x1,5 minutes. Cette technique permettait d'individualiser les métastases mais également d'évaluer le volume métastatique par la quantification du nombre de coups.

La seconde était un comptage macroscopique des métastases pulmonaires puis fixation en formol puis inclusion en paraffine.

La troisième était la quantification histologique, après coloration à l'Hématoxyline Eosine, sur 3 niveaux de coupes différents de manière à avoir une représentativité de l'envahissement pulmonaire.

2. Cultures cellulaires

Toutes les cellules étaient cultivées à l'étuve à 37°C en conditions de normoxie (20% dioxygène), 5% de dioxyde de carbone, en flasques plastiques.

2.1 *Standard*

Pour l'entretien et l'expansion des cellules dérivées d'OS (CDOS) et des cellules souches stromales mésenchymateuses (CSM) dérivées de la moelle osseuse en milieu adhérent, les cellules étaient cultivées en flasques traitées pour la culture, semées à la densité de 4000 cellules/cm² en moyenne. Le milieu d'entretien était composé de :

- α -Minimal Essential Medium (MEM)
- SVF 10% (v/v)
- L-Glutamine 1% (v/v)
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)
- bFGF2 1 ng/mL

La lignée HOS était cultivée en milieu adhérent également. Les cellules étaient ensemencées à la densité de 2000 cellules/cm². Le milieu était composé de :

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Lonza)
- SVF 5% (v/v)
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)

Une fois 70 à 90% de confluence obtenue, les cellules étaient lavées au Phosphate Buffered Saline (PBS – Lonza) puis décollées à l'aide de Trypsine-EDTA après incubation à l'étuve pendant 5 minutes. L'adjonction de milieu de culture permettait de neutraliser ensuite l'action de la Trypsine-EDTA. Les cellules étaient comptées à la cellule de Malassez après coloration au bleu de Trypan puis centrifugées à 1600 tr/min pendant 5 minutes.

2.2 Milieux de différenciation

Afin de tester les capacités de différenciation *in vitro*, différents milieux étaient utilisés.

2.2.1 Ostéoblastique

Les cellules étaient ensemencées à la concentration d'environ 10 000 à 20 000 cellules/cm² en plaques 24 puits. Une fois l'adhérence puis la quasi confluence obtenue, un milieu inducteur était utilisé pendant 21 jours et changé 3 fois par semaine.

Le milieu témoin comprenait :

- α -Minimal Essential Medium (MEM)
- SVF 2% (v/v)
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)

Le milieu de différenciation correspondait à du milieu témoin complété avec :

- NaH₂PO₄ 1 mM
- acide ascorbique 0,05 mM
- dexaméthasone 10⁻⁷ M

Au terme des 21 jours de culture, les cellules étaient fixées au Paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 20 minutes. Après lavage au PBS, la coloration au rouge Alizarin (RA) était réalisée en recouvrant l'intégralité du fond du puits. La coloration était réalisée de manière statique afin de ne pas décoller le tapis de cellules. Le RA était ensuite rincé abondamment de manière à ce que le témoin soit translucide. Après séchage, des photos étaient prises et pour certains échantillons, une quantification était réalisée : une solution d'acide formique (5%) était appliquée pendant 20 minutes afin de re-suspendre le RA. Puis le RA était quantifié par la mesure de l'absorbance à 450 nm de longueur d'onde.

2.2.2 Chondroblastique

La technique de culture en « micromasse » était utilisée. Les cellules étaient lavées à 2 reprises au PBS afin d'éliminer toute trace de SVF. Puis 500 000 cellules étaient réparties dans chaque tube de type Falcon 15 mL et centrifugées. Le culot était laissé en place et le milieu de culture était ajouté en veillant à ne pas l'altérer. La culture durait 21 jours et le milieu était changé 3 fois par semaine.

Le milieu témoin comprenait :

- DMEM 3M glucose
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)

Le milieu de différenciation correspondait à du milieu témoin complété avec :

- pyruvate de sodium 2 mM
- acide ascorbique 2 phosphate 0,17 mM
- dexaméthasone 10^{-7} M
- insuline, transferrine, sélénium (ITS) 1x
- Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) 10 ng/mL ajouté de manière extemporanée à chaque changement de milieu.

Au terme de la culture, la micromasse était fixée en PFA 4% pendant 30 minutes puis déshydratée à l'aide de bains successifs d'alcool (de concentration croissante) puis

incluse en paraffine. Une fois le bloc coupé au microtome, les lames étaient colorées au Bleu Alcian.

2.2.3 Adipocytaire

Les cellules étaientensemencées à la concentration de 10 000 cellules/cm² dans les chambres de culture LabTeck sur lame de microscope stérile (4 chambres - Nunc). Une fois l'adhérence puis la quasi confluence obtenue, un milieu inducteur était utilisé pendant 14 jours et changé 3 fois par semaine.

Le milieu témoin comprenait :

- DMEM
- SVF 10% (v/v)
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)

Le milieu de différenciation correspondait à du milieu témoin complété avec :

- dexaméthasone 10⁻⁶ M
- indométacine 60 µM
- isobuthyl methylxanthine (IBMX) 0,5 mM

Au terme de la culture, les cellules étaient fixées au PFA 4% pendant 15 minutes puis lavées. Elles étaient ensuite incubées à l'obscurité avec 300 µL de Rouge de Nile (0,5 mg/mL) pendant 15 minutes (colorant lipophile marquant de manière fluorescente les vésicules lipidiques). Puis les noyaux étaient contremarqués en bleu au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Un milieu ProLong® était appliqué afin de conserver la fluorescence. Les lames étaient observées au microscope à fluorescence.

2.2.4 Vasculaire

Les cellules étaientensemencées à la concentration de 10 000 cellules/cm² sur lames de microscope stériles dans des chambres LabTeck (Nunc). Elles étaient cultivées en milieu αMEM, 10% SVF (v/v), Pénicilline et Streptomycine 1% (v/v), bFGF2 1 ng/mL

jusqu'à environ 50 % de confluence. Au terme de la culture, les cellules étaient fixées au PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante puis lavées au PBS et conservées à 4°C.

Après fixation, les cellules étaient perméabilisées et incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 0,05% de Triton (m/v) et 1% Bovine Serum Albumine (BSA) plus 1% de Normal Goat Serum (NGS) pour bloquer des sites non-spécifiques. L'incubation avec l'anticorps primaire dirigé contre l'alpha smooth muscle actin (ASMA, MAB1420 de R&D System) était réalisé au 1/1000^{ème} dans le même tampon sur une nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS, l'anticorps secondaire, goat-anti-mouse couplé à l'Alexafluor 488 était ajouté au 1/500^{ème} pour une incubation d'une heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Si un marquage de l'actine était nécessaire, la phalloïdine l'Alexafluor 647 était ajouté au 1/100^{ème}.


Après plusieurs lavages, les noyaux étaient ensuite contremarqués au DAPI dans un milieu ProLong®. Les lames étaient observées au microscope confocal Nikon A1RSi et les images analysées avec le logiciel Fiji.

2.3 Cultures tri dimensionnelles

Elles étaient réalisées sur plaques 6 puits ultra peu adhérentes. Le milieu était homogénéisé sur agitateur. Il comprenait :

- α -MEM (-)
- méthylcellulose (R&D Systems) 1,17% (m/v)
- SVF 10% (v/v)
- L-Glutamine 1% (v/v)
- Pénicilline et streptomycine 1% (v/v)
- bFGF2 1 ng/mL

Les cellules étaient ajoutées à ce milieu puis homogénéisées sur agitateur afin de bien répartir la solution cellulaire. Chaque puits contenait 2 mL de milieu avec 40 000 cellules. Les puits étaient ensuite régulièrement contrôlés au microscope et les sphères de plus de 20 cellules étaient identifiées (les agrégats n'étaient pas comptabilisés),



comptées et parfois prélevées à la pipette sous microscope puis remises en cultures en conditions adhérentes.

3. Sénescence

Les cellules étaient ensemencées dans des plaques 6 puits (30 000 à 60 000 par puits). L'activité de la bêta-galactosidase pour identifier les cellules sénescents était détectée selon les instructions du test « senescence cells histochemical staining kit » (Sigma). Brièvement, les cellules étaient lavées au PBS et recouvertes de 1,5 mL de tampon de fixation 1X à température ambiante pendant 7 minutes. Après lavages, les cellules étaient incubées avec la solution de marquage contenant le substrat X-gal, pendant 2 heures à 12 heures à 37°C. Les cellules étaient observées au microscope et une coloration bleue permettait d'identifier les cellules sénescents.

4. Cytométrie en flux

Les cellules d'intérêt étaient comptées puis reprise dans du PBS puis réparties au nombre de 100 000 à 200 000 cellules dans 100 µL de PBS par puits sur plaque 96 puits à fond en V. La plaque était centrifugée à 2000 tours/min pendant 1 minute. Le travail était réalisé ensuite sur glace. Le culot était repris dans 200 µL de PBS-Bovine Serum Albumine (BSA) 4% puis centrifugé selon les mêmes modalités que précédemment. L'anticorps d'intérêt dilué au 1/50^e dans 25µL de PBS était ajouté (sauf les puits « contrôle ») et 25 µL de PBS étaient ajoutés. La plaque était mise à incuber 30 minutes à l'abri de la lumière. Après 2 rinçages au PBS, les cellules étaient transférées dans les tubes du cytomètre en flux (FC500, Beckman Coulter) avant de lancer l'analyse (CXP Analyse software – Beckman Coulter). Les anticorps utilisés sont rapportés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Anticorps	Fluorochrome	Laboratoire
Anti CD34	Phycoérythrine	BD Pharmigen
Anti CD44	Phycoérythrine	BD Pharmigen
Anti CD45	Phycoérythrine	BD Pharmigen
Anti CD73	Phycoérythrine	BD Pharmigen
Anti CD90	Phycoérythrine	BD Pharmigen
Anti CD105	Phycoérythrine	BioLegend
Anti CD133	Phycoérythrine	BD Pharmigen

5. Analyses statistiques

Pour la comparaison de 2 groupes, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé avec un seuil de significativité à $p=0,05$.

6. Milieux conditionnés et dosage des cytokines

Afin d'obtenir des milieux conditionnés, les cellules étaient cultivées jusqu'à 80 à 90% de confluence. Elles étaient rincées 3 fois au PBS puis cultivées avec un milieu α MEM sans supplémentation en SVF pendant 24h. Ce milieu était ensuite récupéré et filtré à 22 μ m pour éliminer d'éventuels débris.

Afin de doser les cytokines contenues dans le milieu conditionné, la technologie multiplex a été utilisée (Bio-Plex Multiplex System, Bio-Rad). Jusqu'à 100 molécules peuvent être détectées de manière simultanée. La détection est réalisée selon le principe d'un test ELISA. Toutefois, dans cette technique, les anticorps spécifiques sont couplés à des billes magnétiques. Différents signaux de couleurs et d'intensités différents sont émis simultanément puis détectés.

Le kit que nous avons utilisé permettait la détection et le dosage de 31 molécules solubles des interleukines (IL) IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL10,

IL-12, IL-13, IL-15 et IL-17 ; des chémokines : IP-10 (CXCL10), MCAF, MIP-1 α (CCL-3), MIP-1 β (CCL-4), RANTES (CCL5), éotaxine (CCL11) ; des facteurs de croissance : FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , PDGF-bb, TNF- α , VEGF et LIF ; et des adipokines : leptine, résistine et visfatine (37).

7. Transcription inverse et Polymerase Chain Reaction quantitative (RT-qPCR)

7.1. *Extraction d'ARN*

Deux techniques ont été utilisées :

- Trizol® : les cellules étaient lysées au Trizol® (inVitrogen) puis 200 μ L de chloroforme étaient ajoutés. Après centrifugation, la phase supérieure contenant les ARN était prélevée puis précipitée dans l'isopropanol (Sigma) puis lavée à l'éthanol 75% puis laissée sécher à l'air jusqu'à obtention d'une transparence complète. Puis l'ARN était dissous dans l'eau diéthyl pyrocarbonate (DEPC).

- Kit d'extraction sur colonne NucléoSpin RNA XS (Macherey-Nagel) : les instructions du fabricant ont été appliquées.

La concentration en ARN totaux a été mesurée à l'aide du Nanodrop 1000 (ThermoFischer) puis les échantillons congelés à -20°C.

7.2. *Rétrotranscription de l'ARN*

Le kit de rétrotranscription (RT) du laboratoire ThermoScientific a été utilisé. Il contient l'ensemble des réactifs nécessaires : la rétrotranscriptase Maxima H Minus

First, le tampon de l'enzyme, les amorces oligo-dT et les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).

Un microgramme d'ARN est incubé 5 minutes à 65°C dans un mélange contenant les amorces oligo-dT et les dNTP. Cela permet de dénaturer les structures secondaires de l'ARN. Puis le mélange contenant l'enzyme et son tampon préparés extemporanément est ajouté aux échantillons. Le tout est incubé 30 minutes à 50°C. Pendant cette phase, l'enzyme synthétise le brin complémentaire. Puis les tubes sont placés 5 minutes à 85°C afin d'inactiver l'enzyme. Les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus sont conservés à 4°C à la concentration de 50 ng/μL.

7.3. *Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR)*

En fonction des gènes d'intérêts, différentes amorces sens et antisens ont été utilisées et sont répertoriées dans le Tableau 5. L'Actine B (*ACTB*) et la β-2-microglobuline (*B2M*) ont été utilisées comme gènes de référence dans la mesure où leur expression est ubiquitaire et que leur détection ne variait pas de plus d'un Ct dans les échantillons comparés.

La qPCR était réalisée en plaque 96 puits. Les ADNc à 50 ng/μL étaient dilués pour obtenir une concentration à 10 ng/μL. L'amplification était réalisée dans un volume final de 10 μL : 8 μL de mélange contenant les amorces sens et anti-sens (solution préalablement diluée au 1/20), le SYBR Green, la TAQ polymérase et les dNTP. Les 2 μL restant étaient complétés par les ADNc. La qPCR était réalisée en triplicata. Après centrifugation, la plaque était placée dans un thermocycleur PCR (Bio-Rad – CFX96) qui permet d'apporter les conditions nécessaires à l'amplification et assure la mesure de la fluorescence des échantillons.


Le cycle comprenait initialement 2 min à 50°C puis 3 min à 95°C pour la pré dénaturation. Puis 40 cycles étaient réalisés comprenant 15 secondes à 95°C pour la dénaturation puis 50 secondes à 60°C pour l'hybridation et l'élongation. Puis la courbe de fusion était réalisée.

Tableau 5: séquences sens et antisens des amorces utilisées pour la Polymerase Chain Reaction (PCR).

Abréviation	Nom du gènes		Amorce
<i>ACTB</i>	Béta actine	Sens	CGGGACCTGACTGACTACCTC
		Antisens	TTCGTGGATGCCACAGGA
<i>ALP</i>	Alcaline phosphatase	Sens	AACACCACCCAGGGGAAC
		Antisens	GGTCACAATGCCACAGATT
<i>B2M</i>	Béta 2 microglobuline	Sens	TTCTGGCCTGGAGGCTATC
		Antisens	TCAGGAAATTTGACTTTCATTC
<i>DLX 5</i>	Homeobox Protein DLX 5	Sens	CAGAGAAGGTTTCAGAAGACTCAG
		Antisens	CTCCCCGTTTTTCATGATCT
<i>NANOG</i>		Sens	ATGCCTCACACGGAGACTGT
		Antisens	AAGTGGGTGTTTGCCTTTG
<i>P16</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Sens	TGAGGGTTTTCTGGTTTACA
		Antisens	CCATCATCATGACCTGGTCTTCT
<i>P21</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Sens	CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG
		Antisens	CATGGGTCTGACGGACAT
<i>P53</i>		Sens	ACATGACGGAGGTTGTGAGG
		Antisens	CGCAAATTTCTTCCACTCGG
<i>PPAR G</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Sens	GACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAA
		Antisens	TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC
<i>RUNX 2</i>	Runt-related transcription factor 2	Sens	GCCTAGGCGCATTTTCAGA
		Antisens	GCTCTTCTTACTGAGAGTGGAAGG
<i>SOX 2</i>	Transcription factor SOX2	Sens	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG
		Antisens	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC
<i>SOX 9</i>	Transcription factor SOX9	Sens	GTACCCGCACTTGCACAAC
		Antisens	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC

8. RNA sequencing

Les analyses ont été réalisées par Messieurs Frédéric Chibon et Tom Lesluyes à l'Institut Bergonié à Bordeaux. Les valeurs obtenues correspondaient à une intensité



d'expression exprimée en logarithme Népérien. Les populations cellulaires de CSMMO et de CDOS BAR, DIA, LEG, BAY, RAV et SAG ont été analysées.

9. Cytogénétique

9.1. *Caryotypes*

Les analyses ont été réalisées par le Dr Philippe Piloquet, généticien au CHU de Nantes.

9.2. *Comparative Genomic Hybridization (CGH).*

Les analyses ont été réalisées par Monsieur Olivier Pichon et Monsieur le Pr Le Caignec, du Service de Génétique du CHU de Nantes.

10. Métabolisme

10.1. *SeaHorse®*

Les analyses ont été réalisées par Madame Claire Pecqueur de l'UMRS 1232 de la Faculté de Médecine de Nantes. Le fonctionnement est représenté sur la Figure 21. Il existe deux outils de mesure. Le premier est la mesure de la respiration mitochondriale, par la mesure de l'oxygène extra cellulaire (OCR : Oxygen Consumption Rate) en ayant bloqué la chaîne respiratoire mitochondriale à différents endroits. En interrompant complètement le cycle de Krebs, il ne reste plus que le métabolisme extra mitochondrial, donc glycolytique. Le second moyen est l'évaluation de la glycolyse par la mesure de l'acidité extra cellulaire, reflet de l'augmentation de l'acide lactique, produit de dégradation du glucose pour la synthèse d'ATP.

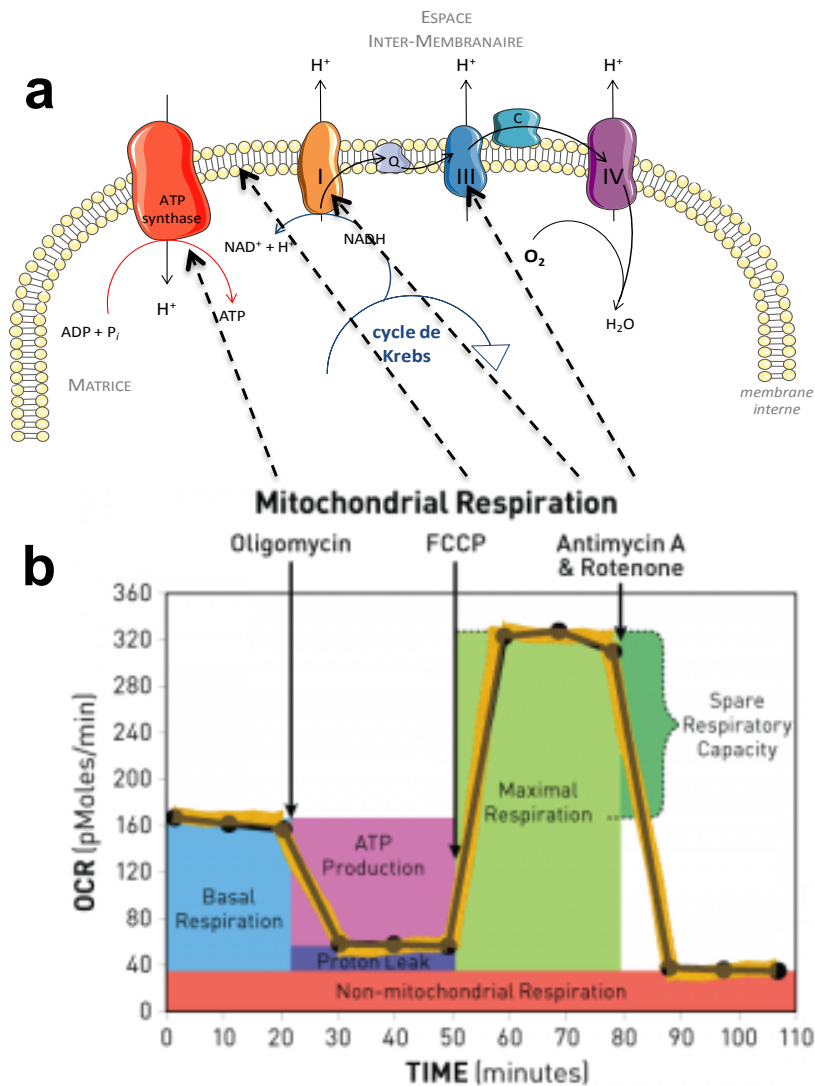


Figure 21 : représentation du fonctionnement de la mesure de la respiration mitochondriale par le SeaHorse. (a) La membrane mitochondriale est représentée avec le cycle de Krebs. (b) Les différentes étapes de la mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR) représenté en ordonnée, en fonction du temps (abscisse). On mesure le fonctionnement de l'ATP synthase en appliquant un inhibiteur (Oligomycine). Puis, par perforation de la membrane mitochondriale interne par le FCCP, la perte du gradient de proton, par la fuite de ces derniers, entraîne un fonctionnement maximal de la chaîne respiratoire qui tente de rétablir ce gradient. Enfin, l'application d'Antimycine A et de Roténone qui inhibent les groupes I et III, permet l'arrêt complet de la chaîne respiratoire.

10.2. Analyse du potentiel d'oxydoréduction

Les analyses du potentiel d'oxydoréduction (PAO) ont été réalisées par l'équipe du Pr Hérault, au laboratoire LNO_x, à la Faculté de Médecine de Tours.

RESULTATS

PARTIE I :

LES CELLULES DERIVEES D'OSTEOSARCOMME SERAIENT DES CELLULES STROMALES

1. Les cellules dérivées d'ostéosarcome présentent des caractéristiques de CSM

Afin de tester l'origine stromales des cellules dérivées d'OS (CDOS), nous les avons caractérisées de la même manière que sont caractérisées des CSM. Nous avons appliqué les recommandations de l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) (8).

1.1 Culture en conditions standard

Les fragments tumoraux obtenus à partir des 9 prélèvements d'OS (une biopsie et 8 pièces de résections), ont été dissociés mécaniquement et à l'aide d'une solution enzymatique (comme précédemment au chapitre Matériel et méthode, 1.1.2.2 Traitement du prélèvement) afin de dégrader la matrice extracellulaire et de permettre la dissociation des cellules. La qualité des préparations cellulaires obtenues était très variable. Certaines pouvaient contenir de nombreux débris cellulaires ou matriciels, en fonction des prélèvements.

Les prélèvements DEL, BAR, DIA, BAY, PIN et JUL n'avaient pas été congelés entre le moment de leur obtention et leur prise en charge au Laboratoire. Nous avons constaté que pour les prélèvements qui avaient eu une congélation intermédiaire (LEG, RAV et SAG), la mortalité cellulaire avoisinait 90% lors de la mise en culture. En ce qui concerne la méthode de dissociation, l'association d'une fragmentation mécanique et d'un cocktail enzymatique fourni par le Laboratoire Miltenyi Biotech permettait d'obtenir une solution cellulaire utilisable immédiatement avec un risque de contamination bactérienne moindre qu'une dissociation mécanique au bistouri associé à une incubation avec la collagénase.

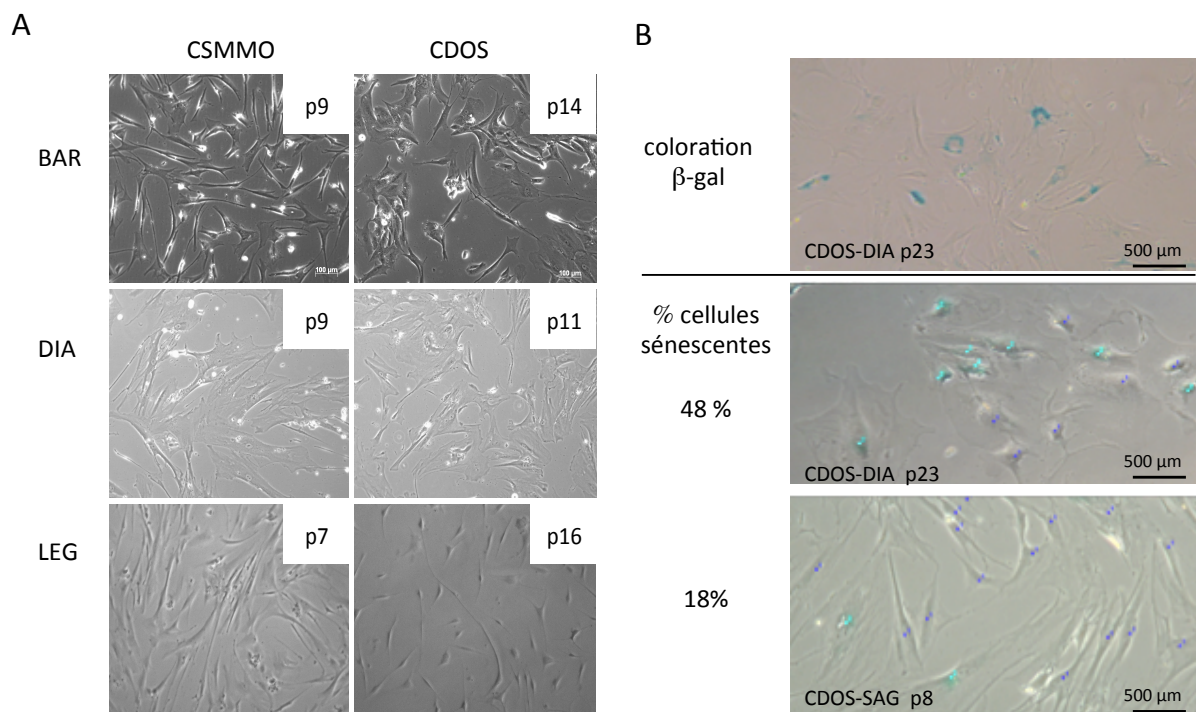


Figure 22 : (A) observation des CDOS et des CSMMO correspondantes en culture standard à différents passages en microscopie photonique. (B) Test de sénescence avec détection de l'activité de la bêtagalactosidase. Les cellules sénescents présentent une coloration bleue intracytoplasmique. En haut, les CDOS DIA au passage 23 présentent une coloration violette témoignant de la sénescence. Pour cette même population, le comptage permet d'évaluer le pourcentage de sénescence à 48% (au milieu). Les CDOS SAG au passage 8 présentent 18% de cellules sénescents (bas).

Les CDOS ainsi obtenues étaient homogènes après 2 passages en culture. Elles présentaient les mêmes caractéristiques morphologiques que les CSMMO. Un aspect stellaire et effilé était observé en microscopie photonique lorsque les cellules étaient en

croissance et ou/en division pour les passages les plus précoces (Figure 22A). Pour les passages plus tardifs (supérieurs à 10), un aspect plus trapu était observé (Figure 22B) et associé à un état de quiescence, confirmé par la détection de l'activité de la bêtagalactosidase.

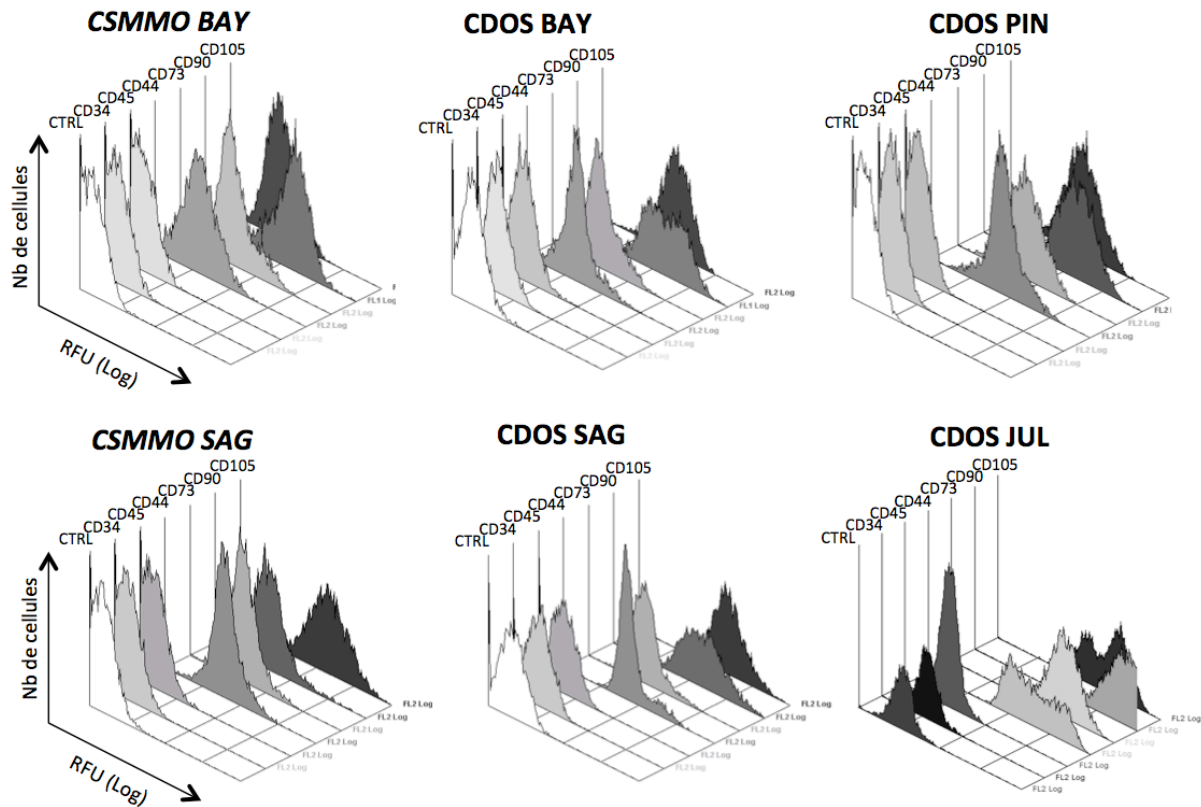


Figure 23 : représentation tri dimensionnelle des profils d'expression membranaire des marqueurs CD34, CD45, CD44, CD73, CD90 et CD105 analysés en cytométrie en flux des CDOS et CSMMO BAY et SAG et des CDOS PIN et JUL. Les intensités de fluorescence sont représentées en abscisse (RFU, échelle logarithmique) pour chaque évènement correspondant à un nombre de cellules (Nb de cellules) en ordonnée. CTRL correspond à l'intensité de fluorescence des cellules en absence d'anticorps fluorescent.

Nous avons étudié le profil d'expression des marqueurs membranaires en cytométrie en flux des CDOS et CSMMO (Figure 23). Nous avons analysé différents marqueurs : hématopoïétiques (CD34, CD45, CD117 (c-kit)), adhésion à la matrice extra cellulaire (CD44) et marqueurs de CSM (CD73, CD90, CD105) (Tableau 6). Les CDOS exprimaient 3 marqueurs d'immaturité (CD73, CD90, CD105). Il s'agit donc de précurseurs. Cependant, les CDOS n'étaient pas identifiées comme des précurseurs hématopoïétiques devant l'absence d'expression de CD34, CD45 et CD117. Le profil

d'expression des CDOS ressemblait à celui des CSMMO avec en plus l'expression assez similaire d'un marqueur d'adhésion à la matrice extra cellulaire (CD44).

Tableau 6 : Résultats de la détection par cytométrie en flux de marqueurs membranaires CD34, CD45, CD117, CD44, CD73, CD90, CD105. Les valeurs sont données en moyenne d'intensité de fluorescence rapportée à celle du bruit de fond (RFMI). Une même couleur représente une manipulation réalisée le même jour avec le même cytomètre et le même lot d'anticorps. AD : culture en conditions d'adhérence. CDOS : cellules dérivées d'ostéosarcome. CSM : cellules souches mésenchymateuses de patients sains. CSMMO : cellule souche mésenchymateuse dérivée de moelle osseuse de patient atteint d'ostéosarcome. n.d. : non déterminé. P : nombre de passages en culture. SP : culture en sphère.

patient	Patient sain		DEL		BAR						DIA		LEG		BAY		RAV		SAG		PIN		JUL
	CSM	CDOS	CDOS		CDOS P3			CSM MO P5	CDOS P5	CSM MO	CDOS	CSM MO	CDOS	CSM MO	CDOS	CSM MO	CDOS	CSM MO	CDOS	CSM MO	CDOS	CDOS P8	CDOS P3
Mode de sélection des cellules		AD		SP1	SP1	SP1	SP2	SP3	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
CD34	Hematopoietic progenitor antigen 1	0,8	2,0	4,7	2,5	1,0	1,4	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	2,6	1,8	1,0	1,0	1	1	1,4
CD45	Tyrosine phosphase receptor – cellules hématopoïétiques	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,5	1,1	1,0	1,0	1	1	1,0
CD117	Récepteur à thyrosine kinase	1,6	1,9	1,0	1,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,0	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CD44	Acide hyaluronique, migration, adhésion cellulaire	154,3	169,0	171,0	274,0	211	195	163	94	65	154,0	245,0	172	189,6	14,9	8,0	406	320,5	21,3	18,6	41,9	278	61,4
CD73	Ecto-5' nucléotidase	65,7	127,8	66,0	103,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	66,0	104,0	76	n.d.	8,3	7,3	148	n.d.	13,9	9,1	30,4	33,5	56,0
CD90	Thy1, adhésion cellulaire	156,0	554,0	434,0	530,0	592	447	348	536	240	157,0	494,0	n.d.	25,9	116,2	94,0	n.d.	53,6	22,4	93,7	130	927	347,0
CD105	Endogline, rôle dans l'angiogenèse	11,6	83,0	45,0	35,0	94	50	33	79	55	112,0	47,0	73,7	112,3	10,9	26,9	198	104	140,7	72	38,8	182	55,3

1.2 Potentiel de différenciation

En suivant les recommandations de l'ISCT(8), la caractérisation des CSM comprend l'étude de leur potentiel de différenciation dans le lignage adipocytaire, chondrocytaire et ostéoblastique afin de vérifier leur caractère multipotent. Nous avons analysé ces différents potentiels à l'aide de cultures en milieux inducteurs spécifiques.

1.2.1 Différenciation adipocytaire

Après 14 jours de culture en milieu inducteur adipocytaire, les vésicules lipidiques cytoplasmiques ont été recherchées et révélées à l'aide du Rouge de Nile avec

un contremarquage nucléaire au DAPI. Pour les CDOS DEL, DIA, BAY et RAV nous observons moins de 30% de cellules contenant des vésicules lipidiques et une absence de cellule contenant des vésicules lipidiques pour les CDOS BAR, LEG et PIN. Les CSMMO présentait environ 80% de cellules contenant des vésicules lipidiques (Figure 24). Le potentiel de différenciation adipocytaire des CDOS SAG et JUL n'avait pu être testé.

1.2.2 Différenciation chondrocytaire

Nous avons utilisé la technique de culture en micromasse avec 21 jours de culture en milieu de différenciation chondrocytaire. Nous avons pu étudier les CDOS DEL BAR DIA, LEG et RAV. Les CDOS DEL, BAR et RAV produisaient une matrice cartilagineuse, en petite quantité (<50% de la surface de la micromasse)(Figure 24).

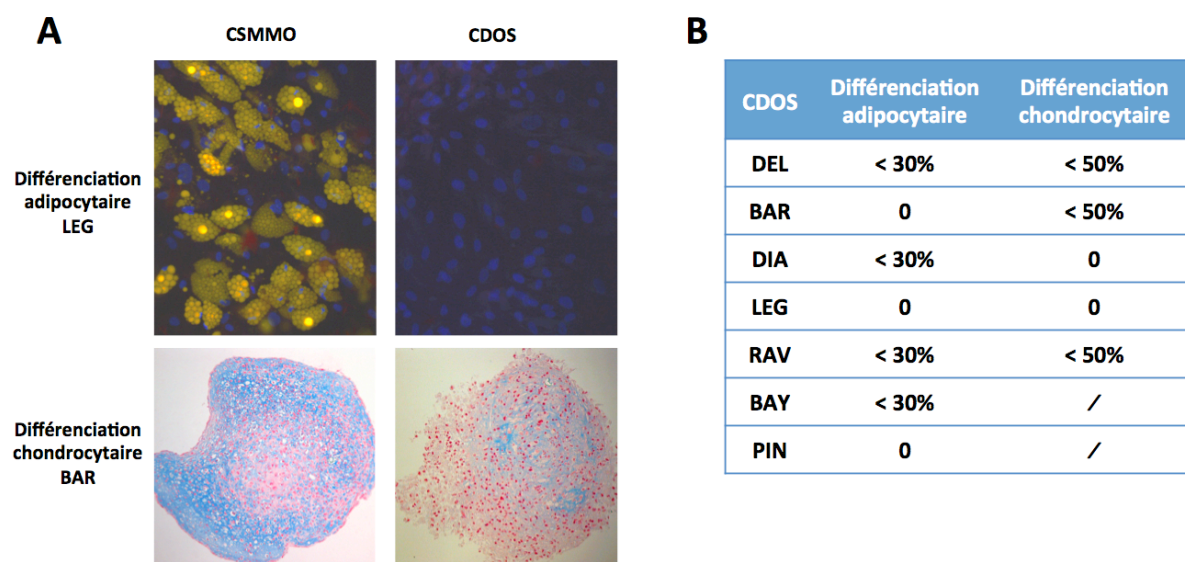


Figure 24 : analyse de la différenciation dans la voie adipocytaire et chondrocytaire. (A) Exemples de différenciation adipocytaire pour les CSMMO et les CDOS LEG avec la présence de vésicules lipidiques intra cytoplasmiques révélée par le Rouge de Nile au microscope à fluorescence, avec contre marquage des noyaux au DAPI. A noter l'absence de vésicules lipidiques en conditions de différenciation adipocytaire pour les CDOS LEG.

Exemples de différenciation chondrocytaire pour les CSMMO et les CDOS BAR après culture en micromasse et coloration au Bleu Alcian révélant la matrice chondroïde. Les CSMMO BAR présentent une différenciation chondrocytaire sur la quasi totalité de la micromasse. Les CDOS BAR présentent une différenciation chondrocytaire sur moins de la moitié de la micromasse.

(B) Tableau résumé des différentes expériences de différenciation adipocytaire et chondrocytaire. Pour la différenciation adipocytaire, le pourcentage représente la proportion de cellules

contenant des vésicules lipidiques. Pour la différenciation chondrocytaire, le pourcentage représente la proportion de matrice cartilagineuse dans la micromasse. / : non testé.

1.2.3 Différenciation ostéoblastique

Après 15 jours de culture en milieu inducteur ostéoblastique, nous avons analysé la quantité de matrice osseuse minéralisée produite à l'aide de la coloration au Rouge Alizarine. Les CDOS présentait des capacités de différenciation renforcées par rapport aux CSMMO (Figure 25) : par exemple, la différenciation ostéoblastique était 2 fois plus élevée pour les CDOS BAR par rapport aux CSMMO BAR (1,4 versus 0,7) et 3 fois plus élevée pour les CDOS BAY par rapport aux CSMMO BAY (1,9 versus 0,6).

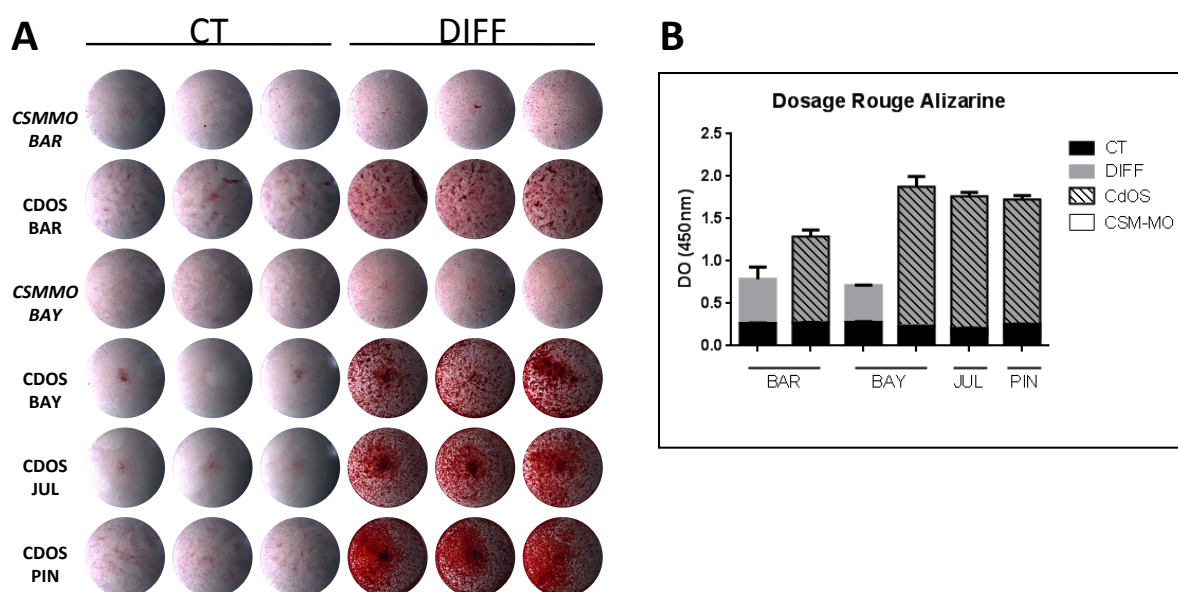


Figure 25 : (A) Analyse du potentiel de différenciation ostéoblastique des CSMMO et des CDOS après 15 jours de culture en conditions standard (CT) ou ostéoblastique (DIFF): les dépôts calciques sont colorés en rouge par le Rouge Alizarine (photographie des puits de la plaque de culture). (B) Dosage colorimétrique du Rouge Alizarine après différenciation ostéoblastique et récupération du colorant des CSMMO et des CDOS en condition de culture standard (CT) et en conditions de différenciation (DIFF).

Les CDOS présentait donc un potentiel de différenciation ostéoblastique beaucoup plus important que les CSMMO. D'autre part, leur potentiel de différenciation

adipocytaire et chondrocytaire était faible ou nul. Les CDOS étaient donc des cellules stromales avec une multipotence diminuée dans les voies adipocytaire et chondrocytaire, non comparable à la multipotence présente dans les CSMMO.

1.3 Analyse de l'état de différenciation des CDOS à l'état basal

Les CDOS ayant un fort potentiel de différenciation ostéoblastique, nous avons recherché des signes d'engagement ostéoblastique à l'état basal, c'est à dire sans milieu de culture inducteur. En cas d'engagement ostéoblastique, cela traduirait alors qu'il pourrait s'agir de pré-ostéoblastes. Nous avons analysé en RTqPCR l'expression des principaux gènes de la voie ostéoblastique : de l'initiation (*DLX5*, *RUNX2*) et de l'expansion (*ALP*).

Les CDOS exprimaient moins *DLX5* que les CSMMO et ce, de manière constante. Ces différences étaient toutes significatives sauf pour les CDOS RAV. Les résultats étaient similaires pour l'expression de *RUNX2*, mais ces différences n'étaient significatives que pour les CDOS BAR. En ce qui concerne les CDOS RAV, le résultat était inverse avec une expression très faible pour les CSMMO et une expression forte pour les CDOS. Le gène codant la phosphatase alcaline (*ALP*) était exprimée de manière hétérogène entre les CDOS et les CSMMO. Dans un cas (LEG) elle était plus exprimée de manière significative par les CDOS (Figure 26).

En RNAseq, nous avons confirmé ces résultats avec l'expression de *DLX5* qui était 1,1 à 29 fois plus exprimée dans les CSMMO que dans les CDOS, celle de *RUNX2* était 1,04 à 4,9 fois plus exprimée dans les CSMMO que dans les CDOS. L'expression de l'*ALP* était similaire à celle observée en RTqPCR.

A l'état basal, les CDOS semblaient finalement moins engagées dans la différenciation ostéoblastique que les CSMMO. Afin de préciser le niveau d'engagement dans la voie ostéoblastique, nous avons analysé l'expression en RNAseq du gène *MSX2*, qui est un marqueur précoce de l'initiation ostéoblastique. Pour 5 populations cellulaires sur 6, *MSX2* était de 3 à 43 fois plus exprimé dans les CDOS que dans les CSMMO (aucune expression de *MSX2* pour les CDOS BAY).

Les CDOS étaient engagées dans la voie ostéoblastique à l'état basal mais moins engagées que les CSMMO.

Nous avons ensuite analysé la présence ou non d'un engagement dans la voie adipocytaire (par l'absence d'expression de *PPAR γ*) et chondrocytaire (par l'absence d'expression de *SOX9*). *PPAR γ* était plus exprimé par les CDOS que les CSMMO de BAR, DIA et LEG, avec toutefois des valeurs relativement faibles. Ces résultats étaient confirmés en RNAseq. *SOX9* n'était exprimé que très faiblement dans les CSMMO et les CDOS, ce que nous avons considéré comme nul (Figure 26). Ces résultats étaient confirmés en RNAseq. Il n'y avait pas de lien entre le sous type chondroblastique des OS à l'origine des CDOS (RAV et SAG) et l'expression de *SOX9*.

Les CDOS étaient donc des cellules indifférenciées, avec un début d'engagement dans la voie ostéoblastique à l'état basal, mais inférieur à celui des CSMMO, et pourtant avec un fort potentiel de différenciation dans les conditions ostéoblastiques.

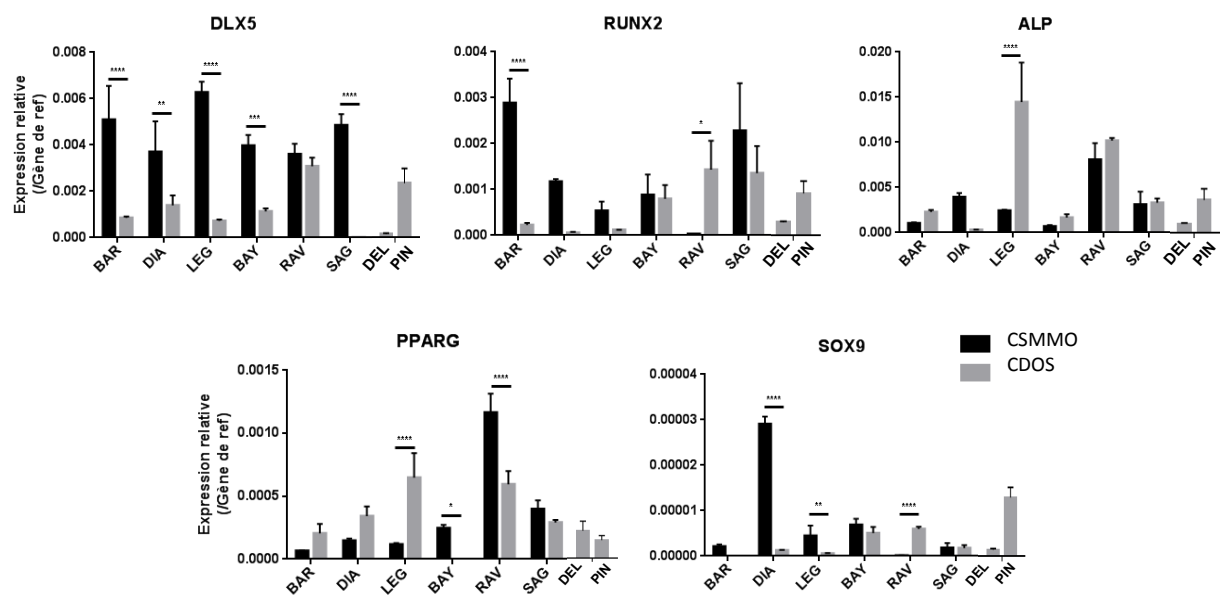


Figure 26 : analyse en RTqPCR de l'expression relative de *DLX5*, *RUNX2*, phosphatase alcaline (*ALP*), *PPAR γ* et de *SOX9*, par rapport à un gène de ménage, des CSM dérivées de la moelle osseuse de patients atteints d'ostéosarcome (CSMMO) et des cellules dérivées d'ostéosarcome (CDOS). Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta CT}$ de chacun des gènes rapportés à l'expression du gène de la *B-2 microglobuline*. Les différences significatives sont représentées par : * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$

2. Les CDOS ne présentent pas de critère de cellule cancéreuse

Nous avons recherché des anomalies caractérisant des cellules cancéreuses comme des anomalies morphologiques, cytogénétiques, des activations d'oncogènes, des inactivations d'anti-oncogènes (ou gènes suppresseurs de tumeurs), des capacités de tumorigénèse.

2.1. *Analyse des caryotypes*

Nous avons analysé les caryotypes des CDOS afin de rechercher des anomalies chromosomiques qualitatives et quantitatives dont la présence aurait été un argument fort en faveur de cellules tumorales ostéosarcomateuses. Les caryotypes des CDOS étaient sans anomalie en ce qui concerne DEL, BAR, LEG, BAY, RAV, PIN et JUL (Figure 27). Par conséquent nous n'avons pas recherché d'anomalie quantitative complémentaire plus précise par Comparative Genomic Hybridization (CGH) Array. Les CDOS DIA et SAG présentaient des anomalies caryotypiques mineures, sans commune mesure avec celles observées habituellement dans l'OS conventionnel. L'analyse de ces anomalies est présentée dans la deuxième partie des résultats au chapitre 3 : analyses cytogénétiques. Nous avons également analysé les caryotypes des CSMMO BAR DIA et LEG à la recherche d'éventuelles anomalies constitutionnelles des patients. Ces caryotypes étaient sans anomalie. Les caryotypes des CSMMO RAV, SAG et BAY n'ont pas été analysés.

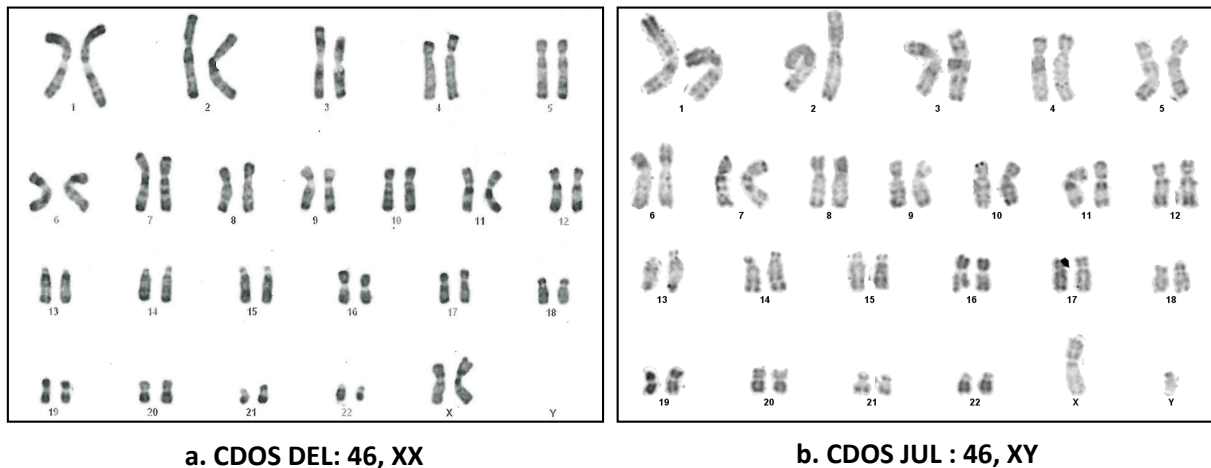


Figure 27 : exemples de caryotypes des CDOS DEL (46, XX) (a) et des CDOS JUL (46, XY) (b) qui étaient sans anomalie.

2.2. Analyse de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur

Comme nous l'avons présenté (Introduction, Partie II : Ostéosarcome), des altérations génétiques de gènes suppresseurs de tumeur, d'oncogènes ou d'autres gènes comme par exemple, la télomérase, sont très souvent retrouvées dans l'OS (103). Nous avons donc analysé l'expression de certains de ces gènes afin de mettre en évidence d'éventuelles anomalies pouvant orienter vers une origine tumorale des CDOS. Nous avons analysé par transcription inverse puis PCR quantitative l'expression de *P16^{INK4a}*, *P21* et *P53*. Ces gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines qui interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire (Figure 28).

Les variations d'expression qui étaient observées étaient similaires pour les CDOS et les CSMMO pour *P16*, excepté pour les CDOS RAV qui présentaient une expression significativement plus élevée. De la même manière *P53* et *P21* sont apparus plus exprimés dans les CDOS RAV et SAG en comparaison avec les CSMMO respectives (Figure 28). Toutefois ces augmentations d'expression de gènes suppresseurs de tumeur ne sont pas en faveur d'une transformation des CDOS par rapport aux CSMMO. Seules les CDOS DIA et BAY présentaient une diminution significative de l'expression de *P53* par

rapport aux CSMMO correspondantes. Bien que l'expression de *P53* était diminuée, elle était toujours présente. Ces constatations étaient confirmées en RNAseq.

Ces résultats ne sont donc pas en faveur de cellules tumorales dans lesquelles l'expression de *P53* est régulièrement absente.

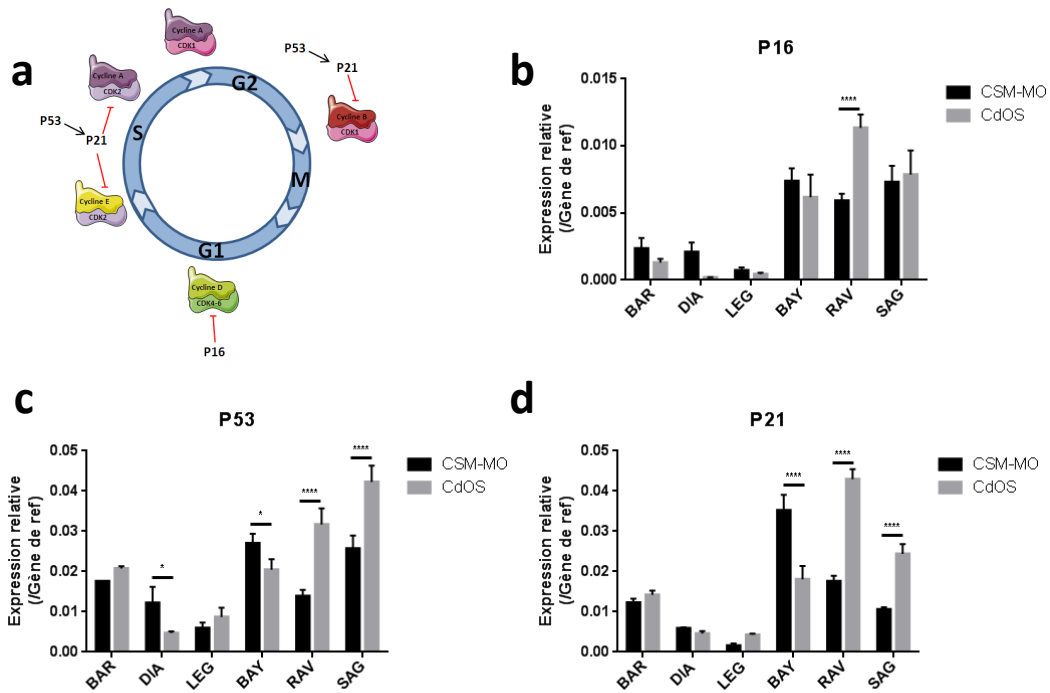


Figure 28 : schéma représentatif du contrôle du cycle cellulaire (a). Comparaison du taux d'expression des gènes *P16* (b), *P53* (c) et *P21* (d) entre les CSM MO et les CDOS BAR, DIA, LEG, BAY, RAV et SAG analysés en RTqPCR. Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta CT}$ de chacun des gènes rapportés à l'expression du gène de la *B-2 microglobuline*. Les écarts types expérimentaux sont représentés. Les différences significatives sont représentées par : * : $p < 0,05$, **** : $p < 0,001$.

2.3. Analyse de l'expression de gènes « souches »

Les CDOS ne présentaient pas les anomalies qui sont habituellement retrouvées dans les cellules ostéosarcomateuses. Nous avons évoqué la possibilité que les CDOS seraient alors des cellules tumorales à un stade débutant de la tumorigenèse, donc ne présentant pas d'anomalie aussi évidente que dans les cellules tumorales qui constituent l'essentiel de la tumeur, avec un caractère « souche ». Nous avons recherché des éléments qui pouvaient être en faveur de ce caractère « souche ».

Nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de certains gènes permettant le maintien du caractère « souche » des cellules, comme *NANOG*, *SOX2* (SRY-related HMG-box gene 2) et *OCT4* (Octamer-binding transcription factor 4). L'analyse portait sur les CSMMO et les CDOS à des temps de culture comparables (entre le 6^{ème} et le 10^{ème} passage). L'expression des gènes *SOX2* et *OCT4* n'était pas détectable pour les CSMMO et les CDOS. En ce qui concerne *NANOG*, l'expression était très faible, que ce soit pour les CSMMO ou les CDOS même si l'expression de *NANOG* apparaissait significativement augmentée dans une population de CDOS par rapport aux CSMMO (RAV). Pour 2 autres populations la différence était inverse entre CDOS et CSMMO (BAR et BAY) (Figure 29). Ces résultats étaient confirmés en RNAseq.

Nous n'avons pas mis en évidence une augmentation systématique de marqueurs de cellule « souche » dans les CDOS par rapport aux CSMMO. Par ailleurs les 3 gènes testés étaient non détectés ou faiblement détectés et n'étaient sans doute pas exprimés comme ils peuvent l'être dans des iPS ou autres cellules souches totipotentes ou pluripotentes.

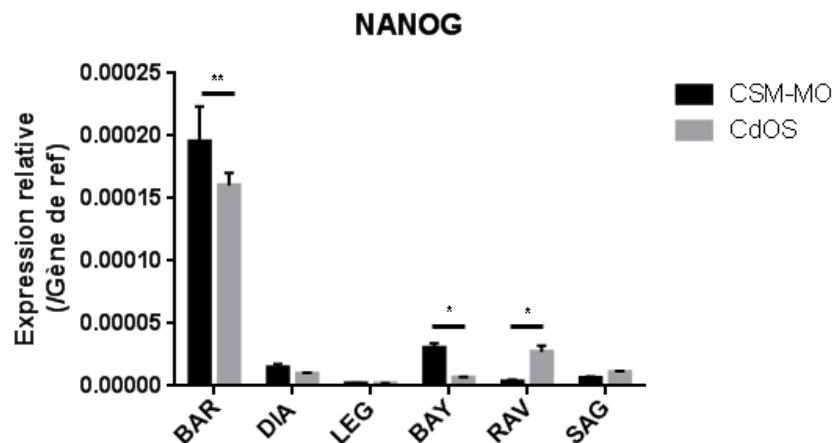


Figure 29 : comparaison du taux d'expression du gène *NANOG* entre les CSMMO et les CDOS des patients BAR, DIA, LEG, BAY, RAV et SAG analysé en RTqPCR. Les résultats sont exprimés en $2^{-\Delta CT}$ de chacun des gènes rapporté à l'expression du gène de la β -2 microglobuline (*B2M*). Les écarts types expérimentaux sont représentés. Les différences significatives sont représentées par : * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$.

2.4. Analyse de la formation de tumeur in vivo

Une des caractéristiques des CSC est la capacité d'induire une tumeur chez la souris immunodéprimée. Dans l'hypothèse où les CDOS seraient des cellules tumorales souches nous avons recherché une éventuelle tumorigénicité des CDOS. Nous les avons injectées à des souris SCID, dans un modèle d'injection dans le coussinet d'une patte postérieure. Ce modèle d'injection dans le coussinet a pour but de contenir les cellules injectées et limiter leur diffusion alentour comme cela peut se produire dans les modèles d'injection sous cutanée.

Nous avons testé différentes quantités de cellules injectées (de 1 à 3 millions). Aucune tumeur n'a été formée chez la souris immunodéprimée SCID dans un délai minimum de 6 mois.

Dans le cas des CDOS BAR nous avons vu apparaître un aspect de polyarthrite avec signes d'ostéite chez une souris sur 4 injectée. Nous avons voulu vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une évolution tumorale diffuse. A l'examen en immunohistochimie avec un marqueur humain (sonde Alu), il n'a pas été retrouvé de cellule humaine (Figure 30).

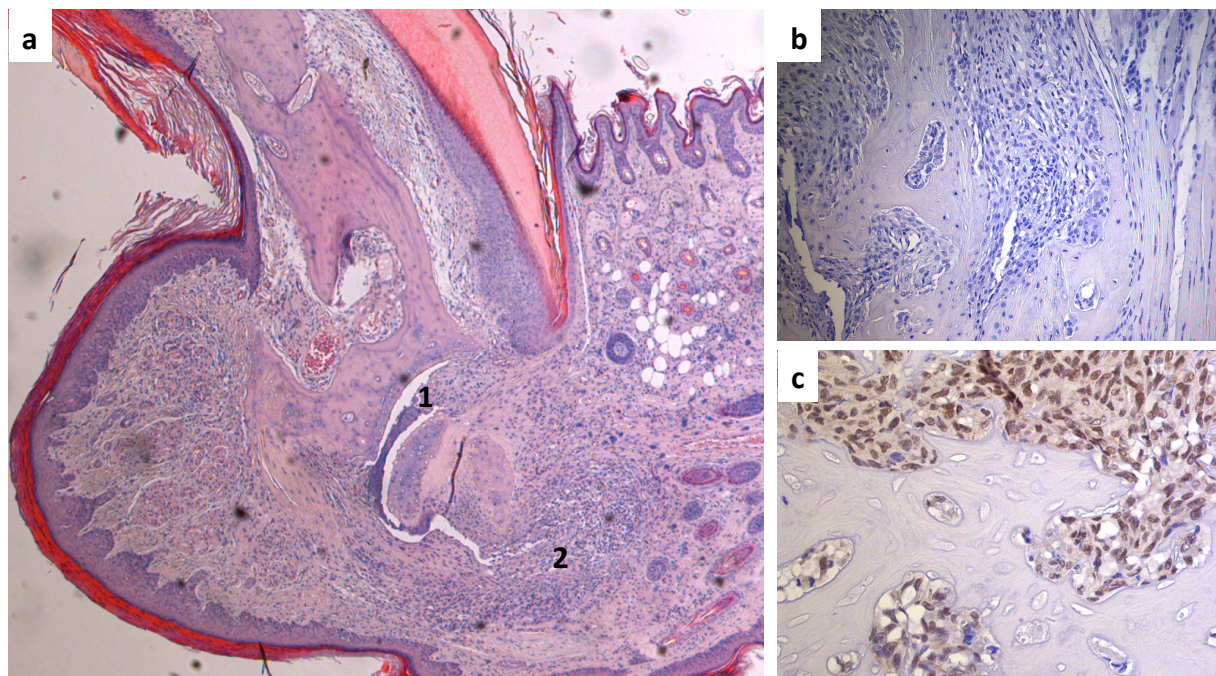



Figure 30: Coupe sagittale de coussinet de souris SCID, (grossissement x80) colorée à l'Hématoxilline-Eosine, (a), à 6 mois de l'injection des CDOS BAR. Présence d'une polyarthrite avec des signes d'ostéite avec infiltrat inflammatoire artériel (1) et péri-articulaire (2). En immunohistochimie, après coloration identique et application d'une sonde Alu (grossissement



x140), il n'est pas retrouvé de cellule d'origine humaine (b), en comparaison au témoin positif (grossissement x200) correspondant à une tumeur induite par des cellules MNNG-HOS (c).

3. Cellules dérivées d'ostéosarcome et fonction de soutien tumoral

3.1 Analyse de l'influence sur la croissance tumorale

Nous n'avons pas mis en évidence de tumorigénicité directe chez la souris immunodéprimée. Cependant, comme nous avons mis en évidence un effet de soutien de la croissance tumorale de CSM de moelle osseuse ou de tissu adipeux de patients sains dans nos études précédentes (15)(37), nous avons recherché un effet de soutien des CDOS sur la croissance tumorale de cellules MNNG-HOS. Nous avons évalué l'effet de la coinjection des CDOS avec la lignée MNNG-HOS chez la souris Nude (Figure 31). Les CDOS entraînaient une augmentation de la croissance tumorale des cellules MNNG-HOS dans 6 cas sur 7 (CDOS de DIA, LEG, BAY, RAV, DEL et PIN), avec une différence qui était significative dans 3 cas sur 6 (CDOS de LEG, RAV et DEL) (Figure 31).

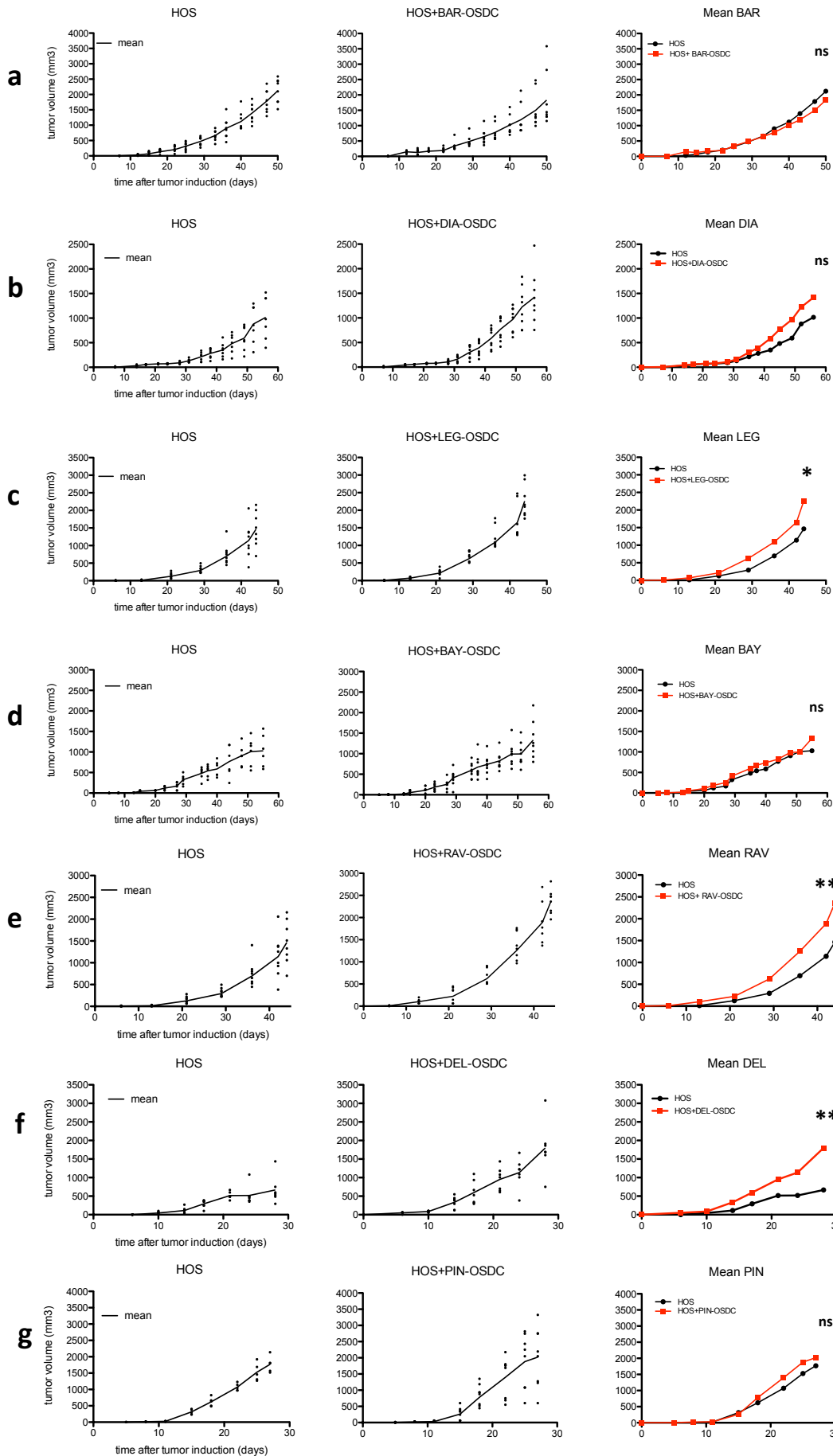


Figure 31 : courbes de croissances tumorales (mm^3) en fonction du temps (jours) dans un modèle de co-injection para tibiale chez la souris Nude. Les courbes à gauche représentent l'injection de cellules MNNG-HOS (HOS) seules ; les courbes au centre correspondent à l'injection des cellules MNNG-HOS associées aux cellules dérivées d'ostéosarcome (OSDC) du patient BAR (a), DIA (b), LEG (c), BAY (d), RAV (e), DEL (f), PIN (g). Les courbes à droite représentent les moyennes de croissance tumorale induite par les cellules MNNG-HOS seules (HOS) et en co-injection avec les CDOS. L'analyse statistique compare les groupes HOS avec les groupes HOS+CDOS (OSdC) au dernier recul à l'aide d'un test non paramétrique de Mann Witney (ns : non significatif, * : différence significative avec $0,05 > p > 0,01$, ** : différence très significative avec $0,01 > p > 0,001$).

3.2 Analyse de l'influence sur la survenue de métastases pulmonaires

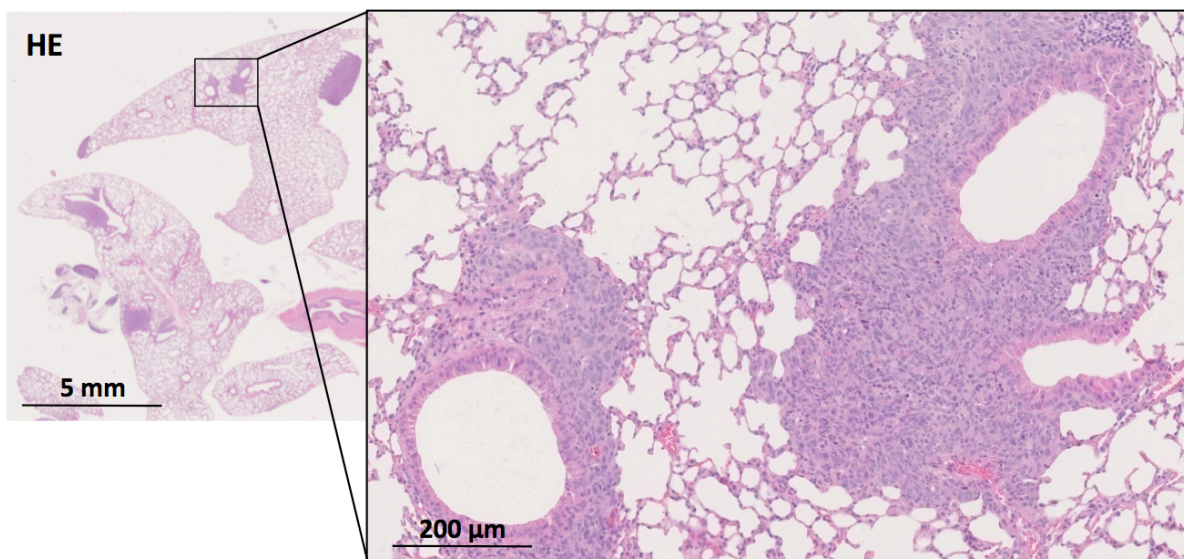


Figure 32 : exemple de métastases pulmonaires chez une souris Nude ayant eu une injection de de la lignée d'OS murine MOSJ. Coloration Hématoxyline Eosine.

L'histoire naturelle de l'OS est la progression locale d'une part, mais aussi l'évolution métastatique pulmonaire principalement (voir Introduction, Partie II, Ostéosarcome). Ainsi, en plus de la croissance tumorale locale chez la souris Nude, nous avons voulu évaluer l'effet des co-injections sur l'apparition des métastases pulmonaires en les comparant dans chaque expérience à un groupe contrôle ne recevant que les cellules tumorales MNNG-HOS (Figure 32).

Les métastases pulmonaires ont été comptabilisées macroscopiquement et microscopiquement sur coupes histologiques. Sept populations de CDOS (DEL, BAR, DIA, LEG, RAV et PIN) ont été testées en co-injection de cellules tumorales MNNG-HOS et comparées à leur groupe contrôle qui avait reçu les cellules MNNG-HOS seules. Dans 6 cas sur 7, le nombre d'animaux présentant des métastases était plus élevé dans les groupes ayant reçu les co-injections (Tableau 7). Dans un cas, il était similaire.

Tableau 7 : incidence des métastases pulmonaires chez la souris Nude dans différents modèles : injection seule de cellules MNNG-HOS et co-injection des cellules MNNG-HOS avec des CDOS. Il y avait 8 animaux par groupe.

	HOS	CDOS+HOS
DEL	5/8	6/8
BAR	2/8	5/8
DIA	2/8	5/8
LEG	5/8	7/8
BAY	6/8	6/8
RAV	5/8	7/8
PIN	1/8	2/8

Pour l'expérience de co-injections avec les CDOS DEL, nous avons modifié stablement les cellules MNNG-HOS dans le but d'obtenir une expression de l'enzyme luciférase. Ainsi nous avons pu également quantifier la quantité de bioluminescence dans les poumons *ex vivo* après injection intrapéritonéale du substrat (Figure 33). Les signaux de bioluminescence obtenus étaient augmentés globalement d'un facteur 4 dans le groupe ayant reçu les co-injections de CDOS en comparaison au groupe des injections de cellules MNNG-HOS seules.

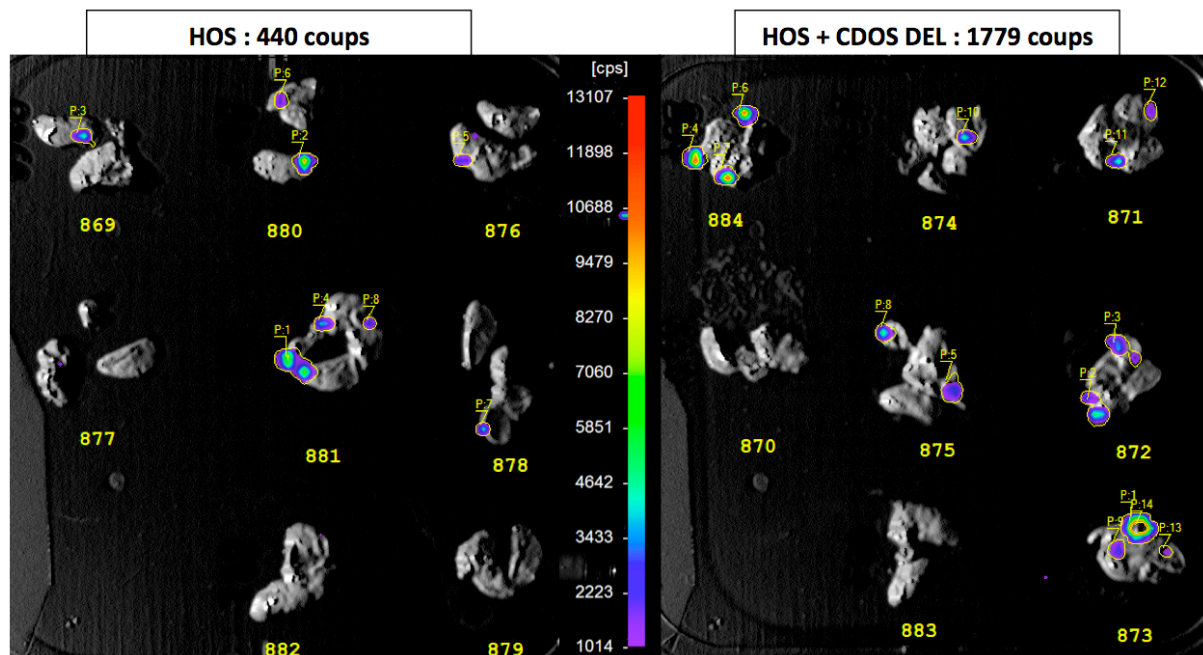


Figure 33 : photographies couplées aux images de bioluminescence des poumons explantés des souris Nude. Les cellules MNNG-HOS avaient été modifiées pour exprimer stablement la luciférase firefly (LucF). Elles étaient injectées seules ou co-injectées à un ratio 2:1 avec les CDOS DEL. Au terme de la croissance tumorale, la luciférine était injectée en intra péritonéal, puis les souris étaient sacrifiées. Les poumons étaient explantés et analysés à l'aide d'une caméra détectant la bioluminescence. La quantification, en nombre de coups (cps), était réalisée après sélection des foyers de bioluminescence (zones intitulées P) qui n'étaient pas des artéfacts.

3.3 Analyse de l'organisation tumorale dans les modèles de co-injection

Les CDOS présentant des critères de cellules stromales de soutien de la tumeur, nous avons analysé plus précisément l'organisation de la tumeur dans les modèles de co-injection. Nous avons utilisé le modèle de co-injection para tibiale associant des CDOS avec les cellules MNNG-HOS (comme présenté au chapitre 3.1 de la Partie I des résultats). La lignée MNNG-HOS était modifiée pour exprimer une protéine fluorescente, l'EGFP. Au terme de la croissance tumorale chez la souris Nude, la tumeur a été dissociée et analysée en cytométrie en flux. Nous avons utilisé le récepteur membranaire CD90 comme marqueur discriminant entre les cellules tumorales MNNG-HOS et CDOS puisqu'il n'est pas exprimé par les cellules MNNG-HOS. Au terme de la croissance tumorale, l'analyse des cellules de la tumeur induite ne nous a pas permis d'identifier de

cellule CD90 positive et EGFP négative correspondant aux CDOS. En revanche, les cellules tumorales CD90 négatives et EGFP positives ont été largement retrouvées démontrant ainsi qu'elles formaient majoritairement la tumeur.

Nous avons voulu comprendre comment s'organisait la tumeur à un temps plus précoce et quels étaient les rapports entre les CDOS et cellules MNNG-HOS. Aussi nous avons analysé la tumeur en histochimie à 15 jours de l'injection. Pour cette analyse, les CDOS (et non MNNG-HOS) et CSMMO avaient été modifiées pour exprimer stablement l'EGFP. De rares CDOS étaient retrouvées 15 jours après l'injection : moins de 1% alors qu'elles avaient été injectées à 33% avec les MNNG-HOS initialement (Figure 34).

Les CDOS ne constituent pas la tumeur dans les modèles de co-injection d'une part et disparaissent dans les 15 jours qui suivent la co-injection d'autre part. L'effet de soutien de la croissance serait alors précoce et possiblement dû à des facteurs de croissance libérés initialement.

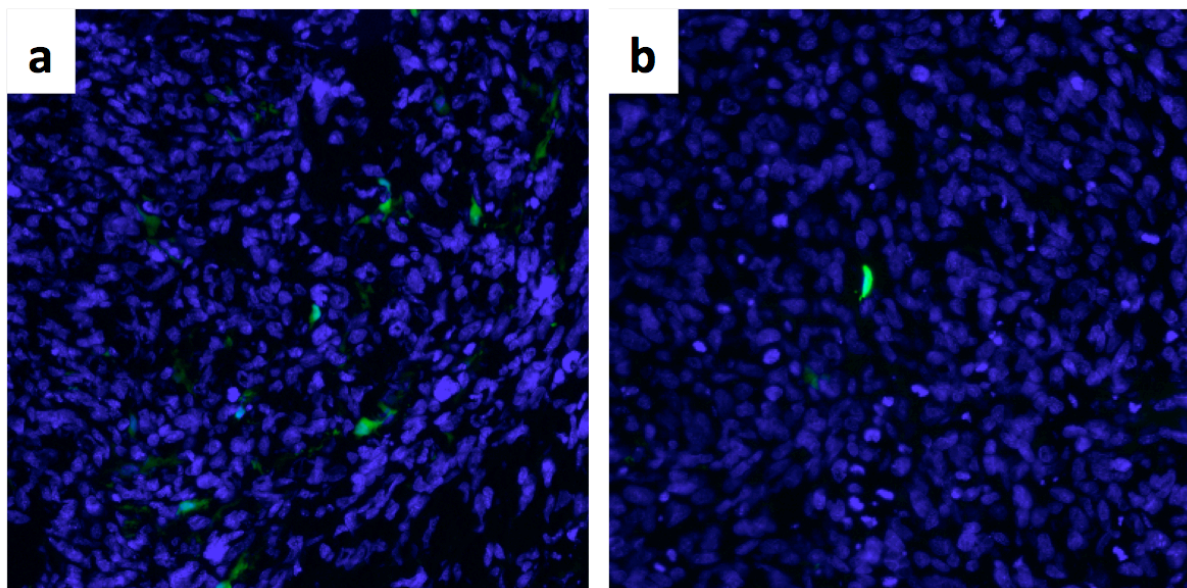


Figure 34 : Microscopie fluorescente sur coupe histologique de tumeur à 15 jours de la coinjection de cellules MNNG-HOS et CSMMO BAR exprimant l'EGFP (a) et de MNNG-HOS et CDOS BAR exprimant l'EGFP (b) dans un modèle paratibial chez la souris Nude. Marquage nucléaire au DAPI. Superposition à l'aide du logiciel ImageJ. Grossissement x200.

3.4 Recherche de cytokines

Afin de progresser dans la compréhension du mécanisme de soutien de la croissance tumorale et de la progression métastatique induit par les CDOS dans les modèles de co-injection, nous avons recherché d'éventuelles cytokines plus spécifiquement sécrétées par les CDOS. Dans un premier temps nous avons comparé le sécrétome des CDOS DEL avec celui de CSM de moelle osseuse d'un patient sain et celui de CSM dérivées de tissu adipeux d'un patient sain (Figure 35). Le sécrétome des CDOS DEL était similaire à celui des CSM de moelle osseuse de patient sain. Il est intéressant de noter que les CDOS sécrétaient le VEGF, impliqué dans la néoangiogenèse, de l'IL-6, cytokine pro inflammatoire, du GM-CSF et MCP1, impliqués dans le recrutement de cellules de l'immunité innée (monocytes, granulocytes), RANTES, cytokine pro-tumorale. Toutefois, ces deux sécrétomes différaient de celui des CSM dérivées de tissu adipeux qui paraissait de nature plus inflammatoire avec notamment plus de 10 fois plus d'interleukines 6 et 8.

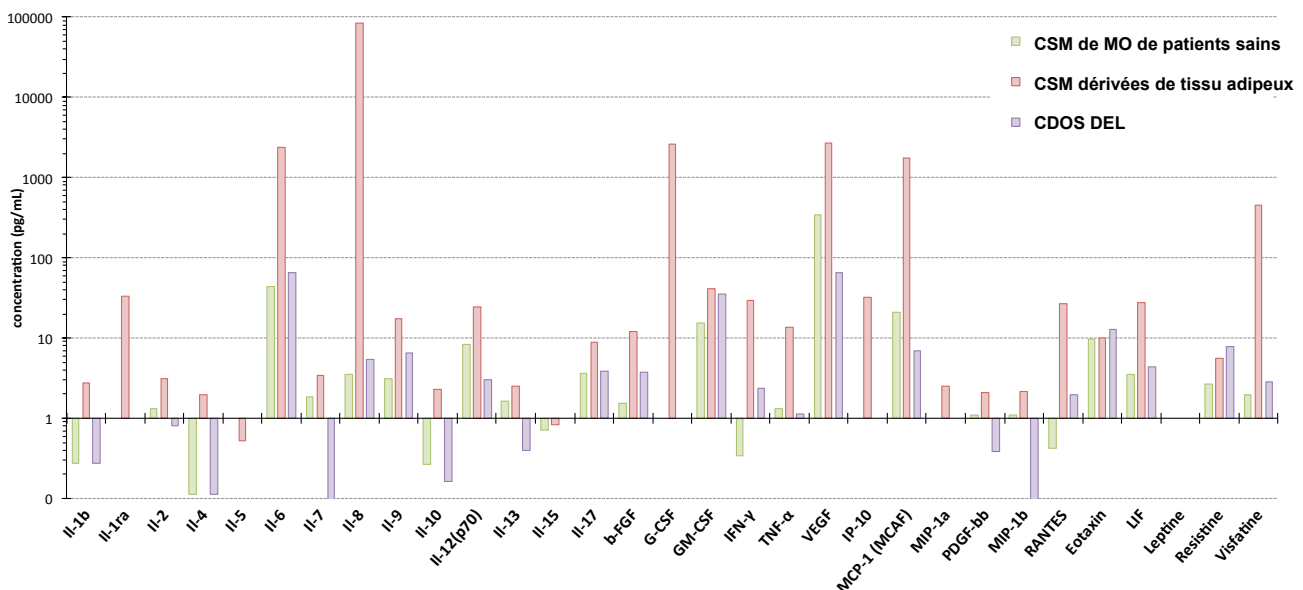


Figure 35 : dosage Bioplex des cytokines du milieu conditionné de CSM dérivées de moelle osseuse (MO) de patients sains, de CSM dérivées de tissu adipeux de patients sains et de CDOS DEL. Echelle logarithmique en ordonnée exprimée en pg/mL. Dosages des interleukines (IL), chemokine ligands (CCL et CXCL), facteurs de croissance (fibroblast GF-2 (b-FGF), vascular endothelial GF-A, platelet-derived GF-bb, tumor necrosis factor α (TNF α), interféron γ (IFN γ), Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES), leukemia inhibitory factor (LIF)) et adipokines (leptine, resistine, visfatine).

3.5 Expression de marqueurs de cellules stromales associées à la tumeur

Les CDOS présentent des caractéristiques de CSM mais ont également un effet sur la croissance tumorale et la survenue de métastases comme nous l'avons vu précédemment. Nous avons recherché la présence de marqueurs de fibroblastes associés aux tumeurs (CAF/TAF) comme nous les avons détaillés en Introduction, Partie I, 4.3.2.

Nous avons donc recherché par immunomarquage l'expression de l'ASMA par les CDOS RAV, SAG, DIA et BAR. Toutes les populations CDOS testées exprimaient l'ASMA. Elles exprimaient également la Vimentine, qui signe leur origine mésenchymateuse (Figure 36).

Les CSM de patients sains, dérivées de moelle osseuse ou de graisse, exprimaient également l'ASMA. L'expression des ASMA ne nous semblait donc pas être un critère suffisant pour identifier ou discriminer les CAF/TAF (Figure 36).

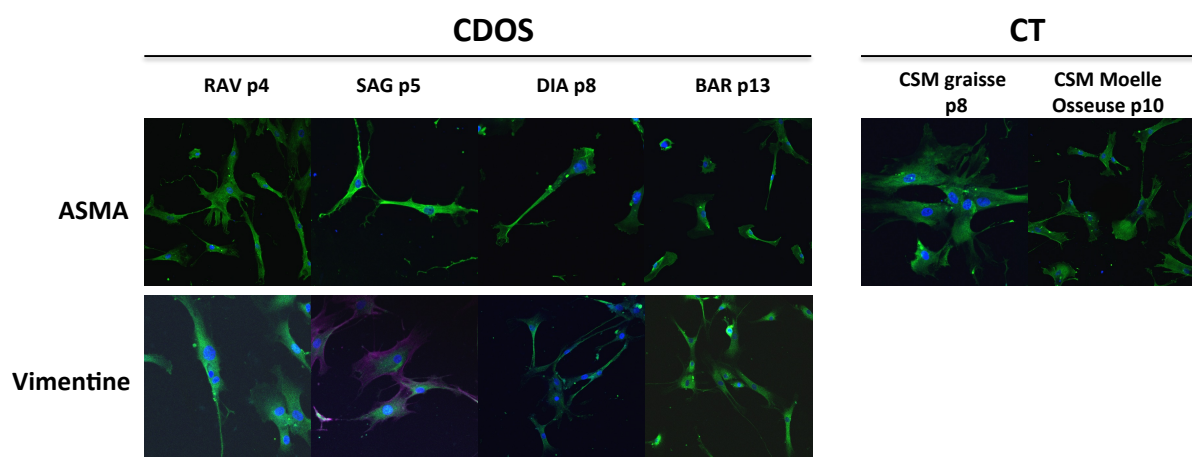



Figure 36 : immunomarquage de l'Actine Musculaire Lisse Alpha (ASMA) et de la vimentine dans 4 populations de CDOS (RAV, SAG, DIA et BAR) et à différents passages (de p4 à p13). Des cellules souches mésenchymateuses dérivées de graisse de patient sain au 8^e passage et des cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuses de patients sains au 10^e passage ont également été testées.

Coloration nucléaire au DAPI, analyse en microscope à fluorescence. CT : contrôle.



Nous avons donc recherché plus largement l'expression d'autres marqueurs potentiellement associés aux CAF/TAF en RNAseq (Tableau 8). Nous avons mis en évidence une hyperexpression constante et significative par les CDOS du gène codant pour la protéine S100A4 par rapport aux CSMMO de chaque patient. Il existait une hyperexpression de la Desmine dans les CDOS de patients ayant un mauvais pronostic (BAR, LEG, RAV). Le gène *FSP* codant la chemokine CXCL1 était constamment plus exprimé par les CSMMO que par les CDOS.

Les CDOS présentent certains marqueurs de cellules associées à la tumeur. Les CDOS présentent également de nombreuses similitudes avec les CSMMO. Les CDOS étaient des cellules stromales aux capacités de multipotence, bien que diminuées, qui exprimaient certains marqueurs de CAF, sans être toutefois d'authentiques CAF.

Tableau 8 : présentation des résultats de RNAseq pour certains marqueurs identifiés comme marqueurs potentiels des « cancer associated fibroblasts » (CAF) et des « tumor associated fibroblasts » (TAF), de marqueurs de prolifération.

Fonction	Gène	Implication	Expression par les CDOS par rapport aux CSMMO
Prolifération et facteurs de croissance	<i>CXCR4</i>	Récepteur de SDF1	Non exprimé par les CDOS et les CSMMO
	<i>IGF1</i>	Impliqué dans la croissance et le développement	1,7 à 17x plus exprimé par les CSMMO que par les CDOS (excepté CDOS SAG)
	<i>EGF</i>	Impliqué dans la croissance et la progression tumorale	1,5 à 13x plus exprimé par les CSMMO que les CDOS
	<i>IL6</i>	Cytokine proinflammatoire	Expression comparable entre CDOS et CSMMO
	<i>TGFbeta1</i>	Rôle pro tumoral dans l'OS	Expression comparable entre CDOS et CSMMO
	<i>TGFbeta2</i>	Rôle pro tumoral dans l'OS	1,1 à 3,5x plus exprimé par les CSMMO que par les CDOS (excepté CDOS DIA)
	<i>TGFbeta3</i>	Rôle pro tumoral dans l'OS	1,2 à 1,6x plus exprimé par les CDOS que par les CSMMO (excepté CDOS BAY)
	<i>HGF</i>	Rôle angiogénique	Pas d'hyperexpression constante par les CDOS par rapport aux CSMMO.
CAF/TAF	<i>SDF1 (CXCL12)</i>	Implication dans l'immunité, la réponse inflammatoire, la croissance tumorale et métastatique	Expression comparable entre CDOS et CSMMO
	<i>S100A4 (FSP1)</i>	Mobilité, invasion, polymérisation de la tubuline.	1,8 à 7,5x plus exprimé par les CDOS que par les CSMMO
	<i>ASMA (ACTA2)</i>	Mobilité cellulaire	Expression comparable et quasi nulle par les CDOS et les CSMMO
	<i>Desmine</i>	Mobilité cellulaire	Pas d'hyperexpression constante par les CDOS par rapport aux CSMMO. Surexpression par les CDOS de BAR, LEG et RAV (3 OS de mauvais pronostic)
	<i>FSP (CXCL1)</i>	Implication dans l'inflammation	2 à 9x plus exprimé par les CSMMO que par les CDOS
	<i>FAP</i>	Contrôle de la croissance fibroblastique.	Expression comparable entre CDOS et CSMMO
	<i>THY1 (CD90)</i>	Adhésion et communication cellulaire	Expression comparable entre CDOS et CSMMO
Dégradation de la Matrice extra cellulaire	<i>MMP3 (SL1)</i>	Dégradation de la matrice extra cellulaire	1,5 à 14x plus exprimé par les CSMMO que les CDOS (excepté CDOS DIA)
Autre	<i>CD31 (PECAM1)</i>	Marqueur endothélial	Expression comparable et quasi nulle par les CDOS et les CSMMO



4. Conclusion du chapitre

Les CDOS que nous avons isolées présentaient des critères de cellules stromales, par leur morphologie, leur profil d'expression de marqueurs membranaires, leur expression de gènes suppresseurs de tumeur. Elles conservaient un potentiel de différenciation, traduisant leur caractère « souche » multipotent, bien que diminué, dans les voies adipocytaire et chondrocytaire. Leur potentiel de différenciation ostéoblastique très marqué les différenciait cependant des CSMMO. Elles présentaient également des critères de cellules stromales associées à la tumeur par l'expression de certains marqueurs de CAF, par le soutien de la croissance tumorale et de la progression métastatique. Elles n'avaient pas de tumorigénicité propre mise en évidence dans nos expérimentations. Elles n'infiltraient pas la tumeur constituée dans les modèles de co-injection avec une lignée d'OS.

L'OS est suspecté de dériver d'un progéniteur stromal ostéoblastique. Ainsi, bien que les CDOS n'exprimaient pas ou peu de gènes « souches », nous nous sommes demandé si elles ne pouvaient pas être d'authentiques CSC à un stade précoce de la cancérogenèse.

RESULTATS

PARTIE II :

LES CELLULES DERIVEES D'OSTEOSARCOME SERAIENT DES CELLULES STROMALES AVEC CERTAINES CARACTERISTIQUES DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

1. Analyse des capacités de croissance cellulaire

1.1 Cultures en condition d'adhérence cellulaire

Nous avons cultivé les CDOS en conditions standard, de la même manière que les CSMMO. Nous avons observé une morphologie des CDOS similaire à celles des CSMMO. Toutefois, les CDOS présentaient des caractéristiques non présentes chez les CSMMO. Les CDOS avaient la capacité de croître en amas, ce qui n'est généralement pas le cas pour les CSM (Figure 37). De plus, les CDOS DEL BAR DIA LEG BAY conservaient leur capacité de croissance au delà du 15^e passage, tout en conservant leur morphologie stellaire (Tableau 9).

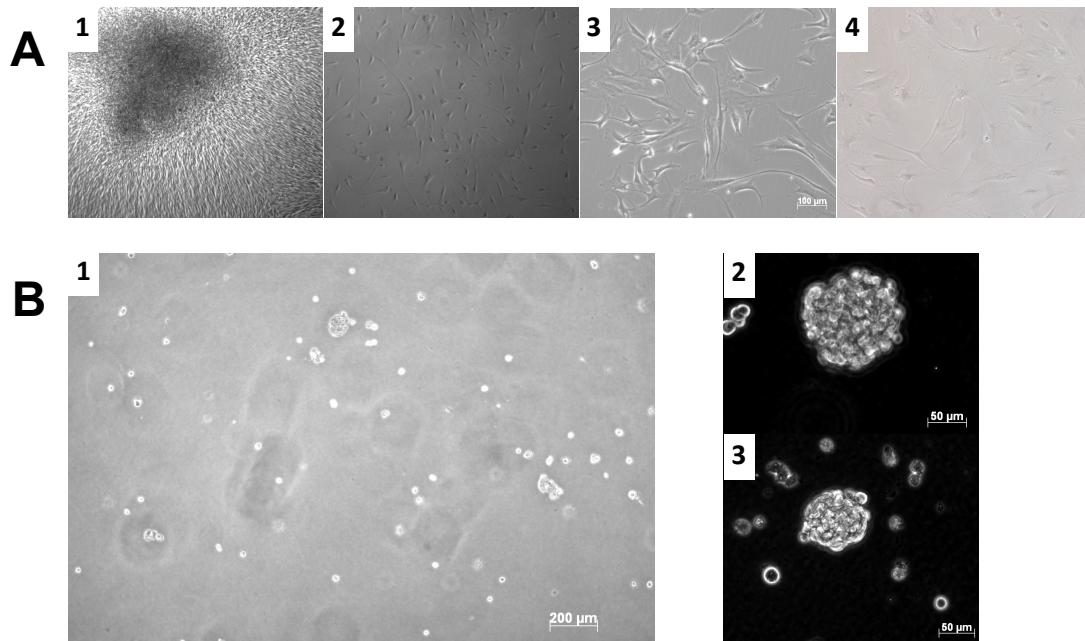


Figure 37 : cellules dérivées d'ostéosarcome (CDOS) observées en microscopie photonique.

(A)1. CDOS RAV à passage 5 : capacité de croissance en amas ; grossissement x5. 2. CDOS LEG à passage 16 : les cellules conservent une morphologie stellaire ; grossissement x5. 3. CDOS DEL au passage 19 puis au passage 23 (4) grossissement x10. Les cellules conservent une morphologie stellaire. (B) cultures en milieu semi solide. 1. Observation d'un puits de culture contenant des sphères formées de CDOS BAR. Les cellules sont rondes, témoignant de leur impossibilité d'adhérer au plastique traité. Présence de sphères, observées à plus fort grossissement (2 et 3).

1.2 Conditions de culture sans adhérence cellulaire

Une des caractéristiques des CSC est d'avoir la capacité de croître en milieu semi solide et sans adhérence. Gibbs *et al.* utilisaient un milieu de culture semi solide sans sérum de veau fœtal (SVF) qui contenait : DMEM F12, progestérone, putrescine, sélénite de sodium, transferrine, insuline, facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance fibroblastique b (bFGF) et 2% (m/v) de méthylcellulose (93). Nous avons préféré utiliser un milieu plus facile à manipuler et ne nécessitant pas un ajout quotidien des facteurs de croissance EGF et bFGF. Notre milieu contenait une concentration légèrement moins élevée de méthylcellulose (1,17% m/v), associée à un milieu de culture standard (α MEM, SVF, L-Glutamine). La culture se faisait sur plaque ultra peu

adhérente. La sphère était définie par une « boule » et non un amas, d’au moins 20 cellules.

Nous n’avons pas obtenu de sphère pour les CSMMO (Figure 37). Pour les CDOS, nous avons obtenu des sphères pour les populations toutes les populations sauf DIA (JUL non testé) avec des incidences de $0,67 \cdot 10^{-5}$ à $47 \cdot 10^{-5}$ (Tableau 9).

Tableau 9 : incidence de la survenue de sphères pour les différentes populations de cellules dérivées d’ostéosarcome (CDOS), en milieu semi solide. * : sphères observées au microscope mais non comptabilisées.

CDOS	DEL	BAR	DIA	LEG	BAY	RAV	SAG	PIN
Nombre de passages en culture en condition d’adhérence	>30	14	18	16	12	10	>10	>10
Taux de production de sphères en milieu semi solide (10^{-5})	+	70	0	>3	16	0,7	5,5	47

2. Les cellules dérivées d’ostéosarcome exprimeraient des marqueurs de cellules cancéreuses

Nous avons observé certaines anomalies de manière ponctuelles.

Les CDOS DEL exprimaient le CD34, analysé en cytométrie en flux, de manière constante (Figure 38). Cette expression était conservée après plus de 10 passages. Le CD34 est un marqueur endothélial, présent sur les CSM aux passages précoces mais qui disparaît rapidement en culture. Le CD34 est une molécule d’adhésion, à un seul domaine transmembranaire, dont le rôle n’est pas clairement élucidé à ce jour (104). Nous l’avons également exploré en analyse du RNAseq : le CD34 était faiblement exprimé par les CSMMO et les CDOS mais systématiquement plus exprimé par les CDOS que par les CSMMO (de 1,1 à 7,6 fois plus).

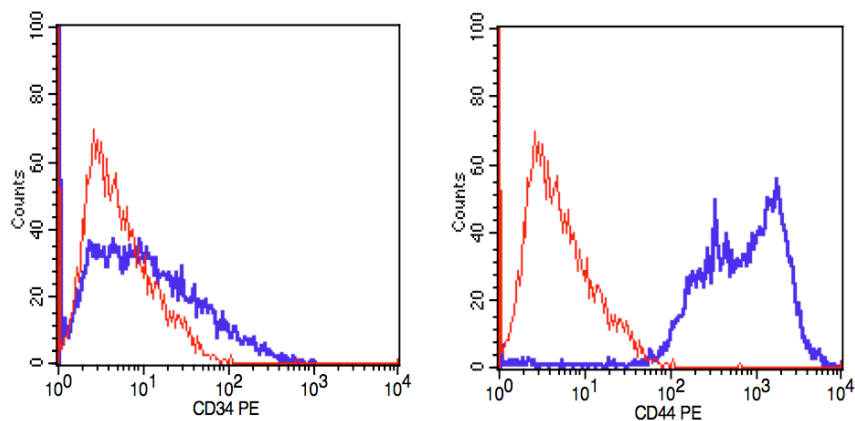


Figure 38 : analyse de marqueurs membranaires en cytométrie en flux de la population CDOS DEL. Marquage des cellules par des anticorps anti CD34 à gauche et anti CD44 à droite (courbes bleues). Le contrôle négatif (courbe rouge) correspond aux cellules non marquées. Les CDOS DEL expriment le CD34 et le CD44.

En analyse RNAseq, le marqueur c-Kit ou CD117 n'était quasiment pas exprimé par les CSMMO et par les CDOS BAY et SAG. En revanche, il était 6,2 à 17,6 fois plus exprimé par les CDOS BAR, DIA, LEG et RAV en comparaison à leurs CSMMO correspondantes. L'expression de CD117 associée à l'expression de STRO1 ont été décrites comme étant des marqueurs de CSC (Introduction, Partie III, paragraphe 3.1.1). L'analyse transcriptomique n'explorait pas l'expression de STRO1.

3. Analyses cytogénétiques

Nous avons réalisé à titre systématique une analyse caryotypique des CDOS. Dans 2 cas, nous avons observé des anomalies, non liées à la culture cellulaire, que nous détaillons ci après.

3.1. 1^{er} cas : CDOS DIA

L'analyse de plusieurs cellules en métaphase des CDOS DIA a permis de mettre en évidence une anomalie récurrente sur les bras long d'un chromosome 8 : gain d'environ 30 mégabases (Figure 39).

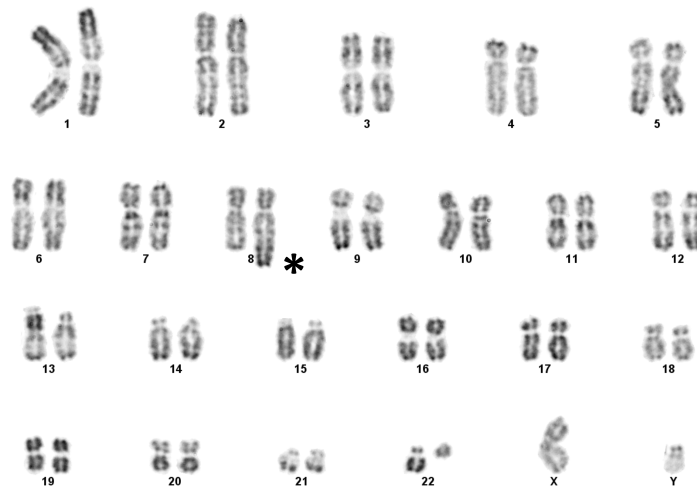


Figure 39 : caryotype des CDOS DIA. Présence d'une anomalie constante avec un gain de 30 mégabases sur le bras long d'un chromosome 8 (*).

Nous avons donc voulu compléter l'étude de cette anomalie par une analyse comparative quantitative globale du génome (Comparative Genomic Hybridization (CGH) Array) qui nous permettrait de connaître l'origine géographique, dans le génome, de ce gain de 30 méga-bases. Nous avons pu mettre en évidence que ce gain provenait d'une trisomie du bras long du chromosome 17 avec une translocation déséquilibrée au bras long d'un chromosome 8 (Figure 40). La région 17q concernée par cette trisomie contient 482 gènes (présentés en annexe) avec, entre autre: le gène *COL1A1* (responsable de la synthèse du collagène de type 1), *SOX9* (impliqué dans la différenciation chondroblastique). Il n'y avait pas de retentissement de cette trisomie sur une augmentation des transcrits analysés en RNAseq.

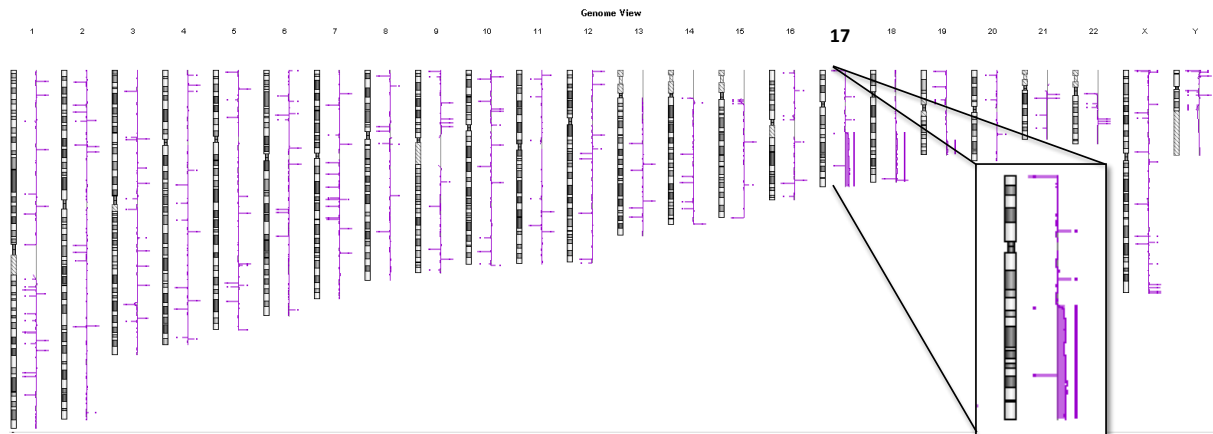


Figure 40 : résultats de l'analyse comparative génomique avec grossissement du chromosome 17. Une trisomie du bras long du chromosome 17 est détectée. Aucune autre anomalie n'est observée. Un gain d'ADN est noté comme une déviation à droite de la ligne verticale. Cette ligne représente le rapport ADN DIA sur ADN témoin lorsqu'il est égal à 1 (quantité équivalente). Une déviation à gauche de la ligne centrale correspond à une perte d'ADN testé par rapport à l'ADN de référence.


Nous avons voulu savoir ensuite si cette anomalie était également présente sur la tumeur d'une part, puis à différent temps de la prise en charge de la maladie d'autre part (Figure 41):

- au moment de la biopsie,
- puis de la résection de la tumeur pendant laquelle a été prélevée le fragment tumoral d'où dérivent les CDOS DIA,
- puis sur une première métastase, pulmonaire, retirée un an après la fin du traitement,
- puis enfin sur une deuxième métastase, sous pleurale, retirée deux ans après la fin du traitement initial.

Nous avons pu faire plusieurs observations.

En ce qui concerne la trisomie 17q, elle était retrouvée sur le prélèvement de la biopsie, mais pas sur les autres prélèvements, notamment pas sur la pièce de résection d'où sont issues les CDOS DIA.

Le prélèvement de la tumeur après chimiothérapie avait un profil CGH normal (Figure 41b). Ce constat peut être expliqué par le fait que la réponse à la chimiothérapie était bonne et que, par conséquent, il ne restait pas suffisamment de cellules tumorales viables pour que cela n'apparaisse en CGH array. Il peut également être expliqué par une différence de site de prélèvement sur la pièce opératoire entre celui des CDOS et celui de la CGH. L'OS étant une tumeur hétérogène, le prélèvement pour la CGH pouvait ne pas



s'être trouvé dans une zone de reliquat tumoral aussi cellulaire que celle du prélèvement pour les CDOS.

Entre la biopsie (Figure 41a), la première métastase (Figure 41c) et la seconde métastase (Figure 41d), il existait de nombreux gains et pertes d'ADN avec des anomalies récurrentes, mais aussi inconstantes et la trisomie 17q n'a pas été retrouvée dans ces métastases. Ces résultats montrent que l'OS est une tumeur à génétique très complexe qui peut évoluer au cours du développement tumoral.

Nous avons donc mis en évidence et confirmé un gain de 30 mégabases du bras long du chromosome 17 dans les CDOS DIA. Nous avons émis l'hypothèse que cette trisomie 17q pourrait correspondre à une anomalie pré tumorale.

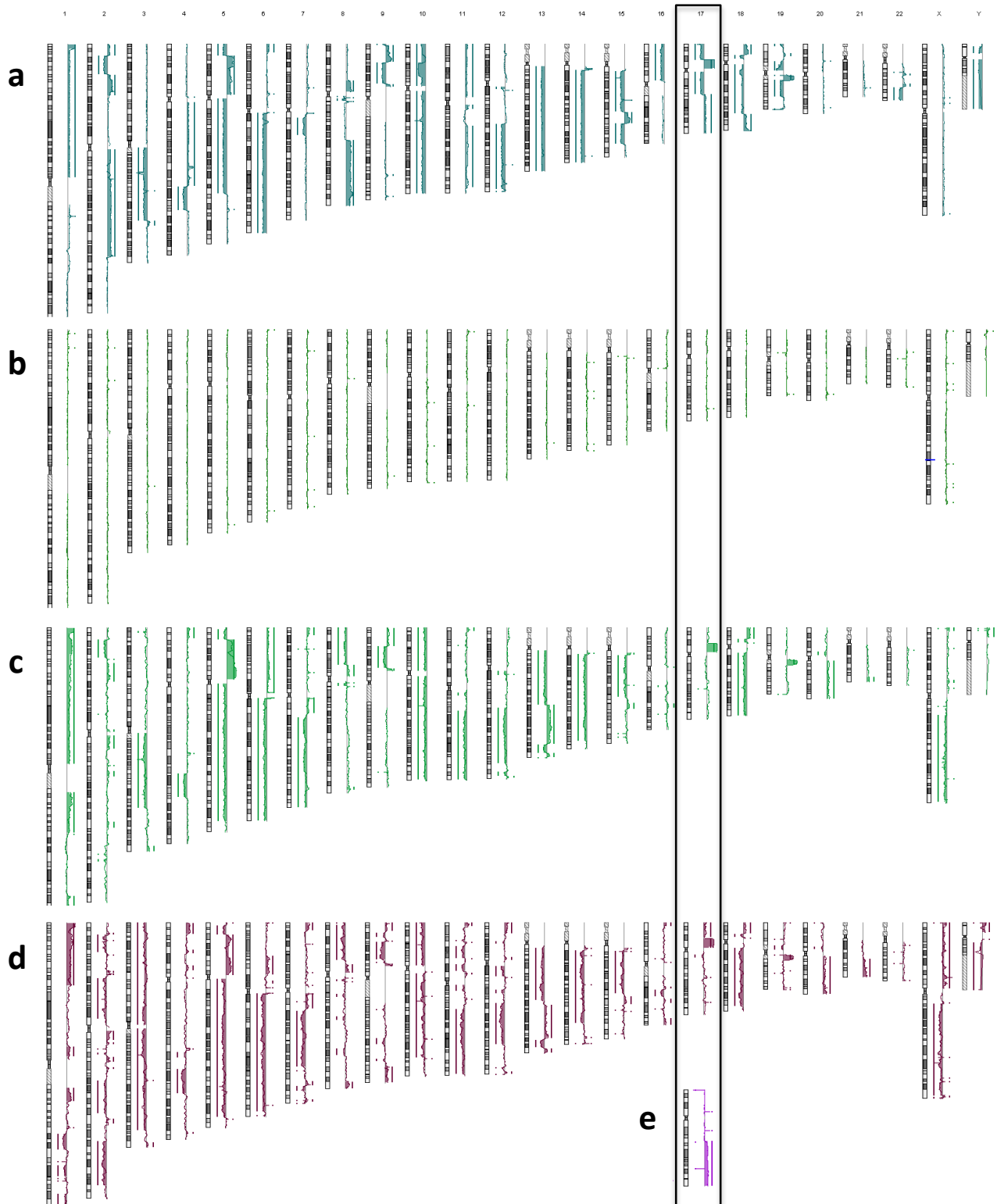


Figure 41: CGH array sur différents prélèvements tumoraux du patient DIA. (a) Biopsie diagnostique dans laquelle une trisomie 17q est identifiée parmi de nombreuses autres anomalies chromosomiques. (b) Pièce de résection après chimiothérapie néoadjuvante d'où proviennent les CDOS. Le profil CGH est celui d'un tissu normal, la trisomie 17q n'est pas retrouvée. (c) Métastase pulmonaire et métastase pleurale (d), retirées en 2 temps à plus d'un an du traitement initial. Le

profil CGH est fortement perturbé sans qu'il ne soit retrouvé la trisomie 17q. A titre comparatif, le chromosome 17 des CDOS a été reporté également (e).

3.2. 2^{ème} cas : CDOS SAG

L'analyse de 7 métaphases des CDOS SAG a permis d'observer des anomalies récurrentes du caryotype : il existait une délétion de la partie moyenne du bras long d'un seul des chromosomes 4. Par ailleurs, le second chromosome 4, présentait lui aussi une anomalie : sur 3 métaphases, il existait une possible translocation du bras long de ce chromosome avec le chromosome X. Enfin, il existait une anomalie récurrente sur un chromosome 21 qui était une perte des bras longs (Figure 42).

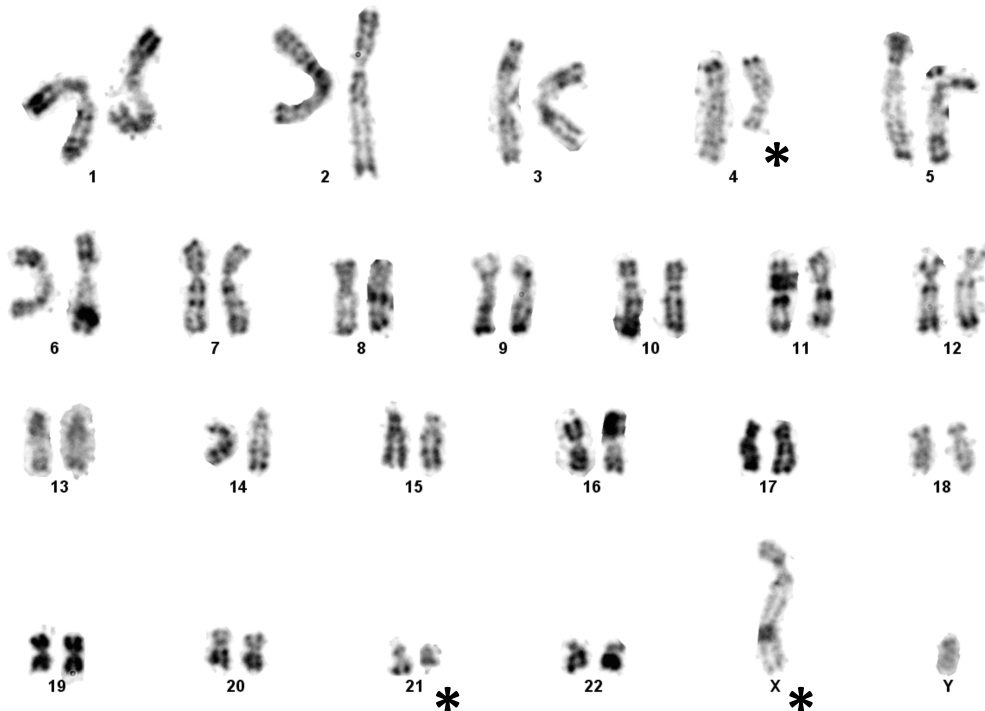


Figure 42 : caryotype des CDOS SAG. Une délétion récurrente sur les bras long d'un chromosome 4, une translocation 4-X (t(4q;Xq)) ainsi qu'une délétion du bras long d'un chromosome 21 sont relevées par des astérisques.

Ces anomalies ont été explorées de manière plus précise par une analyse en CGH array. Cette dernière a révélé très peu de remaniements sur le génome. Il n'y avait pas

d'anomalies quantitatives des chromosomes 4 et X. En revanche, il existait plusieurs anomalies.

La première anomalie était une délétion de 1,25 mégabases sur le chromosome 21 (21q22.1). Dans cette région se situent les gènes *RUNX1*, *CBR1*, *CBR3*, *DOPEY2*, *C21orf96*, *MIR802*, *SETD4*. Cependant aucune différence d'expression de ces 7 gènes n'a été révélée entre les CSMMO et les CDOS SAG lors de l'analyse en RNAseq.

La deuxième anomalie était une délétion située sur le bras court du chromosome 16 (16p13.1) correspondant à une délétion du gène *ERCC4*. Il s'agit du gène codant pour l'« Excision Repair 4 Endonuclease Catalytic Subunit ». Cette enzyme est impliquée dans le processus de réparation de l'ADN par excision nucléotidique. Sa mutation homozygote est à l'origine du Xeroderma Pigmentosum. Il s'agit d'une pathologie essentiellement cutanée et oculaire où l'exposition de la peau au soleil est à l'origine de lésions cutanées majeures par non réparation des dommages causés à l'ADN par le rayonnement ultra violet. Ce gène est impliqué également dans les maladies dites « cassantes » de l'ADN caractérisées par l'apparition de cassures spontanées ou induites dans le génome. L'anémie de Fanconi en est un exemple.

En RNAseq, l'augmentation de l'expression de *ERCC4* était retrouvée avec une expression 1,17 fois plus élevée dans les CDOS que dans les CSMMO DIA.

Pour les autres populations, exception faite des CDOS BAR, *ERCC4* était de 1,1 à 1,3 fois plus exprimé dans les CDOS que dans les CSMMO.

Nous avons donc mis en évidence et confirmé cette anomalie sur les CDOS SAG. Nous avons émis l'hypothèse que cette délétion de *ERCC4* pourrait correspondre à une anomalie pré tumorale.

4. Recherche d'anomalies du métabolisme

4.1. Métabolisme mitochondrial

D'après les découvertes de Warburg, une des caractéristiques des cellules cancéreuses serait d'avoir un métabolisme glycolytique prédominant en milieu aérobie à

la place d'un métabolisme oxydatif (105). Nous avons recherché l'existence d'une différence métabolique entre les CDOS et les CSMMO. Nous avons utilisé le SeaHorse® pour ces analyses. Nous avons mis en évidence une différence significative d'utilisation du métabolisme mitochondrial à l'état basal. Les CDOS présentaient un métabolisme mitochondrial basal diminué par rapport aux CSMMO et CSM de patients sains (Figure 43).

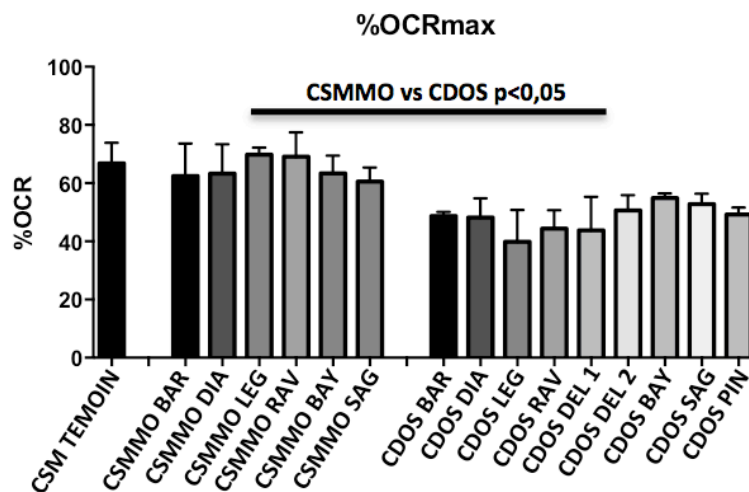


Figure 43 : analyse en SeaHorse du métabolisme des CSM de patients sains (CSM témoin), des CSMMO et des CDOS. CDOS DEL1 et 2 correspondent à 2 sous clones différents obtenus après culture en milieu semi solide. Le métabolisme mitochondrial est évalué avec la mesure du taux de consommation d'oxygène extra cellulaire (OCR). De manière significative, la proportion d'utilisation du métabolisme mitochondrial était moins élevée dans les CDOS que dans les CSMMO et CSM témoin de patients sains.

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des anomalies observées, nous avons analysé l'expression d'un transporteur transmembranaire de glucose (*GLUT1*). Ce transporteur est surexprimé par les cellules qui ont une réorientation vers un métabolisme glycolytique, comme le sont les cellules tumorales (106). *GLUT1* était moins exprimé dans les CDOS, de manière significative pour les populations BAR, RAV et SAG, par rapport aux CSMMO correspondantes (Figure 44). Nous avons également analysé l'expression de *UCP2* (Uncoupling Protein 2). Il s'agit d'une protéine située sur la membrane mitochondriale interne, dont l'hyperexpression du gène serait liée à un rééquilibrage du métabolisme initialement glycolytique vers un métabolisme plus oxydatif, avec comme conséquence une diminution de la prolifération cellulaire (107).

L'analyse en RTqPCR de l'expression de *UCP2* retrouvait en premier lieu une expression très faible par les CDOS et les CSMMO. D'autre part, il n'y avait pas de différence récurrente globale entre les CDOS et les CSMMO.

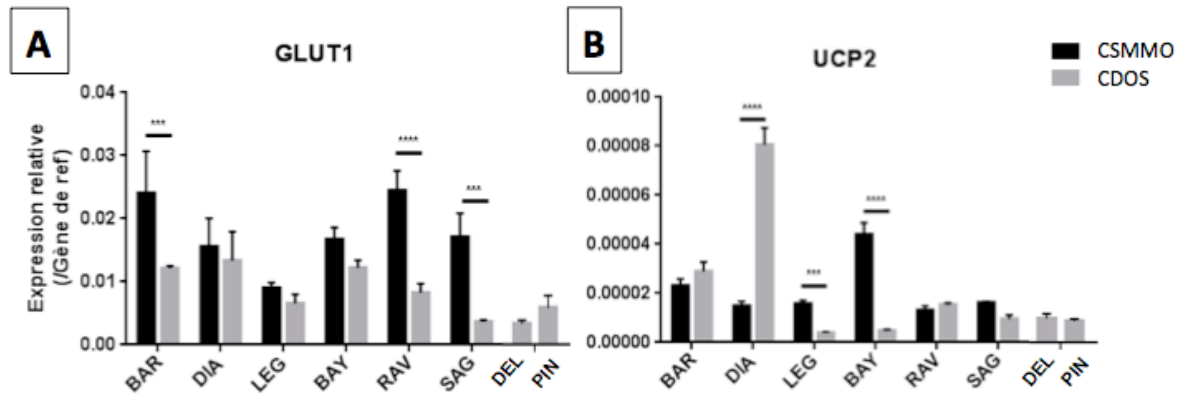


Figure 44 : analyse en RTqPCR de l'expression relative de *GLUT1* (a) et *UCP2* (b), par rapport à un gène de beta-2-microglobuline, des CSM dérivées de la moelle osseuse de patients atteints d'ostéosarcome (CSMMO) et des cellules dérivées d'ostéosarcome (CDOS). Les différences significatives sont représentées par : * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

4.2. L'analyse du profil métabolique objective des différences entre CSMMO et CDOS.

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS : Reactive Oxygen Species) font partie intégrante du fonctionnement cellulaire. Ils ont un rôle essentiel dans le métabolisme, dans l'immunité innée, la différenciation et la survie cellulaire. Les ROS sont impliqués également dans le vieillissement, l'inflammation, les pathologies cancéreuses. Les ROS présentent une certaine toxicité et requièrent une fine régulation via un réseau antioxydant comprenant un système enzymatique (108). Dans la pathologie cancéreuse hématologique, des variations du stress oxydatif pourraient avoir une influence sur la croissance des CSC leucémiques (109). Bien que la leucémie ne soit pas un cancer solide et qu'il s'agisse de données préliminaires, nous avons travaillé avec Laboratoire LNOx à la Faculté de Médecine de Tours qui a réalisé une analyse du potentiel antioxydant (PAO), qui contrôle le niveau de ROS, des CDOS et des CSMMO correspondantes.

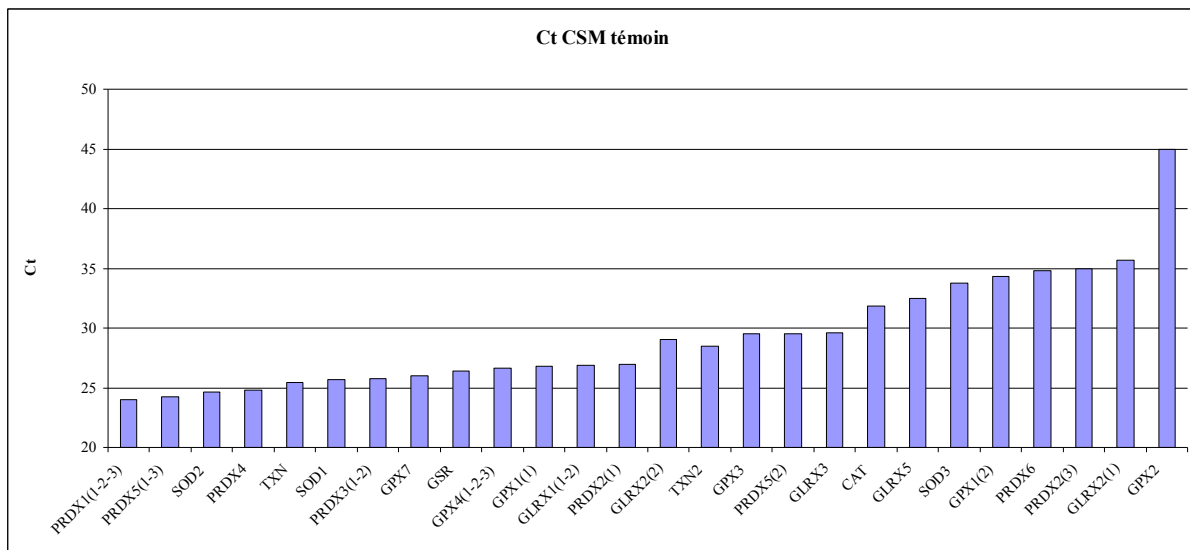



Figure 45 : expression des différents gènes du profil anti oxydant de CSM dérivées de moelle osseuse de patients sains. Ct représente le nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal en RT-qPCR. Ainsi, plus le Ct est faible, plus l'expression du gène d'intérêt est importante. Au delà de 30 Ct, l'interprétation doit être prudente car l'expression est très faible.

Cette analyse comprenait l'étude de l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS (Figure 45). Les résultats étaient exprimés sous forme de rapports d'expression de chaque gène analysé en RTqPCR : rapport entre les CDOS et les CSMMO du même patient, rapport entre les CDOS et les CSM de patients sains et rapport entre les CSMMO et les CSM de patients sains (Figure 46).

Les profils anti oxydant (PAO) présentent les variations des taux d'expression de 26 gènes des cellules d'intérêt par rapport à ceux des cellules de référence. Dix huit gènes ont été détectés avec des Ct (nombre de cycle pour dépasser le niveau de détection) inférieur à 30 et ont donc été considérés d'intérêt dans l'analyse. Les variations d'expression des 18 gènes apparaissaient plus importantes et variées pour les CDOS par rapport aux CSMMO ou par rapport aux CSM de patients sains que celles observées entre les CSMMO et les CSM de patients sains. En effet les amplitudes et les sens de la déviation par rapport à la ligne de ratio égal à 1 sont plus homogènes sur la Figure 46C où sont représentés les ratio d'expression des CSMMO de chaque patients par rapport à l'expression de CSM de patients sains. Les CDOS présentaient globalement un profil anti oxydant plus divergent que les CSMMO.

Les PAO des CDOS RAV et SAG (qui correspondent à des OS plutôt chondroblastiques) rapportés aux PAO des CSMMO correspondantes présentaient une augmentation globale



du ratio des transcrits. Plus particulièrement, le ratio concernant le gène *SOD2* était plus élevé dans les CDOS RAV et SAG (>10) (Figure 46A). *SOD2* correspond à une enzyme mitochondriale qui transforme les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). *SOD2* est hyper exprimée dans certains cancers mais agirait comme un gène suppresseur de tumeur dans d'autres (110).

A noter que l'analyse en RNAseq montrait une augmentation constante de l'expression de *SOD3*, de 1,1 à 4 fois plus dans les CDOS que dans les CSMMO, ce qui concorde avec les résultats du PAO.

Enfin, il est intéressant de noter que le PAO des CSMMO comparé à celui des CSM de patients sains montrait une tendance à la diminution globale de l'expression des enzymes antioxydantes (Figure 46C). Il existe donc une possible modification des CSM de moelle osseuse des malades qui présentent un OS.

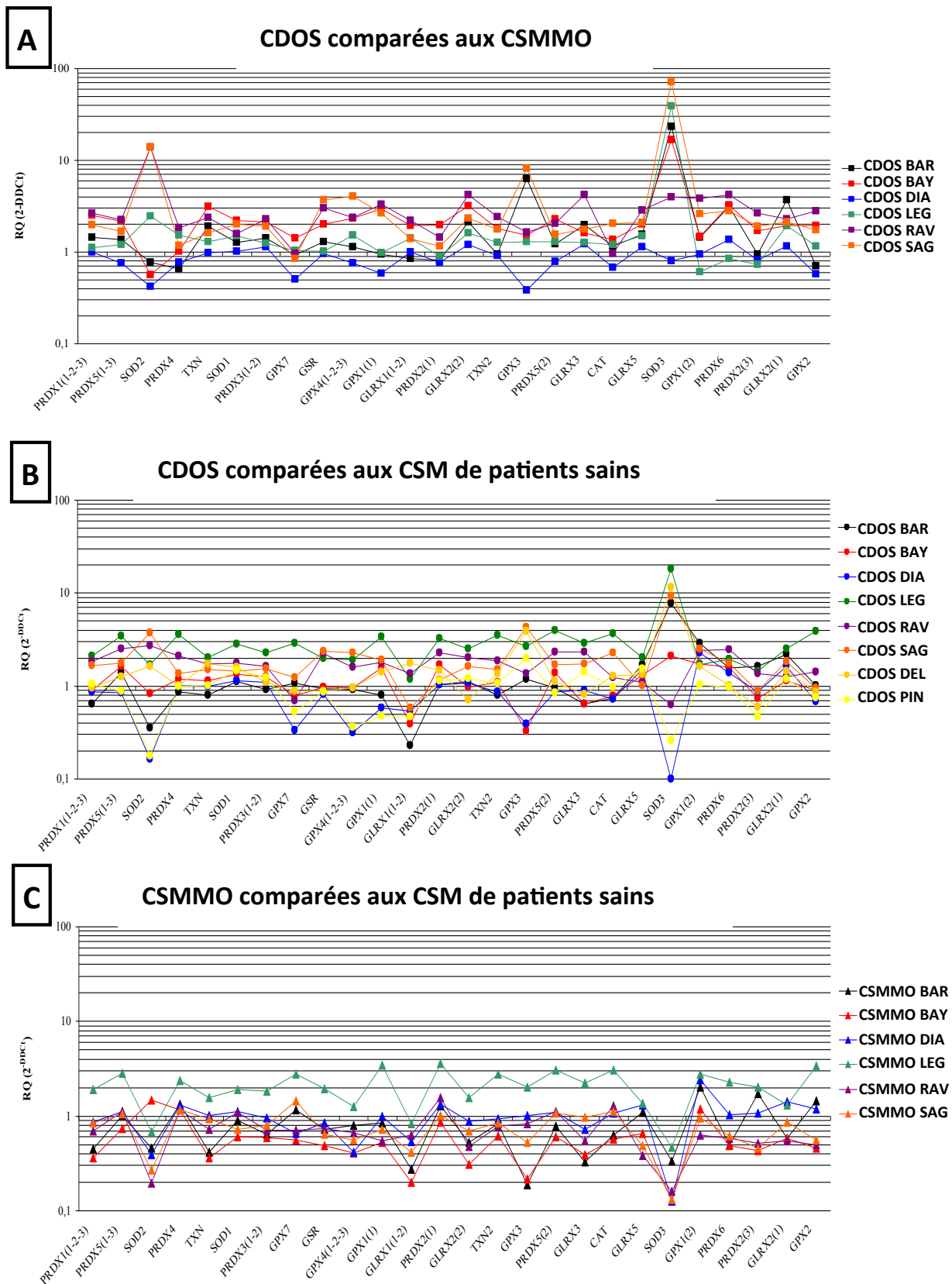


Figure 46 : profil anti oxydant analysant l'expression de 26 gènes impliqués dans la détoxification des ROS. Chaque courbe représente le rapport entre l'expression par RTqPCR des gènes d'intérêt

mesurés pour les CDOS d'un patient rapportées à celle des CSMMO correspondantes (a) ou rapportées à celle des CSM de patients sains (b) ou l'expression des gènes dans la population de CSMMO rapportée à celle des CSM de patients sains. Un ratio de 1 signifie une expression similaire. Les gènes sont classés de gauche à droite selon un ordre croissant de leur Ct, nombre de cycle nécessaire pour dépasser le niveau basal de détection de l'amplification.

Dans cette première analyse du PAO, aucune variation ne semble concordante avec un profil de mauvaise réponse à la chimiothérapie (pour rappel les tumeurs des patients BAR LEG RAV JUL PIN). De nombreux biais existent cependant : tous les prélèvements n'ont pas été réalisés au même stade de la prise en charge des malades de l'étude : tous les prélèvements de moelle osseuse sauf ceux de CSMMO DIA et LEG ont été réalisés avant la chimiothérapie néoadjuvante, et toutes les CDOS sauf les CDOS RAV ont été obtenues à partir de la pièce opératoire, donc après la chimiothérapie néoadjuvante. Par ailleurs, les CSM de patients sains sont essentiellement issues de malades ayant eu une prothèse totale de hanche. La moyenne d'âge de ces malades témoins avoisine 70 ans, alors que la moyenne d'âge des malades dans notre étude était de 21 ans.

Aussi ces résultats doivent être complétés avec l'intégration de plus de patients atteints d'OS mais ils constituent une piste intéressante à explorer à l'avenir.

5. Etude de la filiation par analyse du transcriptome

5.1. *Similitudes et différences*

Afin de progresser dans la caractérisation des CDOS, nous avons voulu explorer de manière globale les similitudes et différences des transcriptomes des CDOS et de leurs CSMMO correspondants. Dans l'hypothèse où les CDOS seraient des CSC, leur transcriptome pourrait être différent de celui des CSMMO des patients. Nous avons

utilisé la technique de séquençage des ARNm (RNAseq) qui donne des informations tant quantitatives que qualitatives de l'ensemble du transcriptome.

L'analyse des similitudes entre les différentes CDOS et CSMMO est présentée dans la Figure 47. Les CDOS et CSMMO présentait 92 à 99% de similitudes. De manière intéressante, les plus grandes similitudes n'étaient pas retrouvées entre les CDOS et les CSMMO de chaque malade respectivement mais entre les différentes CSMMO. Les CSMMO RAV-LEG, RAV-SAG, RAV-BAY, SAG-LEG, SAG-BAY présentait 99% de similitudes. Les CDOS BAR présentait le plus de différences par rapport aux autres CDOS et CSMMO.

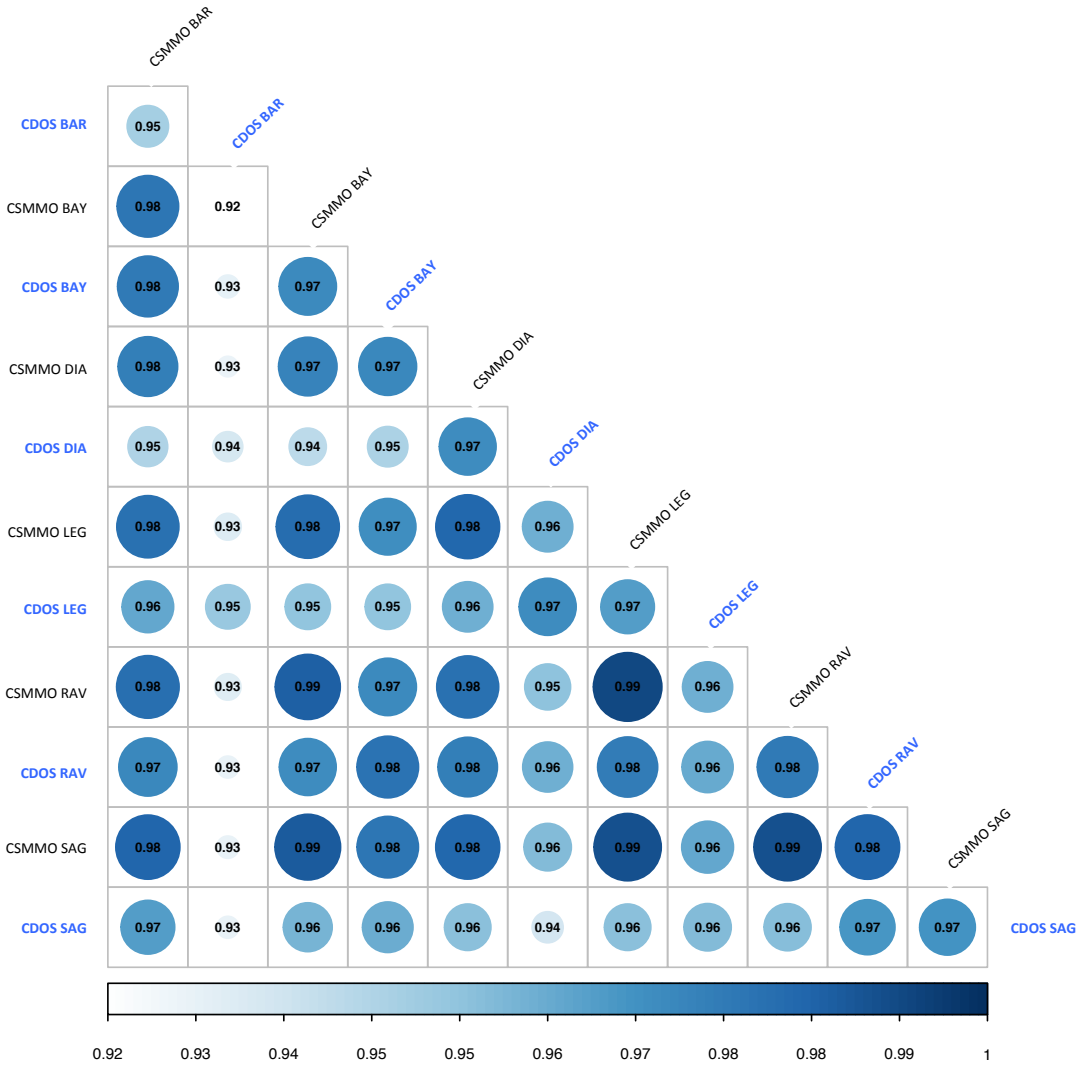


Figure 47 : analyse de corrélation entre les différentes cellules dérivées d'ostéosarcome (CDOS) et de moelle osseuse (CSMMO). Le chiffre présenté dans chaque cercle correspond à la proportion de similitudes entre les populations cellulaires.

L'analyse hiérarchique des différences entre les transcriptomes permettait de classer les différentes populations de CDOS et de CSMMO. Les CDOS BAR LEG RAV SAG présentaient plus de similitudes entre elles que par rapport à leurs propres CSMMO (Figure 48). Les CDOS et CSMMO DIA étaient très proches dans cette analyse.

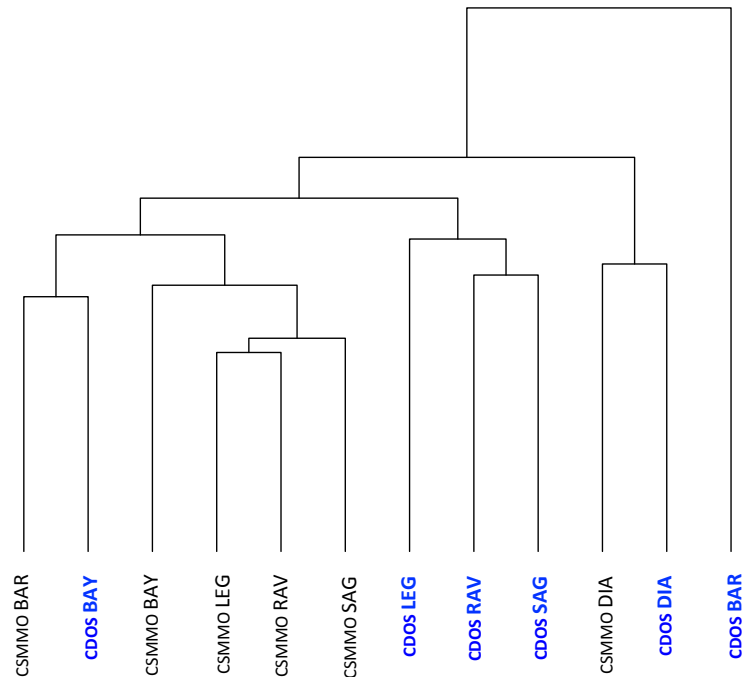


Figure 48 : représentation des différentes populations de CDOS et CSMMO après analyse de l'ensemble des transcrits en RNAseq. Les CDOS et CSMMO sont classées de manière hiérarchique en fonction des différences et similitudes de leurs transcriptomes.

Afin de rechercher des différences à l'échelle individuelle, les gènes estimés comme discriminants entre les différentes populations de CDOS et CSMMO ont ensuite été isolés puis étudiés en analyse en composante principale. Cette technique a permis de mettre en évidence que les CDOS BAR, DIA et LEG étaient éloignées entre elles d'une part, et des autres CDOS et CSMMO d'autre part (Figure 49). Il est à noter que les tumeurs des patients BAR et LEG étaient de mauvais pronostic.

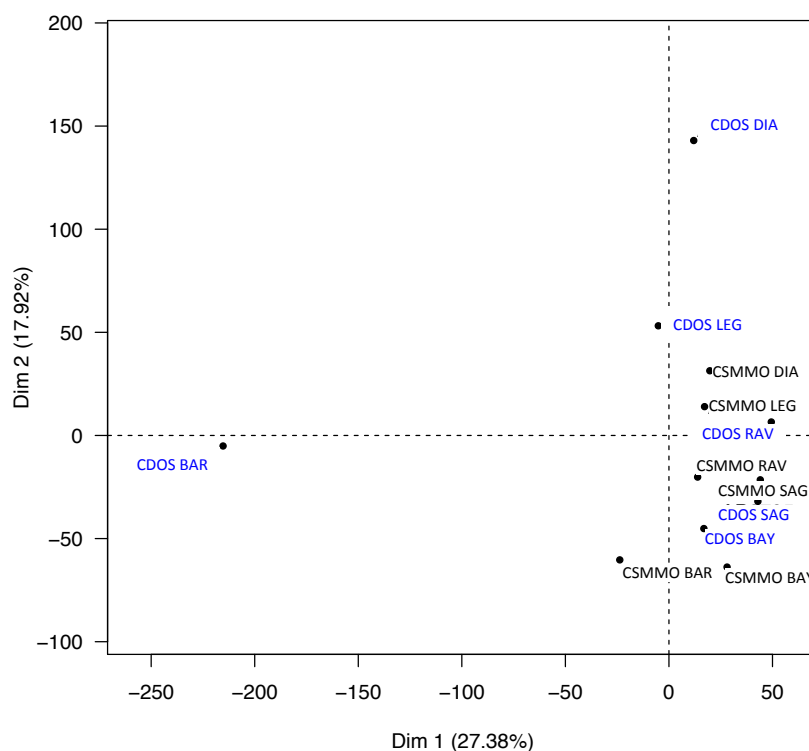


Figure 49: analyse en composante principale comparant les différentes populations de CSMMO et CDOS. Seuls les transcrits les plus discriminants sont utilisés pour cette analyse.

5.2. Synthèse

Les CDOS et les CSMMO présentaient plus de 90% de similitudes de leurs transcriptomes. Il y avait globalement plus de similitudes entre les CSMMO (exception faite de DIA) qu'entre les CSMMO et les CDOS d'un même patient. Au sein des CDOS, il existait des variations importantes. Les CDOS BAR, DIA et LEG semblaient plus éloignées des CDOS BAY, RAV et SAG. Il pourrait y avoir un lien avec le pronostic de la maladie, les tumeurs BAR et LEG ayant présenté une mauvaise réponse à la chimiothérapie.

Nous nous sommes demandés à quoi étaient liées les différences entre les CSMMO de DIA et les 5 populations de CSMMO. Les CSMMO de DIA étaient issues d'un prélèvement après la chimiothérapie néo-adjuvante. Toutefois, les CSMMO LEG qui pourtant conservaient des similitudes importantes avec les CSMMO des autres populations, étaient également issues d'un prélèvement de moelle osseuse avant chimiothérapie néo-adjuvante. Toute conclusion sur l'analyse du profil

transcriptomique global serait donc prématurée. Il est nécessaire d'intégrer plus de patients et des prélèvements plus homogènes par rapport au temps thérapeutique.

6. Analyse des grandes fonctions

Après avoir analysé le transcriptome indépendamment des fonctions de chacun des gènes, nous l'avons analysé en tenant compte des fonctions des gènes sur ou sous exprimés dans chaque populations de CDOS en comparaison au CSMMO. Après soustraction des valeurs du transcriptome des CSMMO aux CDOS pour chacune des 6 populations, nous avons retenu les 125 gènes communs pour lesquelles la différence était la plus positive pour les 6 populations puis la plus négative. Nous avons utilisé le logiciel mis à disposition par le String Consortium 2017© accessible en ligne (<https://string-db.org>).

6.1. Analyse de « nœuds » privilégiés dans les CDOS

Cette analyse a permis de mettre en évidence 3 principaux nœuds dont les gènes étaient plus exprimés de manière constante et significative dans les CDOS que dans les CSMMO (Figure 50).

Un 1^{er} nœud concernait le métabolisme des purines. La famille des purines contient notamment 2 bases azotées constitutives de l'ADN et l'ARN (adénosine et guanine). Les purines sont également constitutives de l'ATP (adénosine tri phosphate).

Un 2^{ème} nœud concernait l'Interféron, les ubiquitines. Dans ce groupe se trouve également des enzymes de réparation de l'ADN comme la Poly ADP Ribose Polymérase ou PARP. Cette enzyme serait impliquée dans la résistance aux traitements anticancéreux par réparation des dommages causés aux cellules cancéreuses par ces traitements (111)(112).

Un 3^{ème} nœud concernait l'angiogenèse, qui est un élément indispensable à la croissance et à l'envahissement tumoral.

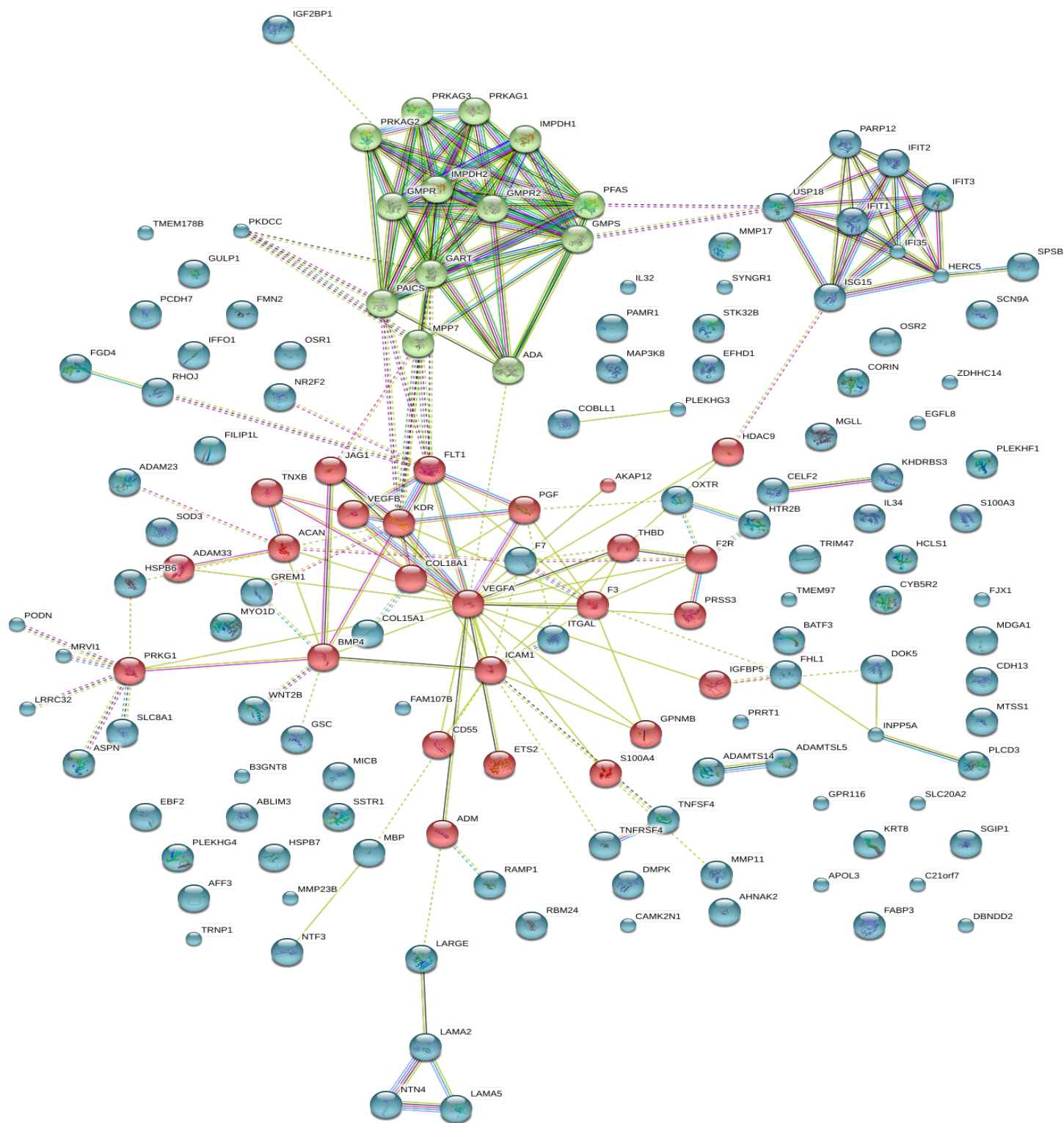


Figure 50: schématisation des relations entre les 125 protéines dont l'expression des gènes est significativement plus élevée dans les CDOS par rapport aux CSMMO ($p < 0,05$). Les différentes couleurs représentent des nœuds. Les protéines impliquées dans le métabolisme des purines sont représentées en vert. Les protéines impliquées dans le développement vasculaire sont représentées en rouge. Les protéines impliquées dans les PARP et interféron sont représentées en violet. Analyse faite à l'aide du logiciel en ligne String Network.

6.2. *Analyses de « nœuds » éteints dans les CDOS*

Cette analyse a permis de mettre en évidence 3 principaux nœuds dont les gènes étaient moins exprimés de manière constante et significative dans les CDOS que dans les CSMMO (Figure 51).

Un 1^{er} nœud concernait la guanine binding protein ou protéine G. Il s'agit d'une grande famille protéique impliquée dans la communication cellulaire, par la transmission de signaux extra cellulaires en intra cellulaire.

Un 2^{ème} nœud concernait des molécules impliquées dans la présentation d'antigène (HLA, CD74).

Un 3^{ème} nœud concernait différents facteurs de croissance comme le FGF, le récepteur du FGF (FGFR).

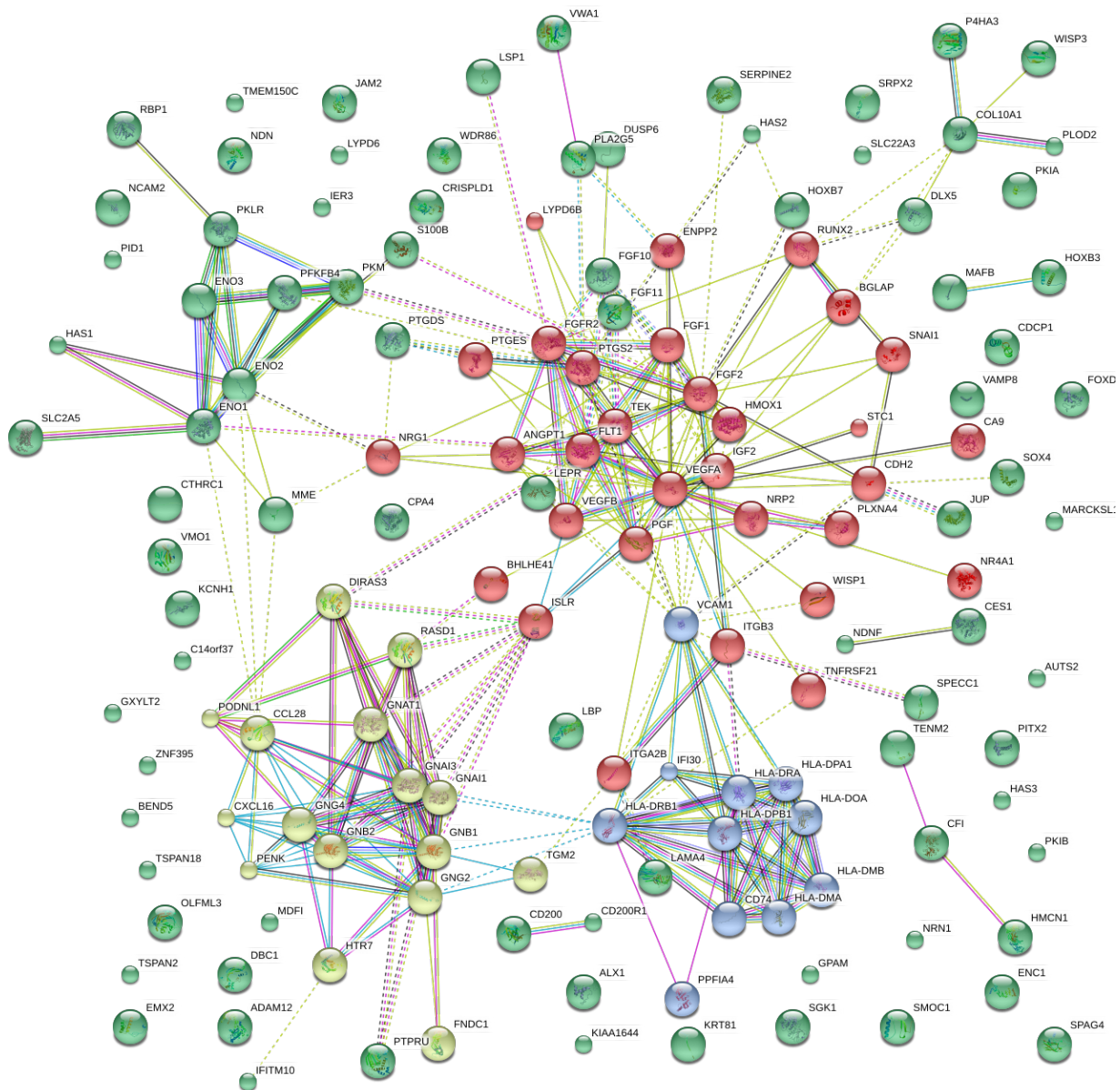



Figure 51: schématisation des relations entre les 125 protéines dont l'expression des gènes est significativement plus diminuée dans les CDOS par rapport aux CSMMO ($p < 0,05$). Les différentes couleurs représentent des nœuds. En vert clair est représenté le groupe qui concerne les protéines G. En violet est représenté le nœud qui concerne les protéines impliquées dans la présentation des antigènes. En rouge est représenté le nœud qui concerne le FGF et son récepteur entre autre. Analyse faite à l'aide du logiciel en ligne String Network.

6.3. Synthèse

Une certaine prudence doit être gardée en analysant ces résultats dans la mesure où il s'agit d'une représentation protéique des transcrits. Cependant, l'augmentation de



l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, dans la prolifération cellulaire par l'augmentation du métabolisme des purines ainsi que dans des mécanismes de réparation de l'ADN, associé à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la présentation d'antigènes afin de protéger la tumeur de l'hôte, pourraient être des éléments en faveur de caractéristiques de CSC ou de cellules pré tumorales.

7. Conclusion du chapitre

Les CDOS présentaient des variations qui les différenciaient des CSMMO correspondantes: la capacité de croissance prolongées en culture adhérente, la capacité à produire des sphères en milieu semi solide, l'expression de certains marqueurs tumoraux (c-kit), le métabolisme mitochondrial basal diminué, la présence d'anomalies cytogénétiques, la prépondérance de certaines fonctions protéiques (angiogenèse, métabolisme des purines, réparation de l'ADN), la diminution de certaines fonctions protéiques (présentation d'antigène). D'autre part, bien qu'il s'agisse de données expérimentales, les profils antioxydant des CDOS étaient également différents. Tous ces éléments pourraient correspondre à des anomalies caractéristiques de CSC ou de cellules pré tumorales. En effet, au state d'initiation de la tumeur, les anomalies pourraient être minimales par rapport aux anomalies, notamment cytogénétiques, objectivées dans les cellules de la tumeur constituée.

DISCUSSION

1. Cellules dérivées d'ostéosarcome : cellules de soutien de la croissance tumorale

Le développement tumoral *in vivo* ne peut être étudié sans le microenvironnement dans lequel il évolue. Le micro environnement tumoral est constitué de cellules, de facteurs solubles, de molécules de signalisation et d'une matrice extra cellulaire. Il soutient la croissance tumorale et son invasion des tissus alentours. Il protège la tumeur de l'immunité de l'hôte et favorise la résistance aux traitements (106). Dans une de nos études, nous avons montré que la co-injection de CSM de moelle osseuse de patients sains ou de CSM dérivées du tissu adipeux avec des cellules de la lignée MNNG-HOS entraînait une accélération du développement tumoral chez la souris Nude (37). Les CDOS ont également été co-injectées avec des cellules de la lignée MNNG-HOS dans le modèle murin Nude avec un effet de soutien de la croissance tumorale pour 6 populations de CDOS sur 7 (et 3 populations de CDOS sur 6 de manière significative). Pour 6 populations de CDOS sur 7, nous observions un effet pro-métastatique pulmonaire dans ce même modèle.

Des cellules d'origine mésenchymateuses soutenant la croissance tumorale sont rapportées dans la littérature. Il s'agit des Cancer Associated Fibroblast (CAF). Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que les CDOS étaient des CAF, issues des CSM. Les CDOS présentaient un aspect morphologique stellaire similaire à celui des fibroblastes *in vitro*. Les CDOS soutenaient la croissance tumorale *in vivo*, exprimaient l'ASMA ainsi que la *Vimentine*, autre marqueur de CAF (39). Ces 2 marqueurs n'étaient pour nous pas suffisamment discriminants pour assimiler les CDOS à des CAF puisque les CSM de patients sains les exprimaient également. Par contre, *S100A4* qui est considéré comme un marqueur de CAF également, était significativement plus exprimé par les 6 populations de CDOS en comparaison avec les CSMMO correspondantes. Dans

l'ensemble, tous ces éléments renforcent l'idée que les CDOS seraient des cellules de soutien de la tumeur. Cependant les CDOS semblent encore très proches des CSMMO en culture pour être désignées comme des fibroblastes. Les CDOS présentaient des capacités de différenciation ostéoblastique supérieures à celles des CSMMO mais conservaient leur multipotence, bien que diminuée dans le lignage adipocytaire et chondrocytaire. Par ailleurs, il a été rapporté que les CSM cultivées en présence de milieu conditionné de carcinome expriment l'ASMA (113). D'autre part, les CDOS de l'étude de Brune *et al.* exprimaient également l'ASMA (95). Les CDOS de notre étude ont été au contact de la tumeur de manière prolongée avant le prélèvement pour l'étude, ce qui pourrait expliquer la présence de l'ASMA en immuno histochimie. Les CDOS pourraient être des cellules stromales associées à la tumeur qui, dans d'autres études, auraient été désignées comme des CAF.

Dans la littérature, des anomalies cytogénétique des CSM du microenvironnement ont été rapportées dans le cadre de leucémies aiguës. Ces anomalies étaient simples (translocations ou délétions sur quelques chromosomes) et différentes de celles observées dans les cellules leucémiques. Leur présence était corrélée à une diminution de la survie (114). Dans les tumeurs solides épithéliales comme le carcinome mammaire, il a été également mis en évidence des mutations des cellules stromales non tumorales du microenvironnement (115). Dans le cas des CDOS DIA et SAG, nous avons mis en évidence des anomalies simples (trisomie 17q pour DIA, délétion de 1,25 mégabases en 21q pour SAG) qui ne correspondaient pas aux anomalies génomiques complexes retrouvées habituellement dans l'OS. A noter que les tumeurs des patients DIA et SAG correspondaient à des OS avec une bonne réponse à la chimiothérapie, donc de bon pronostic. Les cellules de l'hôte au contact de la tumeur pouvant présenter des anomalies génétiques, les CDOS pourraient être des cellules stromales du microenvironnement tumoral, transformées par la tumeur.

Dans la pathologie cancéreuse, le métabolisme est anormal et occupe une place prépondérante. En effet, les cellules tumorales requièrent de l'énergie et des métabolites pour l'expansion et l'invasion tumorale. Le métabolisme glycolytique est privilégié à la place du métabolisme oxydatif (Figure 52), pourtant beaucoup plus rentable en génération d'ATP (1 molécule de glucose donne 2 ATP par la voie glycolytique contre 38

ATP par la voie de la chaîne respiratoire). C'est ce qui est communément appelé l'effet Warburg. Toutefois, une glycolyse élevée permet une production suffisante d'ATP ainsi que des précurseurs anaboliques, avec la voie du pentose phosphate. Cette dernière génère du ribose-5-phosphate pour la production de nucléotides. Elle produit également le NADPH, dont la fonction réductrice sera nécessaire pour la synthèse des nucléotides et des lipides. Les cellules souches ont également un métabolisme glycolytique préférentiel (116).

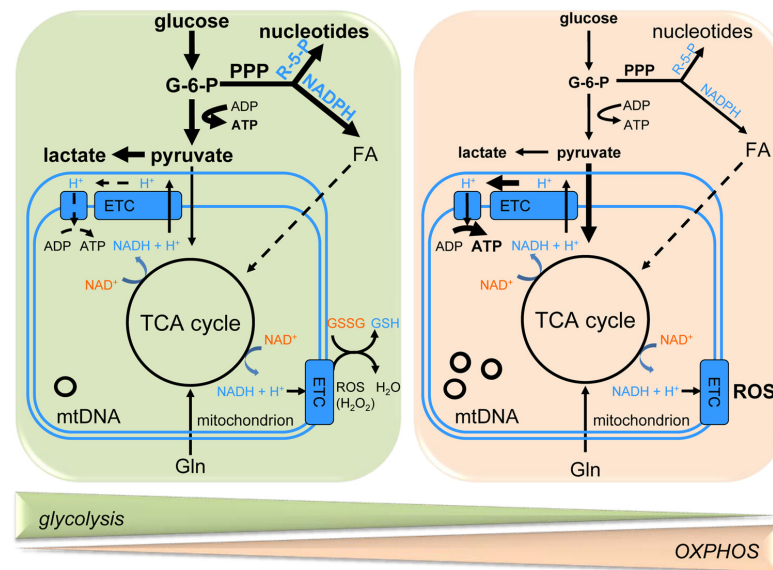



Figure 52 : différence de métabolisme entre une cellule souche pluripotente à gauche en mode de fonctionnement glycolytique prédominant et une cellule différenciée à droite avec un fonctionnement métabolique d'oxydoréduction principalement. ETC, electron transport chain; FA, fatty acid; G-6-P: glucose-6-phosphate; GSH; glutathione; GSSG, glutathione disulfide; mtDNA, mitochondrial DNA; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PPP, pentose phosphate pathway; R-5-P, ribose-5-phosphate; ROS, reactive oxygen species; TCA, tricarboxylic acid cycle.

D'après Zhang *et al.*, 2012(116).

Nous avons mis en évidence une diminution du métabolisme mitochondrial basal en normoxie dans les CDOS, alors qu'il n'y avait pas d'anomalie similaire dans les CSMMO. Il a été montré que les CSM au contact de lignées d'OS présentent une reprogrammation de leur métabolisme (effet Warburg des cellules tumorales sur les CSM) (106). Cette permutation serait induite par les ROS. En conséquence, les CSM fonctionnent avec un métabolisme glycolytique en normoxie. La production des lactates est évacuée de la cellule via le transporteur trans membranaire Monocarboxylate



Transporteur 4 (MCT-4), dont le gène est situé en 17q25. Ces lactates sont récupérés par les cellules tumorales via le transporteur MCT-1. Ils sont métabolisés dans le cycle de Krebs des cellules tumorales d'une part. Ils ont un effet d'augmentation des capacités de migration des cellules tumorales d'autre part.

Bien que nous n'ayons pas retrouvé de modification d'expression de *MCT-1* ou *MCT-4* en RNAseq, la diminution du métabolisme mitochondrial basal en normoxie des CDOS pourrait être la conséquence d'une reprogrammation de leur métabolisme induit par les cellules tumorales. Il s'agit d'un nouvel argument soutenant l'hypothèse que les CDOS pourraient être des cellules de soutien de la tumeur. Par ailleurs, nous avons mis en évidence des modifications du potentiel antioxydant (PAO) des CDOS par rapport aux CSMMO. Ces données concernent de petits effectifs. Nous ne pouvons donc pas conclure mais il s'agit d'une piste intéressante à explorer d'autant plus que des anomalies du PAO pourraient être corrélées au pronostic dans les leucémies (109).

Dans l'hypothèse où les CDOS seraient des cellules de soutien de la tumeur, elles pourraient exercer un rôle immunomodulateur afin de protéger la tumeur de l'hôte. Cela permettrait à la tumeur de croître et de poursuivre l'envahissement des tissus adjacents. Nous avons observé une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la présentation d'antigène par les CDOS en comparaison aux CSMMO, notamment le CD74 (impliqué dans la formation du Complexe Majeur d'histocompatibilité de classe II). Nous avons également observé que l'expression de *IL8* (cytokine pro inflammatoire) était quasiment 2 fois moins exprimée par les CDOS que par les CSMMO, à l'exception des CDOS RAV qui l'exprimaient de manière quasiment similaire aux CSMMO. Ces éléments pourraient être de nouveaux arguments en faveur du rôle de cellules associées à la tumeur des CDOS (117).

Tous les microenvironnements physiologiques ne sont pas équivalents et un tissu interstitiel commun ne sera pas comparable à un microenvironnement d'une niche endostée, ni même à celui d'un cartilage de croissance d'une épiphyse fertile (Figure 53). Les CSM et les fibroblastes sont rares dans le microenvironnement osseux à l'état physiologique. Ils représentent 0,01% des cellules mononuclées de la moelle osseuse (118). Cependant Brune *et al.* rapportaient un nombre augmenté de CSM/fibroblastes au

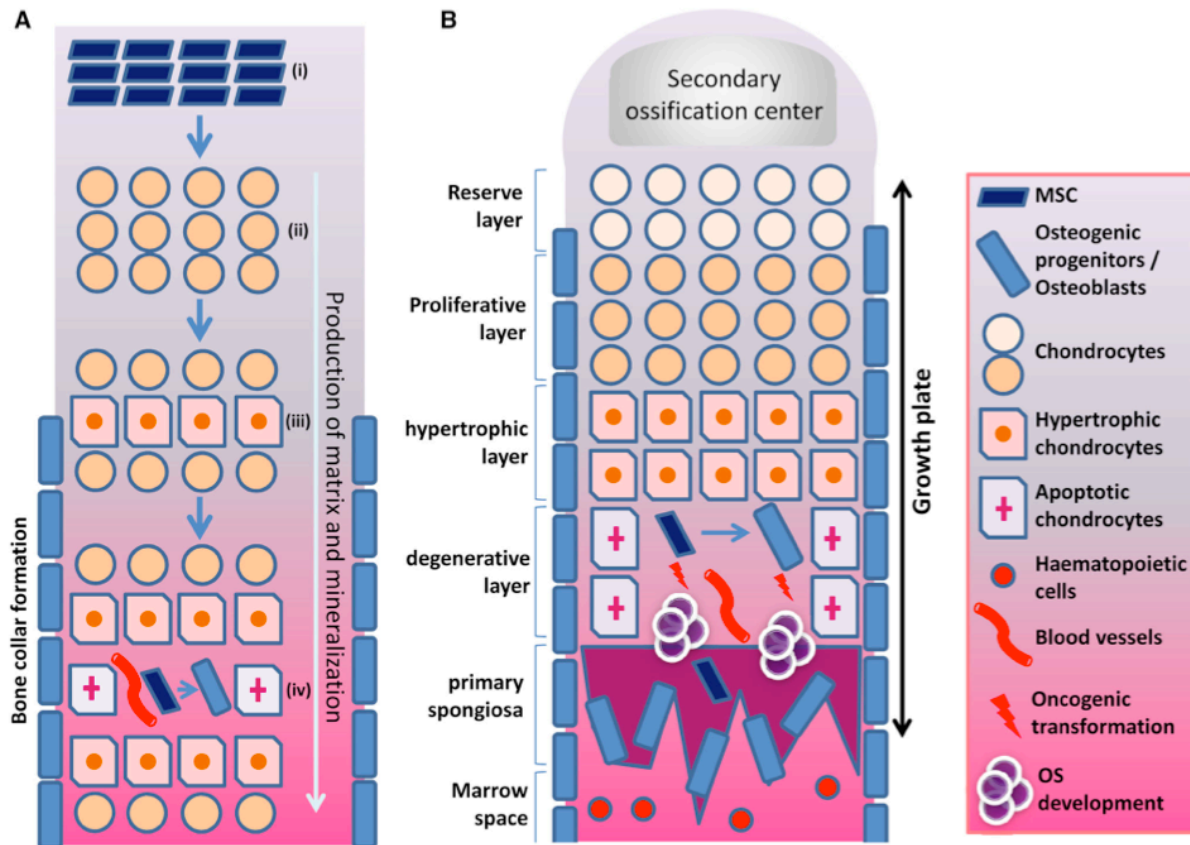


Figure 53: la niche de l'ostéosarcome au sein de la plaque de croissance. (A) Lors du processus d'ossification enchondrale, les CSM (i) se différencient en chondrocytes (ii) qui vont former le foyer d'ossification primaire. Les chondrocytes hypertrophiques (iii) induisent l'ossification de la matrice cartilagineuse et contrôlent la transformation des progéniteurs périchondraux en ostéoblastes. Ceux-ci envahissent le cartilage et produisent la matrice ostéoïde (iv). (B) Le cartilage de croissance est constitué de multiples couches cellulaires divisées en : (1) une réserve de cellules qui maintiennent le pool de cellules germinales, (2) une couche de chondrocytes proliférants, (3) une couche de chondrocytes synthétisant le collagène X, (4) une couche de chondrocytes apoptotiques et (5) une couche d'ossification correspondant à l'os spongieux où les ostéoblastes recouvrent la matrice cartilagineuse par de l'os minéralisé. L'espace médullaire formé sous la plaque de croissance est le lieu de la niche hématopoïétique. L'OS se développerait dans la plaque de croissance suite aux transformations oncogéniques des CSM ou des progéniteurs ostéoblastiques qui en dérivent.

D'après Alfranca *et al.*, 2015 (120).

sein des OS, de l'ordre de 1000 fois plus par rapport à la moelle osseuse ou au tissu adipeux de patients sains (95). Les cellules stromales associées à la tumeur pourraient provenir des CSM présentes dans le cartilage de croissance à proximité de la tumeur (Figure 53). Ayant des capacités de migration, les CSM pourraient également provenir

d'autres tissus via la circulation sanguine (119). Cette migration serait réalisée via le récepteur SDF1 (Stromal Cell Derived factor 1), ligand de CXCR4. SDF1 est également impliqué dans la progression tumorale de carcinomes et également de sarcomes comme le rhabdomyosarcome. Après le recrutement des CSM par la tumeur, l'effet protumoral des CSM sur la tumeur pourrait être dû à la cytokine CCL5. Il s'agit du Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted ou RANTES (33). Nous n'avons toutefois pas retrouvé de différence d'expression entre les CDOS et les CSMMO. Cependant, RANTES était détecté dans le sécrétome des CDOS DEL.

2. Des CSM avec des caractéristiques de CSC seraient à l'origine des OS de haut grade

L'OS est une tumeur très complexe et très polymorphe. Il s'agit d'une tumeur à génétique complexe. Afin de progresser dans la connaissance de cette pathologie, l'étude de lignées d'OS est souvent le seul matériel sur lequel travailler pour mieux appréhender cette maladie et ses mécanismes. Cependant, les lignées telles que MNNG-HOS, SaOS2, MG63 par exemple ont été décrites respectivement en 1975 pour les 2 premières (121)(122) et 1977 pour la dernière (123). Ces lignées sont anciennes, ne sont pas toutes tumorigènes *in vivo* et ne produisent pas toujours de matrice ostéoïde *in vivo*, ce qui pose un problème important puisque cette matrice ostéoïde est indispensable au diagnostic d'OS. Des cellules sarcomateuses sans matrice ostéoïde correspondent à un sarcome indifférencié et non à un OS. Ces lignées pourraient donc être assez éloignées de la tumeur originelle. Ainsi l'extrapolation à l'OS en pratique clinique de résultats obtenus lors de l'étude de lignées d'OS humains doit se faire prudemment (124)(125). A titre d'exemple, aucune double mutation de *BRCA1/2* n'était présente dans différentes lignées d'OS humains, alors qu'elle apparaît présente dans les 29/31 OS étudiés de la publication de Kovac *et al.* en 2015 (111).

Différentes lignées primaires d'OS humains ont été isolées et sont rapportées dans la littérature. Toutefois, leur caractérisation cytogénétique fait souvent défaut. Or, l'OS étant un cancer à génétique complexe, cette caractérisation apparaît aujourd'hui

indispensable. En effet, l'instabilité chromosomique est prépondérante dans l'OS et les altérations chromosomiques seraient potentiellement un marqueur pronostic (122)(126).

Dans notre étude, il nous est apparu important de travailler sur le concept de CSC dans l'OS puisqu'il serait relié aux phénomènes de résistance au traitement, de récurrence locale et de progression métastatique. La caractérisation de ces CSC représente donc un enjeu important. Selon l'hypothèse de la présence de CSC dans une tumeur, il s'agirait de cellules rares au sein de la tumeur, donnant naissance à l'essentiel de la tumeur qui, dans le cas de l'OS de haut grade, est constitué de cellules tumorales très remaniées génétiquement et qui synthétisent une matrice ostéoïde (126). Dans l'OS, selon le modèle de développement tumoral hiérarchique, il pourrait être imaginé un petit contingent de CSC avec des caractéristiques de CSC, à renouvellement lent, avec une absence ou peu d'anomalies caryotypiques. Ce contingent de CSC s'auto-entretiendrait et, par divisions asymétriques, pourrait donner la composante principale de la tumeur qui est ostéoblastique, fibroblastique et/ou chondroblastique et à génétique complexe. L'OS représente sans doute un modèle de tumeur dont le développement est marqué par le phénomène de chromothripsis, un remaniement massif du génome, non pas par accumulation de mutations mais au cours d'un seul événement cellulaire. Cet événement de réarrangements génétiques massifs apparaît avec une fréquence 10 fois supérieure dans les tumeurs osseuses par rapport à l'ensemble des tumeurs, l'incidence étant respectivement de 25% et 2-3% (126)(127)(128). Compte tenu des anomalies cytogénétiques majeures, ces cellules tumorales devraient subir une apoptose. Leur capacité d'envahissement tumoral proviendrait alors soit d'un remaniement apportant un avantage sélectif permettant la réparation d'urgence de l'ADN, soit ces cellules auraient une survie et un temps de division limité mais seraient renouvelées par un contingent de CSC.

L'analyse de la fonction de réparation de l'ADN dans l'OS apporte des informations intéressantes. En effet, les mécanismes de réparation de l'ADN sont altérés. Par exemple, des mutations des gènes *BRCA* retrouvées dans plus de 80% des OS pourraient expliquer un déficit de réparation homologue de l'ADN, qui, en retour, entrainerait l'activation de mécanismes de réparation rapide de l'ADN par l'intermédiaire des Poly ADP Ribose Polymerase (PARP). Ce mécanisme pourrait

expliquer la survie des cellules tumorales malgré les anomalies cytogénétiques majeures qu'elles présentent. L'implication de ces mécanismes génétiques ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques de l'OS, avec notamment l'utilisation d'inhibiteur de la poly ADP ribose polymérase (111)(112).

Au stade pré tumoral, des anomalies cytogénétiques minimales pourraient être invisibles lors de l'analyse du caryotype. On peut imaginer que les CSC contiennent des anomalies minimales. Kovak *et al.* ont défini 12 gènes qu'ils ont considéré comme moteur dans la genèse de l'OS (111) : *BRCA2*, *BAP1*, *RET*, *MUTYH*, *ATM*, *PTEN*, *WRN*, *RECQL4*, *ATRX*, *FANCA*, *NUMA1* et *MDC1*. Pour tous ces candidats qui auraient un rôle moteur, plus ou moins combiné, dans la transformation cellulaire en OS, nous n'avons pas retrouvé de différence d'expression entre les CDOS et les CSMMO lors de notre analyse du transcriptome.

De manière intéressante, *P53* et *PRB* ne sont pas présentes dans ces 12 gènes. Les mutations impliquant *P53* et *PRB* sont fréquemment retrouvées dans l'OS. Comme nous l'avons abordé dans l'Introduction (7. Origine de l'ostéosarcome), un OS peut être obtenu chez la souris par l'extinction seule de *P53* dans les progéniteurs ostéoblastiques (73), ce qui n'est pas le cas chez l'Homme (75). La mutation ou l'absence de *P53* est souvent rapportée comme ayant un rôle central dans le processus de cancérogenèse de l'OS. Il semblerait plus que ces anomalies jouent un rôle permissif de survenue du processus de cancérogenèse par l'absence de l'anti-oncogène *P53* efficace, soit par inefficacité de *P53* (délétion ou mutation), soit par inhibition par hyperexpression de *MDM2* par exemple. Un argument en faveur de cette hypothèse est que tous les malades présentant une maladie de Li Fraumeni (mutation congénitale de *P53*) ne développent pas un OS (129). En ce qui concerne *PRB*, Wang *et al.* avaient pu obtenir un OS en éteignant *PRB* et en induisant l'hyperexpression de *cMYC* dans des CSM humaines (75). Toutefois, tout comme *P53*, *PRB* est très régulièrement muté dans les OS mais pas de manière systématique (inactivation de *RB1* dans 50% des OS)(129).

Dans notre étude, il n'y avait pas de différence d'expression entre les CDOS et les CSMMO en ce qui concerne *P53*, *MDM2* et *PRB*. Il est à noter que nous n'avons pas fait d'analyse qualitative des ARN et donc nous n'avons pas éliminé une mutation de l'un de ces gènes qui aurait pu être à l'origine d'une protéine non fonctionnelle.

Au cours de notre étude, 9 biopsies d'OS ont été mises en culture et pour 6 patients un prélèvement de moelle osseuse a été mis en culture (CSMMO). Les populations cellulaires dérivées de ces OS, désignées CDOS, présentaient les mêmes marqueurs de surface qui caractérisaient les CSM dérivées de la moelle osseuse des patients (CSMMO). A titre systématique nous avons réalisé une analyse cytogénétique pour toutes les populations de CDOS. Les populations de CDOS, à l'exception de 2, ne présentaient pas d'anomalie de caryotype, tout comme les 6 populations de CSMMO des patients. Nous avons retrouvé des anomalies chromosomiques seulement dans 2 populations de CDOS : celles dérivées de l'OS des patients DIA et SAG. Une analyse d'hybridation génomique comparative sur puces (CGH array) a permis de préciser les réarrangements observés : pour la population de CDOS DIA, il s'agissait d'une trisomie du bras long du chromosome 17q tandis que pour la population de CDOS SAG, il s'agissait d'une délétion de 1,25 mégabases du chromosome 21q et d'une délétion de plus petite taille, 165 kilobases, sur le bras court du chromosome 16. De tels réarrangements ne sont pas comparables en nombre à ceux observés dans la masse tumorale des OS conventionnels.

Tout comme Brune *et al.* (95), qui ne retrouvaient pas de caractéristiques de cellules tumorales pour 5 des 6 biopsies d'OS mises en culture sur plastique ou en milieu semi-solide, nous n'avons pas isolé de cellules tumorales caractéristiques des OS conventionnels de haut grade. Ces cellules tumorales hautement remaniées ne survivent que rarement en culture ; ce qui est à relier avec le peu de lignées d'OS disponibles dans la communauté scientifique ; par exemple seulement 7 lignées d'OS sont distribuées par l'ATCC (American Type Culture Collection).

Les CDOS isolées au cours de notre étude pouvaient correspondre selon notre hypothèse à des CSM pré-tumorales ou à des CSM avec des propriétés de CSC. Dans ce contexte, les réarrangements minimes observés dans les populations CDOS DIA et SAG apparaissaient comme une piste intéressante pour identifier des événements favorables à la transformation tumorale.

Concernant la duplication de 30 mégabases en 17q identifiée dans les CDOS DIA, il s'agit d'une région où l'on retrouve un gain de matériel génétique dans 2/3 des cas des OS d'après Kovac *et al.* (111). Cette région 17q tripliquée contient 482 gènes dont *COL1A1*. Cette région contient également, entre autre, le gène *BRCA1*, qui était muté dans

les 29/31 OS étudiés par Kovac *et al.* Cependant, notre comparaison transcriptomique par RNAseq n'a pas révélé de différence d'expression des gènes compris dans cette région ; aucun des gènes n'est apparu plus exprimé dans la population CDOS DIA par rapport à la population CSMMO DIA. Nous avons retrouvé la présence de cette anomalie sur la biopsie où cette trisomie était associée à de multiples anomalies de l'OS conventionnel. Cette anomalie était donc toujours présente malgré la chimiothérapie néoadjuvante puisque les CDOS sont issues de la pièce de résection. En revanche, cette trisomie n'était pas présente dans les métastases pulmonaires réséquées un an après le traitement de l'OS du fémur distal. Cela pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la tumeur : le clone à l'origine de la métastase ne contenait possiblement pas cette anomalie. Cette anomalie n'était alors pas l'origine inconditionnelle de la formation de l'OS du patient DIA.

Concernant les délétions identifiées dans les CDOS SAG, la délétion de 1,25 mégabases du chromosome 21 comprenait le gène *RUNX1*. Cependant, le transcrit *RUNX1* était exprimé quasiment de manière équivalente dans les CSMMO et CDOS SAG. Il existait également une délétion de petite taille de 165 kilobases du bras court du chromosome 16 emportant le gène *ERCC4*. Ce gène est impliqué dans les maladies chromosomiques cassantes de type Fanconi. Bien que ce gène soit récessif, il s'agit d'une constatation intéressante puisque il pourrait être impliqué dans les remaniements majeurs du génome lors du mécanisme de chromothripsis. Il n'y avait toutefois pas de différence d'expression de *ERCC4* entre les CSMMO et CDOS SAG. Nous n'avons pas pu déterminer si ces délétions étaient présentes dans la biopsie du patient SAG. Ce gène était toutefois plus exprimé dans les CDOS des 5 autres populations en comparaison aux CSMMO respectives.


Nous avons utilisé différentes techniques pour tenter d'identifier des CSC au sein des biopsies d'OS, tout particulièrement la technique de culture en milieu semi solide. Dans notre étude, il existait donc une sous population cellulaire des CDOS capable de former des sphères (sauf pour les CDOS DIA), donc possiblement des CSC. L'incidence de survenue des sphères était très variable avec une fréquence de survenue entre 0,7 et 70.10^{-5} . Dans l'étude de Brune *et al.*, les taux de survenue des sphères dans 2 populations de CDOS étaient respectivement de 558.10^{-5} et 885.10^{-5} (95). Nous avons donc une fréquence au moins 10 fois inférieure, qui peut être expliquée par des

différences de protocole telles que le renouvellement en bFGF tous les 2 jours. Dans cette même étude de Brune *et al.*, les CDOS dérivées de 5 des 6 biopsies d'OS cultivées en milieu semi solide (ou après culture sur plastique) avaient un caryotype normal, tout comme dans notre étude bien que leurs CDOS formaient 10 fois plus de sphères que dans notre étude. Les auteurs ont conclu que seules des cellules stromales non tumorales étaient isolées en culture à partir de biopsies d'OS, bien que dans un cas le caryotype était très remanié.

Encore actuellement, seulement 2 études (Adhikari *et al.*, 2010 et Skoda *et al.*, 2016) ont rapporté l'isolement de 2 populations de CDOS (BCOS et OSA-13, respectivement) qui induisaient un développement tumoral chez des souris immunodéficientes (85)(89). Cependant, le caryotype des cellules BCOS et OSA-13 n'a pas été analysé ou discuté et la présence de la composante ostéoïde caractéristique d'un OS n'a de même pas été montrée ou discutée dans les tumeurs induites par ces CDOS.

Dans notre démarche d'isolement de CSC d'OS, nous n'avons pas favorisé l'utilisation de marqueurs de surface des cellules souches. En effet, le mode de culture influence l'expression de gènes qui permettent le maintien des caractéristiques de cellules souches. Nous avons constaté que les cellules de la lignée MNNG-HOS exprimaient plus fortement *OCT4* (>200X), *SOX2* (>50X) et *NANOG* (>9X) lorsqu'elles étaient cultivées en milieu semi solide par rapport aux conditions de culture avec adhérence (37). Nous n'avons donc pas recherché à analyser l'expression de gènes « souche » sur les cellules en culture en milieu semi solide. Il est pourtant intéressant de noter que seule l'expression de *SOX2* a été associée au caractère tumoral des CSC isolées par Skoda *et al.* à partir d'OS pédiatriques, dans la population de CDOS désignées OSA-13 (89).


Un autre aspect caractéristique des CSC serait leurs capacités de division potentiellement illimitées. Aussi, la culture prolongée peut être une technique associée intéressante pour différencier des CSM-CSC des CSM « normales » qui devraient avoir des capacités de division plus limitées. Dans notre étude, certaines CDOS avaient des capacités de croissance en flasque augmentées par rapport à celles des CSMMO, tout particulièrement les CDOS DEL. Cependant, elles n'étaient pas tumorigènes *in vivo*, comme toutes les autres populations de CDOS ou de CSMMO.



L'observation de la croissance tumorale *in vivo* comme preuve unique du potentiel tumoral d'une population cellulaire peut être discutable. Pour exemple, la lignée HOS, établie à partir d'un OS humain, n'est pas tumorigène; elle peut être amplifiée en culture mais elle n'induit pas de tumeur chez la souris. Seul l'addition d'un traitement par un agent mutagène (Méthylnitronitrosoguanidine ou MNNG) ou par un agent viral (Kirsten sarcoma virus) a permis d'obtenir des lignées dérivées : les lignées MNNG-HOS (ATCC CRL-1547) et KHOS (ATCC CRL-1545) qui induisent un développement de tumeurs chez la souris immunodéficente (101)(102). Dans le travail de Funes *et al.* en 2007 (130), des CSM humaines ont été immortalisées en culture par l'expression de la transcriptase inverse de la télomérase (*hTERT*), puis ont été modifiées par 3 hits oncogéniques supplémentaires qui permettaient de diminuer les fonctions de P53 et de RB1 et de stabiliser MYC. Ces CSM avec 4 hits oncogéniques n'étaient cependant pas capables d'induire de tumeur chez la souris Nude. Dans une étude de notre équipe, ces CSM 4 hits ont révélé leur potentiel tumoral *in vivo* après une exposition longue à de faibles doses de 7 pesticides (131). Pantic a critiqué le mode de caractérisation des CSC par la technique *in vivo* (132). Un des arguments était que cette technique ne tient pas compte de la réelle interaction entre la tumeur et l'hôte humain qui est différent de l'hôte murin. Ainsi d'authentiques CSC pourraient ne pas être tumorigènes dans le modèle murin. Nous n'avons toutefois pas d'autre solution accessible aisément *in vivo* pour discriminer des cellules normales de cellules pré-tumorales ou tumorales.

3. Critiques de l'étude

Le matériel de notre étude est original, à savoir la tumeur avec les propres CSM dérivées de moelle osseuse du même malade. Cependant, nous avons peu de cas d'OS dans notre étude. Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion mais qu'émettre des hypothèses compte tenu du manque de puissance de l'étude. D'autre part, notre matériel d'étude n'est pas parfaitement homogène. L'OS est une tumeur rare, la biopsie diagnostique est réalisée en urgence, ce qui rend difficile l'organisation pour la conservation et le transport des prélèvements pour la recherche puis leur prise en



charge. Le matériel disponible est de petit volume sur la biopsie mais également sur la pièce d'exérèse pour ne pas perturber l'analyse de la réponse à la chimiothérapie par les médecins pathologistes. Aussi, certains prélèvements tant sur la tumeur, pour obtenir les CDOS, que sur les crêtes iliaques pour obtenir les CSMMO, ont été réalisés avant la chimiothérapie néoadjuvante, d'autres ont été réalisés après. Cette chimiothérapie pouvant induire des différences dans nos résultats, nous en avons tenu compte dans nos analyses.

Lorsque nous avons eu recours aux CSM dérivées de moelle osseuse de patients sains, il s'agissait de CSM de patients plutôt âgés puisqu'ils étaient pris en charge pour une prothèse totale de hanche. La constitution d'une base de données sur la caractérisation des CSM à différents âges de la vie est en cours de réalisation par le Laboratoire LNOx à la Faculté de Médecine de Tours. Nous pourrions ainsi analyser de nouveau nos données, notamment les PAO, en appariant l'âge pour les analyses utilisant comme référence les CSM dérivées de moelle osseuse de patients sains.

Au cours de la période d'étude, les techniques ont évolué. A titre d'exemple, nous utilisons de manière courante la RT-qPCR pour l'analyse des transcrits. Puis nous avons eu recours à l'analyse en RNAseq, plus récemment. Nous avons ainsi pu vérifier nos résultats précédemment établis en RT-qPCR. Par ailleurs, le RNAseq est une analyse transcriptomique. Nous n'avons pas confirmé nos résultats par une analyse protéique par Western Blot par exemple. Enfin, nos données de RNAseq étaient quantitatives. Nous n'avons pas encore recherché d'éventuelles mutations des transcrits.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

1. Conclusion

Lors des recherches bibliographiques des études portant sur les CSC dans l'OS, deux éléments importants font souvent défaut pour la caractérisation de lignées de CSC dérivées d'OS.

Le premier est l'analyse cytogénétique comme par exemple dans les études d'Adhikari *et al.*, Skoda *et al.*, Yang *et al.* (85)(89)(91). Pour nous, en cas d'isolement de CSC et d'obtention d'une tumeur *in vivo*, il nous semble indispensable d'inclure une analyse cytogénétique à la recherche d'anomalies caryotypiques majeures, tant numériques que structurelles, qui signent l'instabilité chromosomique qui est caractéristique des cellules tumorales de l'OS (126).

Le second est l'analyse histologique des tumeurs formées *in vivo*. Pour nous, la caractérisation d'OS devrait comporter une recherche systématique de la matrice ostéoïde sécrétée par les cellules tumorales, indispensable pour diagnostiquer un OS. En effet, un dépôt de fibrine peut être confondu avec une matrice ostéoïde pour une personne peu exercée à l'observation d'OS.

L'OS est une tumeur très complexe avec peu d'éléments spécifiques. Pour nous, les deux éléments que nous venons de décrire sont déterminants pour établir le diagnostic. Aussi, leur recherche nous semble indispensable.


En conclusion, les CDOS présentent des caractéristiques de CSC, sans toutefois pouvoir l'affirmer de manière formelle. Ne pouvant l'affirmer, nous avons émis l'hypothèse que les CDOS pourraient être des cellules stromales associées à la tumeur.

Ces résultats ont été proposés pour publication dans *International Journal of Molecular Sciences*, special issue : Current Advances in Soft Tissue and Bone Sarcoma.

2. Perspectives

Lors de l'analyse des profils antioxydants, nous avons mis en évidence des anomalies d'expression des gènes impliqués dans l'oxydo-réduction des CDOS. Nous avons également découvert que les CSMMO présentaient des différences d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif, en comparaison à des CSM de patients sains. Ces anomalies pourraient correspondre à des anomalies transitoires réactionnelles à la maladie. Elles pourraient correspondre également à des anomalies systémiques. Nous projetons de poursuivre nos recherches dans le but de mettre en évidence un potentiel élément pronostic dans ces anomalies. L'objectif serait d'identifier un profil antioxydant qui aurait une valeur pronostique afin d'adopter, dès la prise en charge diagnostique des malades, une prise en charge thérapeutique plus adaptée. Ce projet intitulé OSTEONOX a fait l'objet de l'obtention d'une bourse de l'association InfoSarcome (<http://www.infosarcomes.org>). Chez des malades présentant un OS, l'objectif est d'analyser le profil anti oxydant sur les cellules mononuclées totales de la moelle osseuse et sur les CSM isolées en culture en corrélant ensuite les résultats à la réponse de la tumeur à la chimiothérapie. Le but serait de déterminer un profil antioxydant à risque de mauvaise réponse à la chimiothérapie et ainsi adapter le traitement dès le diagnostic. Pour cette étude, il sera nécessaire de ponctionner 10 mL moelle osseuse aux dépens de la crête iliaque lors de l'anesthésie générale réalisée pour la biopsie chirurgicale. Les analyses du profil antioxydants seront réalisées par l'équipe LNOx à la Faculté de Médecine de Tours (Pr Hérault).

Un second projet intitulé PENICA et financé pour 2 ans par le Cancéropôle Grand Ouest (CGO) est actuellement en cours. Il fait suite à une précédente publication en collaboration avec Notre Laboratoire UMR 1238 Phy-Os (131). Il s'agit de tester l'effet des pesticides sur des CSM de patients sains, des CDOS et des CSM rendues pré tumorales par 4 hits oncogéniques et une lignée d'OS murin. Les résultats préliminaires montrent que les pesticides entraînent une diminution de la prolifération cellulaire avec



obtention de 40% de cellules sénescents. Ils entraînent également une augmentation de la migration et une diminution de l'expression d'anti-oncogènes. Nous allons étudier les 60% de cellules non sénescents, évaluer leur potentiel d'invasion *in vitro*, tester leur tumorigénicité *in vivo*. L'objectif est d'évaluer le potentiel de dégénérescence sarcomateuse induit par les pesticides sur les CSM, les CDOS en comparaison notamment avec des CSM pré tumorales 4 hits qui avaient révélé *in vivo* leur potentiel tumoral après une exposition longue en culture au mélange de pesticides (131).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
2. Xiao W, Mohseny AB, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen A-M. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin Sarcoma Res*. 2013 Jul 23;3(1):10.
3. Deschaseaux F, Pontikoglou C, Sensébé L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med*. 2010 Jan;14(1-2):103-15.
4. Encha-Razavi F, Escudier E. Embryologie. EMC - Obstétrique. 2010 Jan;5(3):1-30.
5. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*. 1976;47:327-59.
6. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1991 Sep;9(5):641-50.
7. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
9. Applebaum M, Kalchheim C. Mechanisms of Myogenic Specification and Patterning. In: Brand-Saberi B, editor. *Vertebrate Myogenesis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [cited 2017 Sep 13]. p. 77-98. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-44608-9_4
10. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008 Nov;17(11):925-32.
11. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2013 Feb;9(1):32-43.
12. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, et al. No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem Cell Rep*. 2016 Jun;6(6):897-913.

13. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1–11.
14. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279–95.
15. Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence. McCulloch P, editor. *PLoS ONE.* 2010 Jun 8;5(6):e10999.
16. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Oct;9(10):584–94.
17. Maes C, Kronenberg HM. Bone Development and Remodeling. In: *Endocrinology: Adult and Pediatric* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2017 Sep 14]. p. 1038–1062.e8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323189071000603>
18. Bonucci E. *Biological Calcification Normal and Pathological Processes in the Early Stages.* Berlin; Heidelberg: Springer; 2007.
19. J.-P. Meyrueis, A. Cazenave. Consolidation des fractures. *Appar Locomoteur* [Internet]. 2003; Available from:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0246052104357244>
20. Hernigou P. Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells. *J Bone Jt Surg Am.* 2005 Jul 1;87(7):1430.
21. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop.* 1986 Jul;(208):300–12.
22. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am.* 1989 Jun;71(5):684–91.
23. Hernigou P, Beaujean F. [Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1997;83(6):495–504.
24. Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop.* 1998 Oct;(355 Suppl):S257-266.
25. Le Nail L-R, Stanovici J, Fournier J, Splingard M, Domenech J, Rosset P. Percutaneous grafting with bone marrow autologous concentrate for open tibia fractures: analysis of forty three cases and literature review. *Int Orthop.* 2014 Sep;38(9):1845–53.
26. Stanovici J, Le Nail L-R, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr Res Transl Med.* 2016 Jun;64(2):83–90.

27. Krause DS, Scadden DT. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica*. 2015 Nov 1;100(11):1376–87.
28. Schmitt-Graeff AH, Nitschke R, Zeiser R. The Hematopoietic Niche in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–11.
29. Glenn JD. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):526.
30. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet Lond Engl*. 2008 May 10;371(9624):1579–86.
31. Bian Z-Y, Fan Q-M, Li G, Xu W-T, Tang T-T. Human mesenchymal stem cells promote growth of osteosarcoma: involvement of interleukin-6 in the interaction between human mesenchymal stem cells and Saos-2. *Cancer Sci*. 2010 Dec;101(12):2554–60.
32. Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, et al. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *Int J Oncol*. 2012 Jan;40(1):163–9.
33. Xu W, Bian Z, Fan Q, Li G, Tang T. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett*. 2009 Aug 18;281(1):32–41.
34. Endo-Munoz L, Cumming A, Rickwood D, Wilson D, Cueva C, Ng C, et al. Loss of Osteoclasts Contributes to Development of Osteosarcoma Pulmonary Metastases. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7063–72.
35. Endo-Munoz L, Evdokiou A, Saunders NA. The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1826(2):434–42.
36. Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone*. 2005 Jul;37(1):74–86.
37. Avril P, Le Nail L-R, Brennan MÁ, Rosset P, De Pinieux G, Layrolle P, et al. Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. *J Bone Oncol*. 2016 Mar;5(1):5–14.
38. Eyden B. Translational Medicine: The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2007 Sep 24;12(1):22–37.
39. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci Landmark Ed*. 2010 Jan 1;15:166–79.

40. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):805–15.
41. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, et al. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. Blagosklonny MV, editor. *PLoS ONE.* 2009 Apr 7;4(4):e4992.
42. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, editors. Lyon: IARC Press; 2013. 468 p. (World Health Organization classification of tumours).
43. Picci P, Manfrini M, Fabbri N, Gambarotti M, Vanel D, editors. Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [cited 2017 Sep 12]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-01748-8>
44. Arndt CA, Crist WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 1999 Jul 29;341(5):342–52.
45. Jaffe N, Bruland OS, Bielack S, editors. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010 [cited 2017 Sep 13]. (Cancer Treatment and Research; vol. 152). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0284-9>
46. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer.* 1984 Jan 15;33(1):37–42.
47. de Pinieux G, Bouvier C, Brouchet A, Rosset P. Stratégie diagnostique, anatomie pathologique et classification des tumeurs osseuses primitives. *EMC - Appar Locomoteur.* 2012 Oct;7(4):1–15.
48. Selvarajah S, Yoshimoto M, Ludkovski O, Park PC, Bayani J, Thorner P, et al. Genomic signatures of chromosomal instability and osteosarcoma progression detected by high resolution array CGH and interphase FISH. *Cytogenet Genome Res.* 2008;122(1):5–15.
49. Mandahl N, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F, Rydholm A, Rööser B, et al. Multiple cytogenetic abnormalities in a case of osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986 Nov;23(3):257–60.
50. Hauben EI, Weeden S, Pringle J, Van Marck EA, Hogendoorn PCW. Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2002 Jun;38(9):1218–25.
51. Staals EL, Bacchini P, Bertoni F. High-grade surface osteosarcoma: a review of 25 cases from the Rizzoli Institute. *Cancer.* 2008 Apr 1;112(7):1592–9.

52. Righi A, Gambarotti M, Longo S, Benini S, Gamberi G, Cocchi S, et al. Small cell osteosarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 36 cases. *Am J Surg Pathol*. 2015 May;39(5):691–9.
53. Corradi D, Wenger DE, Bertoni F, Bacchini P, Bosio S, Goldoni M, et al. Multicentric osteosarcoma: clinicopathologic and radiographic study of 56 cases. *Am J Clin Pathol*. 2011 Nov;136(5):799–807.
54. Barker JP, Monument MJ, Jones KB, Putnam AR, Randall RL. Secondary osteosarcoma: is there a predilection for the chondroblastic subtype? *Orthopedics*. 2015 May;38(5):e359-366.
55. Dujardin F, Binh MBN, Bouvier C, Gomez-Brouchet A, Larousserie F, Muret A de, et al. MDM2 and CDK4 immunohistochemistry is a valuable tool in the differential diagnosis of low-grade osteosarcomas and other primary fibro-osseous lesions of the bone. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2011 May;24(5):624–37.
56. Piperno-Neumann S, Le Deley M-C, Rédini F, Pacquement H, Marec-Bérard P, Petit P, et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Aug;17(8):1070–80.
57. Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*. 1979 Jun;43(6):2163–77.
58. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Jun;16:15–23.
59. Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med*. 1977 Jan;101(1):14–8.
60. Bacci G, Ruggieri P, Bertoni F, Ferrari S, Longhi A, Biagini R, et al. Local and systemic control for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy and limb salvage surgery: the Rizzoli experience. *Oncol Rep*. 2000 Oct;7(5):1129–33.
61. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet*. 2016 Apr 13;5(2):084–8.
62. Mirabello L, Yeager M, Mai PL, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, et al. Germline TP53 variants and susceptibility to osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Jul;107(7).
63. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009;152:3–13.
64. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2006 Mar 1;106(5):1154–61.


65. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):776–90.
66. Mialou V, Philip T, Kalifa C, Perol D, Gentet J-C, Marec-Berard P, et al. Metastatic osteosarcoma at diagnosis: prognostic factors and long-term outcome--the French pediatric experience. *Cancer*. 2005 Sep 1;104(5):1100–9.
67. Brugières L, Piperno-Neumann S. Etude Intergroupe (SFCE/GSF-GETO) OS2006 Zolédronate-Ostéosarcome Protocole de traitement des ostéosarcomes de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte comportant un essai randomisé et des études biologiques. 2005.
68. Nguyen A, Lasthaus C, Guerin E, Marcellin L, Pencreach E, Gaub M-P, et al. Role of Topoisomerases in Pediatric High Grade Osteosarcomas: TOP2A Gene Is One of the Unique Molecular Biomarkers of Chemoresponse. *Cancers*. 2013 Jun 4;5(2):662–75.
69. Chen Y, Yang Y, Yuan Z, Wang C, Shi Y. Predicting chemosensitivity in osteosarcoma prior to chemotherapy: An investigational study of biomarkers with immunohistochemistry. *Oncol Lett*. 2012 May;3(5):1011–6.
70. Qu J-T, Wang M, He H-L, Tang Y, Ye X-J. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 May;138(5):819–25.
71. Gomez-Brouchet A, Illac C, Gilhodes J, Bouvier C, Aubert S, Guinebretiere J-M, et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *OncoImmunology*. 2017 Sep 2;6(9):e1331193.
72. Cleton-Jansen A-M, Anninga JK, Briaire-de Bruijn IH, Romeo S, Oosting J, Egeler RM, et al. Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumorigenic pathways. *Br J Cancer*. 2009 Dec 1;101(11):1909–18.
73. Guijarro MV, Ghivizzani SC, Gibbs CP. Animal Models in Osteosarcoma. *Front Oncol* [Internet]. 2014 Jul 18 [cited 2017 Sep 16];4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00189/abstract>
74. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire-de Bruijn I, de Jong D, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of *Cdkn2*. *J Pathol*. 2009 Nov;219(3):294–305.
75. Wang J-Y, Wu P-K, Chen PC-H, Lee C-W, Chen W-M, Hung S-C. Generation of Osteosarcomas from a Combination of Rb Silencing and c-Myc Overexpression in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Feb;6(2):512–26.
76. Dass CR, Ek ET, Contreras KG, Choong PF. A novel orthotopic murine model provides insights into cellular and molecular characteristics contributing to human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis*. 2006;23(7–8):367–80.

77. Rochet N, Dubousset J, Mazeau C, Zanghellini E, Farges MF, de Novion HS, et al. Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72). *Int J Cancer*. 1999 Jul 19;82(2):282–5.
78. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9339–44.
79. Kreso A, Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar;14(3):275–91.
80. Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, Willinger T, Eynon EE, Flavell RA, et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:635–74.
81. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol*. 2009 Jan;27(1):44–6.
82. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011 Aug 19;146(4):633–44.
83. Furth J, Kahn M, Breedis C. The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Journals. 1937 Oct;276–82.
84. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2013 Jan;27(1):13–24.
85. Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, Porretta C, Ruiz B, Pochampally RR, et al. CD117 and Stro-1 Identify Osteosarcoma Tumor-Initiating Cells Associated with Metastasis and Drug Resistance. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4602–12.
86. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002–12.
87. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Graziano A, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PloS One*. 2008;3(10):e3469.
88. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J*. 2011 Jun 1;25(6):2022–30.
89. Skoda J, Nunukova A, Loja T, Zambo I, Neradil J, Mudry P, et al. Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice. *Tumor Biol*. 2016 Jul;37(7):9535–48.

90. Tian J, Li X, Si M, Liu T, Li J. CD271+ Osteosarcoma Cells Display Stem-Like Properties. Kerkis I, editor. PLoS ONE. 2014 Jun 3;9(6):e98549.
91. Yang M, Yan M, Zhang R, Li J, Luo Z. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci*. 2011 Oct;102(10):1774-81.
92. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1992 Nov;12(11):4565-74.
93. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, et al. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005 Nov;7(11):967-76.
94. Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol*. 2009 May;34(5):1381-6.
95. Brune JC, Tormin A, Johansson MC, Rissler P, Brosjö O, Löfvenberg R, et al. Mesenchymal stromal cells from primary osteosarcoma are non-malignant and strikingly similar to their bone marrow counterparts. *Int J Cancer*. 2011 Jul 15;129(2):319-30.
96. Pereira BP, Zhou Y, Gupta A, Leong DT, Aung KZ, Ling L, et al. Runx2, p53, and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1). *J Cell Physiol*. 2009 Dec;221(3):778-88.
97. Veselska R, Hermanova M, Loja T, Chlapek P, Zambo I, Vesely K, et al. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer [Internet]*. 2008 Dec [cited 2017 Sep 20];8(1). Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-300>
98. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010 Aug 26;29(34):4741-51.
99. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol*. 2011 Nov;7(11):1285-97.
100. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):755-68.
101. McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing BH. Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer*. 1971 Feb;27(2):397-402.

102. Rhim JS, Park DK, Arnstein P, Huebner RJ, Weisburger EK, Nelson-Rees WA. Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*. 1975 Aug 28;256(5520):751-3.
103. Tang N, Song W-X, Luo J, Haydon RC, He T-C. Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation. *Clin Orthop*. 2008 Sep;466(9):2114-30.
104. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2014 Jun;32(6):1380-9.
105. Malthièry Y, Savagner F. [Energy metabolism of the cancer cell: example of mitochondria-rich endocrine tumors]. *Ann Endocrinol*. 2006 Jun;67(3):205-13.
106. Bonuccelli G, Avnet S, Grisendi G, Salerno M, Granchi D, Dominici M, et al. Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7575-88.
107. Esteves P, Pecqueur C, Ransy C, Esnous C, Lenoir V, Bouillaud F, et al. Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res*. 2014 Jul 15;74(14):3971-82.
108. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular Superoxide Dismutase and its Role in Cancer. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Sep 22] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917307293>
109. Hérault O, Hope KJ, Deneault E, Mayotte N, Chagraoui J, Wilhelm BT, et al. A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):895-901.
110. Holley AK, Dhar SK, St. Clair DK. Curbing cancer's sweet tooth: Is there a role for MnSOD in regulation of the Warburg effect? *Mitochondrion*. 2013 May;13(3):170-88.
111. Kovac M, Blattmann C, Ribi S, Smida J, Mueller NS, Engert F, et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun*. 2015 Dec 3;6:8940.
112. Engert F, Kovac M, Baumhoer D, Nathrath M, Fulda S. Osteosarcoma cells with genetic signatures of BRCAness are susceptible to the PARP inhibitor talazoparib alone or in combination with chemotherapeutics. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):48794-806.
113. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008 Jun 1;68(11):4331-9.
114. Blau O, Baldus CD, Hofmann W-K, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients

- have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood*. 2011 Nov 17;118(20):5583–92.
115. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou X-P, Eng C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet*. 2002 Nov;32(3):355–7.
 116. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 2012 Nov;11(5):589–95.
 117. Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2013 Dec;1836(2):321–35.
 118. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994 Jul;21(3):429–35.
 119. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal Stem Cells: Potential Precursors for Tumor Stroma and Targeted-Delivery Vehicles for Anticancer Agents. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 3;96(21):1593–603.
 120. Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarrategi A, Amaral T, de Alava E, et al. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Aug;72(16):3097–113.
 121. Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. J.Fogh (ed.), *Human Tumor Cell Lines in vitro*. New York: Plenum Press. 1975;115–59.
 122. Smida J, Baumhoer D, Rosemann M, Walch A, Bielack S, Poremba C, et al. Genomic Alterations and Allelic Imbalances Are Strong Prognostic Predictors in Osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 15;16(16):4256–67.
 123. Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977 Jul;12(1):11–5.
 124. Avril P, Duteille F, Ridet P, Heymann M-F, De Pinieux G, Rédini F, et al. Opposite Effects of Soluble Factors Secreted by Adipose Tissue on Proliferating and Quiescent Osteosarcoma Cells. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Mar;137(3):865–75.
 125. Sinha I, Orgill DP. Discussion: Opposite Effects of Soluble Factors Secreted by Adipose Tissue on Proliferating and Quiescent Osteosarcoma Cells. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Mar;137(3):876–7.
 126. Smida J, Xu H, Zhang Y, Baumhoer D, Ribi S, Kovac M, et al. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2017 Aug 15;141(4):816–28.

- 
127. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011 Jan 7;144(1):27–40.
 128. Pellestor F, Gatinois V, Puechberty J, Geneviève D, Lefort G. [Chromothripsis, an unexpected novel form of complexity for chromosomal rearrangements]. *Med Sci MS*. 2014 Mar;30(3):266–73.
 129. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The Genetics of Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:1–11.
 130. Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6223–8.
 131. Hochane M, Trichet V, Pecqueur C, Avril P, Oliver L, Denis J, et al. Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2017 Mar;35(3):800–11.
 132. Pantic I. Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research. *J Biosci*. 2011 Dec;36(5):957–61.

ANNEXES

Liste des annexes

- Annexe 1: **1^{er} article** : Percutaneous grafting with bone marrow autologous concentrate for open tibia fractures: analysis of forty three cases and literature review. Louis-Romée Le Nail, Julien Stanovici, Joseph Fournier, Marie Splingard, Jorge Domenech & Philippe Rosset

- Annexe 2: **2^{ème} article** : Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. J. Stanovici, L.-R. Le Nail, M.A. Brennan, L. Vidal, V. Trichet, P. Rosset & P. Layrolle

- Annexe 3: **3^{ème} article** : Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. Pierre Avril, Louis-Romée Le Nail, Meadhbh Á. Brennan, Philippe Rosset, Gonzague De Pinieux, Pierre Layrolle, Dominique Heymann, Pierre Perrot & Valérie Trichet

- Annexe 4: Liste des 482 gènes de la région 17q concernés par la trisomie des CDOS DIA

- Annexe 5: Résultats de l'analyse transcriptomique en RNAseq pour des gènes d'intérêt de notre étude. Pour un patient, T représente les CDOS, M représente les CSMMO. Les valeurs correspondent à des intensités d'expression en échelle logarithmique.

ANNEXE 1

International Orthopaedics (SICOT)
DOI 10.1007/s00264-014-2342-x

ORIGINAL PAPER

Percutaneous grafting with bone marrow autologous concentrate for open tibia fractures: analysis of forty three cases and literature review

Louis-Romée Le Nail · Julien Stanovici · Joseph Fournier · Marie Splingard · Jorge Domenech · Philippe Rosset

Received: 13 March 2014 / Accepted: 23 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose Tibial fractures are the most common lower limb fractures. Some criteria such as open fractures and increasing open stage are known to be associated with high delayed union and pseudarthrosis rate. In cases of delayed or nonunion, classical treatment is autologous cancellous bone graft which is associated with high morbidity rate. The ideal treatment would be a percutaneous harvesting and grafting technique. As bone marrow autologous concentrate (BMAC) presents both advantages, we evaluated this technique from 2002 to 2007.

Methods This was a retrospective study of 43 cases of open tibial fractures with initial surgical treatment. The criteria of inclusion were open fracture and nonunion, delayed union or suspicion of delayed union.

Results In 23 cases (53.5 %) BMAC was successful. The success group had received significantly more CFU-F than the failure group (469 vs 153.10³, $p=0.013$). A threshold of 360.10³ CFU-F grafted could be established over which there was 100 % success. BMAC done before 110 days after

fracture had 47 % success and BMAC done since 110 days after fracture had 73 % success. BMAC success rate decreased with increasing initial fracture skin open stage. There was no BMAC success in cases of a fracture with a remaining gap of more than 4 mm. We had no complications with the technique at the iliac harvesting zone and tibia injection point.

Conclusion BMAC is a technique that should be considered as one of the different alternatives for management of long-bone delayed and nonunion because of its effectiveness, low complication rate, preservation of bone stock and low cost.

Keywords Tibia · Fracture · Delayed union · Nonunion · Bone marrow · Cell therapy · Mesenchymal stem cell

Introduction

Open tibial fractures are still associated with high rates of delayed and/or nonunion. The definition of delayed union is the time at which an intervention is decided upon in order to obtain bone union [1]. Nonunion, or pseudarthrosis, is defined in Europe by an absence of consolidation after six months post fracture [2] with no favourable evolution from the third to the sixth months [3]. In the United States, nine months, with three months of no favourable evolution, are necessary to define pseudarthrosis [1].

Delayed and nonunions mainly occur in diaphysis of long bones. The tibia is the most represented with 10%–69 % delayed and nonunion rates following open fractures, depending on authors, cutaneous open stage or soft tissue damage [4–9]. Contributing factors have been found, particularly for tibial fractures, including high-energy trauma, open fracture, soft tissue damage, transverse fracture, distal localization and more than a 4-mm gap remaining after reduction [2, 10, 11].

Delayed union and nonunion are responsible for patient daily pain and invalidation. The global cost of tibia

L.-R. Le Nail · J. Stanovici · J. Fournier · P. Rosset (✉)
Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique 2, Hôpital Trousseau, Université François-Rabelais de Tours, CHU de Tours, 37044 Tours cedex 09, France
e-mail: philippe.rosset@univ-tours.fr

M. Splingard
EFS Centre-Atlantique, 50 Avenue Marcel Dassault,
37220 Tours, France

J. Domenech
Service d'Hématologie, Hôpital Bretonneau, Université
François-Rabelais de Tours, CHU de Tours, 37044 Tours cedex 09,
France

L.-R. Le Nail · J. Stanovici · P. Rosset
Insem U957, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption
Ossuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (LPRO),
Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Published online: 13 April 2014

 Springer

pseudarthrosis is about 2000–20,000 US dollars that have to be added to the 10,000 US dollars for initial treatment [12–14].

Many treatments are proposed for delayed and nonunion. A direct approach with autologous iliac crest bone graft remains the gold standard with 86 %–100 % consolidation rate. But it may be associated with infection when approaching the pseudarthrosis site [15, 16]. Iliac crest harvesting may also be complicated [17–19], e.g. 12 %–35 % of residual pain at three to 12 months depending on series, 1.5 %–1.9 % of reintervention for local complications (infections in particular), nerve wounds and unsightly scars. Results of intramedullary reamed re-nailing for aseptic nonunion are very good with 95 %–100 % consolidation rate, but need another knee approach [1]. Other techniques are described with site opening, e.g. application of growth factors such as bone morphogenetic protein (BMP) [20–22].

Procedures with the percutaneous approach have been developed with grafting of autologous bone marrow, concentrated [3, 23–27] or not [28–32].

The percutaneous autologous bone marrow grafting principle is based on osteo inducing cells implementation in the fracture site. It was shown by Paley et al. [33] with rabbits in 1986. These cells correspond to mesenchymal stem cells (MSC), also called colony-forming units fibroblastics (CFU-F). These are detected by their plastic adhesion capacities in vitro [34, 35]. Connolly proposed a bone marrow centrifugation for increasing CFU-F rate and tested it on rabbits [36]. Hernigou and Beaujean applied this technique to humans [37]. They obtained an augmentation from an initial 600 CFU-F/mL to 2500 CFU-F/mL after concentration [26].

Bone marrow injection can be proposed at an early stage after bad prognosis fractures, in prevention of delayed or nonunion. Connolly mentioned it in 1998 for bone diastasis filling after closed tibia fracture treated by intramedullary nailing [23]. Hernigou et al. proposed to use this injection at pseudarthrosis stage [3].

The aim of this study was to evaluate the results of 43 bone marrow autologous concentrated injections (BMAC) in prevention of delayed union, for delayed union and in nonunion following 43 tibia open fractures.

Material and methods

Patients: criteria of inclusion and indication

The criteria of inclusion were: open tibial fracture with delayed union, nonunion or at risk of delayed union and a first BMAC between June 2002 and December 2007 in our orthopaedic and trauma department. When the patient was thought to be at risk of delayed or nonunion, BMAC was proposed not before one month. No surgery should have been performed

between initial fracture osteosynthesis and BMAC. BMAC was not indicated if the fracture site was not reduced or in case of malunion [26].

Forty-two patients were included. One patient had a bilateral procedure. General features were recorded. We used Gustilo's classification for open fracture staging [38].

Procedure

We applied Hernigou's technique [25]. Briefly, bone marrow was obtained from posterior iliac crests by needle aspiration under general anaesthesia. Around 500 mL were then concentrated by centrifugation (Cobe 2991®, Gambro BCT, Lakewood, Colorado, USA) in a therapy unit in order to obtain 50 mL, which were grafted under local or general anaesthesia under fluoroscopic control. No full weight bearing was allowed before bone consolidation.

Bone marrow analysis

Total nucleated cells (NC) and platelets were numbered with a cell counter. Colony forming units-fibroblastic (CFU-F), the osteoblasts precursors, were numbered by cell culture.

Results characterization

Success was defined by a consolidation without any subsequent procedure. Failure was defined if one or more subsequent procedures were necessary in order to obtain bone consolidation.

Consolidation analysis

Bone consolidation was clinically assessed by a non painful callus palpation and a full weight bearing without any contention system [37]. Radiological bone consolidation was analysed by two incidences on standard radiographs (antero posterior and lateral). Consolidation was attested when a bone bridge or a fracture disappearance was seen on three out of four cortices. Radiographs were analysed by two different orthopaedic surgeons.

Statistical tests

Statistical significance was set at a probability value (p-value) less than 0.05. Correlation Spearman test was used for quantitative variables analysis. Mann–Whitney *U* test was used to identify differences between two quantitative variable groups. Trends within groups with categorical variables were analysed with chi-square test.

Results

Presentation

The population was composed of 35 men (83 %) and seven women (17 %). Mean age was 41 years (range 16–86). In 27 cases (64 %), fracture occurred in traffic accidents. For the Gustilo fracture open stage classification, there were five stage I (12 %), 24 stage II (56 %), 12 stage IIIA (28 %) and two stage IIIB (4 %). Fractures affected proximal diaphysis in two cases (4 %), middle diaphysis in 18 cases (42 %), distal diaphysis in 17 cases (40 %) and distal metaphysis in six cases (14 %). In 20 fractures (47 %), radiographs showed three or less bone fragments. In 23 cases (53 %), there were more than three bone fragments. External fixation was used in 31 cases (72 %) and reamed endo medullary locked nails in 12 cases (28 %).

Patients were mainly young men, with high-energy trauma, treated by external fixation.

BMAC was performed at a mean of 85 days after fracture (median 63, range 29–196). At the time of BMAC, three isolated nail dynamisations and one associated with a fibular osteotomy were realised.

Clinical results

We obtained 23 successes (53.5 %) within 17 weeks after BMAC (range 32–426). For the 20 other fractures, four healed with another procedure but without fracture opening (three external fixation or centromedullary nail dynamisation and one iterative marrow graft). At least 27 fractures (63 %) healed without fracture site opening. In the 16 other cases, a direct fracture site approach was required:

- In nine cases an inter tibio fibular graft was performed and allowed bone consolidation.
- In five cases cancelous bone graft was performed and allowed bone consolidation in two cases; for one case an iterative cancelous bone graft was necessary. For the two other cases, an inter tibio fibular graft was performed, allowing bone consolidation for one. The other patient, who was suffering arteritis, had to be amputated after skin and infection complications.
- In two cases, an iterative BMAC failed and was followed by an inter tibio fibular graft: one then healed and one required another BMAC to achieved bone consolidation.

Patient general characteristics such as gender, age, tobacco use, body mass index or ASA score did not have statistical influence on BMAC results.

Results according to the graft period are presented in Fig. 1. The 32 BMAC done before 110 days after fracture had 15 successes (47 %). The 11 BMAC done after 110 days had eight cases of success (73 %).

Results according to the fracture open stage are shown on Fig. 2. Success rate decreased with increasing Gustilo open stage.

In four cases, there was a history of deep local infection after initial osteosynthesis. In all cases it was associated with a BMAC failure.

Radiological results

On pre BMAC standard radiographs, a gap of more than 4 mm seen on more than two out of four corticals was associated with 100 % BMAC failure.

Bone marrow analysis (Table 1)

In the unconcentrated bone marrow, grafts of the success group contained significantly more nucleated cells (NC) than in the failure group ($p=0.009$).

In the concentrated bone marrow, the success group had received significantly more CFU-F than the failure group (469 ± 508.10^3 vs 153 ± 100.10^3 ; $p=0.013$), as shown in Fig. 3.

A threshold of 360.10^3 CFU-F grafted could be established over which there was 100 % success. Concerning platelets, no significant difference was observed. Systematic bacteriological analysis was performed on all grafts. Culture was positive in six cases. No consequence was observed for any patient (no

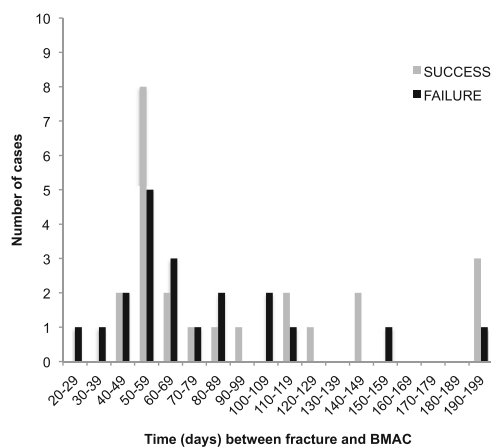
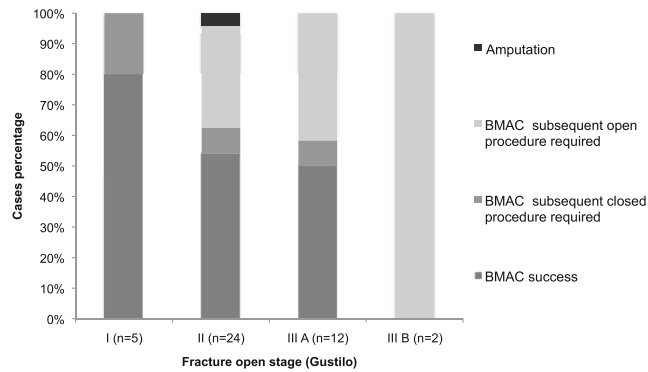


Fig. 1 Results of BMAC depending on the graft period

Fig. 2 Bone consolidation depending on initial fracture open stage



antibiotic or surgical procedure was required); it was considered as contamination.

BMAC effect depending on postoperative period

In order to analyse the isolated BMAC effect, of the 43 cases, we removed the four cases in which an associated procedure was done at the same time, even though it was a simple act (three cases of unlocking and one case of unlocking with peroneal osteotomy). We then separated the 39 remaining cases into two sub groups: BMAC done before 110 days after fracture and BMAC done later than 110 days after fracture (Table 2).

In the first group, before 110 days after fracture, there were 29 cases. The graft was done at a mean time of 62 days (range 29–109). In the second group, from 110 days after fracture, there were ten cases. The graft was done at a mean time of 157 days (range 116–196).

For mean age, there was a trend, with younger patients in the first group but with no significant difference (mean 39 vs 49 years, $p=0.2$). However, both groups were comparable for graft mean total nucleated cells/mL (1.37×10^6 vs 1.41×10^6 , $p=0.8$) and CFU-F/mL (5180 vs 4840, $p=0.67$).

In the first group there was 79 % external fixation compared to 90 % in the second group. For fracture open stage, there were 7 % of stage I in the first group vs 0 % in the second, 55 % of stage II vs 70 %, 31 % of stage IIIA vs 30 % and 7 % of stage IIIB vs 0 %, respectively.

Success of BMAC was considered here as an absence of any complementary treatment and was 41 % in the first group and 70 % in the second.

Concerning both groups, before and from 110 days from fracture, the successes had more concentrated graft for total nucleated cells per mL compared to the failures but with no significant difference: 1.66 vs 1.17, $p=0.16$ in the first group, 1.49 vs 1.22, $p=0.67$ in the second group.

For total graft CFU-F, in the first group, success cases received significantly more CFU-F compared to failure cases (491.10^3 vs 156.10^3 , $p=0.02$). In the second group it was the same observation but with no significant difference (358.10^3 vs 137.10^3 , $p=0.67$).

For CFU-F concentration, successes in the first group had significantly more concentrated graft (8956 CFU-F/mL vs 2584, $p=0.006$). In the second group, successes had more concentrated graft but with no significant difference (5905 vs 2358 CFU-F/mL, $p=0.67$).

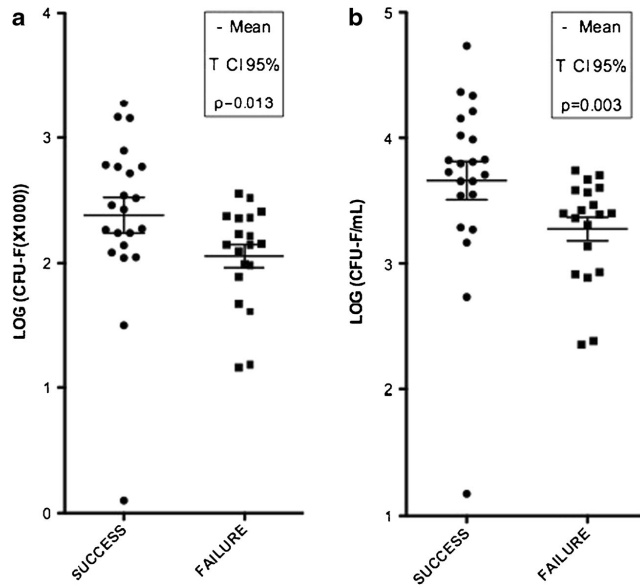
Table 1 Bone marrow parameters before and after concentration

Parameters		Success	Failure	Mann-Whitney	
Before concentration	NC	10^6 /mL	26.3	20.3	$p=0.009^*$
After concentration	NC	Total (10^9)	8.6 ± 4.8	7.1 ± 2	$p=0.62$
		10^6 /mL	171 ± 107	118 ± 28	$p=0.10$
	CFU-F	Total (10^3)	469 ± 508	153 ± 100	$p=0.013^*$
		/mL	9452 ± 11806	2549 ± 1602	$p=0.003^*$
		$/10^6$ NC	45 ± 36	20 ± 12	$p=0.006^*$
	Platelets	Total (10^9)	25.5 ± 17	24 ± 9	
		10^3 /μL	514 ± 420	402 ± 174	$p=0.56$

NC nucleated cells, CFU-F colony forming units fibroblastics

*Significant difference

Fig. 3 Total CFU-F grafted (a) and marrow graft CFU-F concentration (b) depending on the bone marrow autologous concentrate (BMAC) result. *CI* confidence interval



Discussion

Generalities

We here report an important cohort with homogenous pathology (open tibia fracture) and treatment (no orthopaedic treatment). There are few studies about concentrated autologous bone marrow grafting. Consolidation was obtained for all patients but one who required a below knee amputation. No complication linked to marrow graft was observed. All patients with nonunion were supposed to be grafted with autologous cancellous bone with direct approach or nail change. For the cases of delayed union, from our experience, the same procedure would have been required. Concerning BMAC for prevention, as it was used in cases with high delayed or nonunion risk, even if we did not obtain a high BMAC success rate, invasive procedures were avoided for the successes.

Graft time

Hernigou et al. were the first team to use BMAC on a larger cohort of pseudarthrosis with open and closed tibial fractures [3]. Therefore, we wondered whether it would also be effective at an earlier stage. Indeed, as it is known that open fractures are at higher risk of delayed or nonunion, even more for comminuted fractures (more than 50 % of cases with more than three fragments in our study), like other teams we were expecting a treatment to avoid latency before considering further invasive treatment [9, 39]. We therefore also proposed BMAC in a short time after fracture.

In a subanalysis, in order to overcome the possible effect of another associated act during the same surgical procedure and isolate specific effects of BMAC, we removed four cases which had another surgical act at the same time, although minimal. Over the 39 cases, we could retrospectively establish a cut-off time of 110 days (3.6 months). We obtained better

Table 2 Mean bone marrow autologous concentrate (BMAC) cell parameters depending on postoperative period and results

	Time since fracture	Before 110 days			After 110 days		
		Success	Failure	Mann-Whitney	Success	Failure	Mann-Whitney
Cases (n)		12	17		7	3	
NC	10 ⁶ /mL	1.66	1.17	p=0.16	1.49	1.22	p=0.67
CFU-F	Total (10 ³)	491	156	p=0.02*	358	137	p=0.67
	/mL	8956	2584	p=0.006*	5905	2358	p=0.67

n number, NC nucleated cells
*Significative difference

results when BMAC was done from 110 days after fracture, with 70 % of consolidation with no complementary treatment, compared to 41 % before 110 days.

Consolidation and literature review

Our global results seem to be not as good as those mentioned in other series but require adjustment. In fact, Hernigou et al. [3] obtained 88 % success with 60 tibia pseudarthrosis [3]. For bone consolidation, eight weeks were necessary for closed and stage I open fracture and 14 weeks for stage II and IIIA open fracture taken together. Time for consolidation was longer in our series (17 weeks). But in Hernigou's study, there was a majority of better prognosis cases (80 % of closed or stage I open fractures, mainly proximal or mid shaft fractures, no greater than 5-mm interfragmentary gap and younger patients). Moreover, our consultation appointments were longer so consolidation could be confirmed later. Sugaya et al. [40] also used BMAC in 17 pseudarthrosis cases (ten femurs, five tibia, one humerus and one ulna), with a 76 % success rate.

In other studies using simple or repeated non concentrated marrow injection, Braly et al. [41] obtained 82 % successes out of 11 tibia delayed and nonunion within 4.1 months (range 1.7–6.4). Singh et al. [42] had 83 % consolidation within seven months (range four to 12) for delayed and nonunion of three femurs, two humerus, six forearms and one metacarpal. Bhargava et al. [43] applied this technique to 28 mainly delayed unions of 25 tibias, two femurs and one forearm, with 82 % successes with consolidation within a mean of 12 weeks (range seven to 18). Goel et al. [30] obtained tibial pseudarthrosis consolidation in 75 % within 14 weeks (range six to 22, 20 cases). Siwach et al. [32] obtained 94 % consolidation in delayed unions and nonunions (42 tibias, eight femurs, 12 humerus and ten forearms). In a pseudarthrosis study with 20 long bones, Garg et al. obtained 86 % consolidation [29] within 12–21 weeks when using two injections at three-week intervals. Connolly et al. [28] obtained 88 % consolidation within 21 weeks (range 15–30) in 17 cases of tibia nonunion.

Our results with early injection were poor. But marrow graft was proposed mainly for bad prognosis fractures with a recruitment bias and temptation to perform a less invasive intervention. Marrow graft is also described in many other cases including femoral head osteonecrosis [44], bone reconstruction with or without allograft [45], Ilizarov lengthening and knee pseudarthrosis [37].

Consolidation influencing factors

We did not find any influence on consolidation of age, sex, body mass index, general status (ASA score) or tobacco use as

other authors [7, 10, 46]. High energy trauma, open fracture, bone loss and fracture localization are well known to be factors of delayed or nonunion [1, 7, 10, 11]. But we could not find significative confirmation in our study, probably because our sub groups were not sufficiently large.

A meta analysis was performed by Bhandari et al. [4] showing more risks of absence of consolidation when osteosynthesis was carried out with external fixation versus unreamed centromedullary nailing. In our study we observed a non significant difference in the same way, but external fixation was used for bad prognosis fractures or those with important soft tissue damage.

Postoperative fracture gap is known to be associated with a high iterative procedure rate in order to obtain consolidation [2, 4, 10]. All of our patients presenting a gap greater than 4 mm or a half cortical thickness had to be re-operated. To us, an significant fracture gap is a contra- indication of marrow graft.

The four patients with a deep infection past had a marrow graft failure. We agree with Matsuda et al. [47] who contra-indicated autologous non concentrated bone marrow injection in femoral septic pseudarthrosis.

Bone marrow and consolidation

Bone matrix is synthesized by osteoblasts whose origin are CFU-F [34]. In physiologic conditions, there are very few CFU-F at the fracture site. Hernigou and Beaujean showed there were even fewer in patients with pseudarthrosis in the pseudarthrosis site as well as in iliac crests [48].

Hernigou et al. [3] showed a significant correlation between CFU-F rate of the BMAC graft and consolidation and we obtained similar results in our study, with absolute value and concentration value for the global analysis. Hernigou et al. also established a threshold under which no consolidation was obtained in all patients, i.e. 37,000 CFU-F. We could find a threshold of 360,000 CFU-F grafted over which all patients obtained consolidation with BMAC alone.

However, looking at literature articles referring to autologous bone marrow, we could see a relative homogeneity with nucleated cell numbering whereas CFU-F numbering showed very large amplitude (Table 3). Possible reasons are the automatic process for nucleated cell numeration (cell counter) instead of cell culture for CFU-F. This is confirmed by the variations between different teams. But variations seem to exist even in the same centre, showing difficulties of CFU-F numbering. Wide variation of CFU-F number between patients is confirmed by our study.

In the sub group analysis of 39 isolated cases of BMAC, successes received more CFU-F but with significative difference only before 110 days after fracture. However, subgroups

Table 3 Bone marrow data: literature review

Study	Number of cases	NC (10 ⁶ /mL)		CFU-F (/mL)		CFU-F/10 ⁶ NC	
		Before concentration	After concentration	Before concentration	After concentration	Before concentration	After concentration
Muschler ^a , 2001 [56]	57	32	–	–	–	55	–
Hernigou, 1997 [37]	35	18±1	67±4	272	924	16±2	14±2
Hernigou, 2005 [3]	60	18±7	–	612±134	2576±1121	–	33±8
Gan, 2008 [57]	41	16±4	44.5±15	214±246	866±876	–	–
Hernigou ^b , 2009 [58]	342	18	29	1160	4900	–	–
Sugaya, 2013 [40]	17	8.6±4	48±27	–	–	–	2.2±2
Our study	43	24±8	146±84	759±745	6253±9299	29±21	34±30

^a Healthy volunteers^b Hip osteonecrosis

NC nucleated cells, CFU-F colony forming units fibroblastic

are small and this study would require more cases in the later group to confirm this observation.

We did not test *in vitro* differentiation capacities of CFU-F. It remained a purely quantitative analysis. It would be interesting to analyse functional aspects of CFU-F as we have a greater effect after 110 days but with lower number of cells. This shows that initial period until pseudarthrosis stage is a period of significant biological local alterations and may also be systemic.

Other techniques

Fernandes-Bances et al. suggest decorticating the pseudarthrosis site and implant allograft associated with concentrated autologous bone marrow [49]. However, this requires a new fracture approach.

Many studies report the use of bone morphogenetic proteins (BMP) which are strictly osteo inductive proteins. Govender et al. [39] used rhBMP-2 for treatment of open tibial fractures and showed a great benefit in the rhBMP-2 group. However, when analysing the different groups, the control group contained mainly unreamed nails (74 %), whereas the 0.75 mg/mL rhBMP-2 group contained 51 % of unreamed nails and 31 % in the 1.5 mg/mL rhBMP-2 group. Moreover, this therapy presents inconveniences, e.g. potential oncologic risk (very high doses), ectopic calcifications [50–52], high cost and laboratories lobbying. A fracture or nonunion site opening is required and collagenic membrane implantation is frequently associated with immunisation against bovin collagen and BMP [20, 39, 52].

Platelet-rich plasma (PRP) corresponds to a solution containing more than 300,000 platelets/mL. It can be obtained from peripheral venous blood. This technique is autologous and can be used percutaneously. But no randomized study had

shown a significant advantage with this technique [53, 54]. In our study, no significant link could be found between platelet number and consolidation although the success group had received more platelets and the marrow graft corresponded to the definition.

Bone marrow injection difficulties and risks/adverse event

The nonunion site is a stiff zone and it may, sometimes, be difficult to inject the whole graft. Concerning infection risk, even if we had six positive bacteriological systematic examinations, we had no clinical proven infection. No patient showed any clinical sign of infection and no antibiotic treatment or surgical debridement was required.

Concerning oncological risk, no patient showed oncological pathology at the injection site. A recent study of Hernigou et al. [55] confirmed the safety with the absence of increased oncological pathologies after autologous bone marrow injection.

Conclusion

Percutaneous autologous concentrated bone marrow graft is a safety technique that shows very good results in delayed union and nonunion stages. It can be done again after a few weeks [26], preserves bone stock and minimizes bony iliac harvesting complications as well as fracture approach complications. To us, it cannot replace a standard graft procedure in case of fracture gap and infection history. However results are interesting and need further studies especially *in vitro* differentiation functional capacities of CFU-F, to analyse CFU-F osteoblastic differentiation capacities and compare with clinical results.

Acknowledgments The authors wish to thank Mr Pascal Garaud for statistical analysis and Mrs Carole Grand for her great help.

Conflict of interest This is no conflict of interest for any author.

References

- Phieffer LS, Goulet JA (2006) Delayed unions of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 88(1):206–216
- Gaebler C, Berger U, Schandelmaier P, Greitbauer M, Schauwecker HH, Applegate B, Zych G, Vecsei V (2001) Rates and odds ratios for complications in closed and open tibial fractures treated with unreamed, small diameter tibial nails: a multicenter analysis of 467 cases. *J Orthop Trauma* 15(6):415–423
- Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H (2005) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87(7):1430–1437
- Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Schemitsch EH (2001) Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *J Bone Joint Surg (Br)* 83(1):62–68
- Court-Brown CM (2004) Reamed intramedullary tibial nailing: an overview and analysis of 1106 cases. *J Orthop Trauma* 18(2):96–101
- Finkemeier CG, Schmidt AH, Kyle RF, Templeman DC, Varecka TF (2000) A prospective, randomized study of intramedullary nails inserted with and without reaming for the treatment of open and closed fractures of the tibial shaft. *J Orthop Trauma* 14(3):187–193
- Henley MB, Chapman JR, Agel J, Harvey EJ, Whorton AM, Swiontkowski MF (1998) Treatment of type II, IIIA, and IIIB open fractures of the tibial shaft: a prospective comparison of unreamed interlocking intramedullary nails and half-pin external fixators. *J Orthop Trauma* 12(1):1–7
- Kakar S, Tornetta P 3rd (2007) Open fractures of the tibia treated by immediate intramedullary tibial nail insertion without reaming: a prospective study. *J Orthop Trauma* 21(3):153–157
- Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, Kregor PJ, Nordsletten L, Paiement G, Patel A (2006) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 88(6):1258–1265
- Audige L, Griffin D, Bhandari M, Kellam J, Ruedi TP (2005) Path analysis of factors for delayed healing and nonunion in 416 operatively treated tibial shaft fractures. *Clin Orthop Relat Res* 438:221–232
- Bhandari M, Tometta P 3rd, Sprague S, Najibi S, Petrisor B, Griffith L, Guyatt GH (2003) Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *J Orthop Trauma* 17(5):353–361
- Beaver R, Brinker MR, Barrack RL (1997) An analysis of the actual cost of tibial nonunions. *J La State Med Soc* 149(6):200–206
- Heckman JD, Sarasohn-Kahn J (1997) The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis* 56(1):63–72
- Kanakaris NK, Giannoudis PV (2007) The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury* 38(Suppl 2):S77–S84
- Lifeso RM, Al-Saati F (1984) The treatment of infected and uninfected non-union. *J Bone Joint Surg (Br)* 66(4):573–579
- Sen MK, Miclau T (2007) Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 38(Suppl 1):S75–S80
- Kim DH, Rhim R, Li L, Martha J, Swaim BH, Banco RJ, Jenis LG, Tromanhauser SG (2009) Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine* J 9(11):886–892
- Robertson PA, Wray AC (2001) Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery: a prospective analysis of morbidity. *Spine* 26(13):1473–1476
- Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, Albert TJ (2003) Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28(2):134–139
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Ciemy G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForté AJ, Yin S (2001) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 2):S151–S158
- Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB (2011) Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35(9):1271–1280
- Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, Jankolija M, Popek I, Curak J, Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, Francetic I et al (2014) The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop* 38(3):635–647
- Connolly JF (1998) Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl):S257–266
- Connolly JF (1995) Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res* 313:8–18
- Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H (2006) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 88(Suppl 1 Pt 2):322–327
- Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H (2005) The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg (Br)* 87(7):896–902
- Galois L, Bensoussan D, Diligent J, Pinzano A, Henrionnet C, Choufani E, Stoltz JF, Mainard D (2009) Autologous bone marrow graft and treatment of delayed and non-unions of long bones: technical aspects. *Biomed Mater Eng* 19(4–5):277–281
- Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R (1991) Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial non-unions. *Clin Orthop Relat Res* 266:259–270
- Garg NK, Gaur S, Sharma S (1993) Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand* 64(6):671–672
- Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM (2005) Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 36(1):203–206
- Sim R, Liang TS, Tay BK (1993) Autologous marrow injection in the treatment of delayed and non-union in long bones. *Singap Med J* 34(5):412–417
- Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A (2001) Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci* 55(6):326–336
- Paley D, Young MC, Wiley AM, Formasier VL, Jackson RW (1986) Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 208:300–312
- Beresford JN (1989) Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 240:270–280
- Friedenstein AJ (1976) Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47:327–359
- Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R (1989) Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 71(5):684–691
- Hernigou P, Beaujean F (1997) Autologous bone marrow graft for patients presenting non unions. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 83(6):495–504
- Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN (1984) Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 24(8):742–746

39. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG et al (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12): 2123–2134
40. Sugaya H, Mishima H, Aoto K, Li M, Shimizu Y, Yoshioka T, Sakai S, Akaogi H, Ochiai N, Yamazaki M (2013) Percutaneous autologous concentrated bone marrow grafting in the treatment for nonunion. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2013 Nov 26. [Epub ahead of print]
41. Braly HL, O'Connor DP, Brinker MR (2013) Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of distal meta-diaphyseal tibial nonunions and delayed unions. *J Orthop Trauma* 27(9):527–533
42. Singh AK, Shetty S, Saraswathy JJ, Sinha A (2013) Percutaneous autologous bone marrow injections for delayed or non-union of bones. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 21(1):60–64
43. Bhargava R, Sankhla S, Gupta A, Changani R, Galgal K (2007) Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of delayed or nonunion. *Indian J Orthop* 41(1):67–71
44. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M (2004) Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(6):1153–1160
45. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM (1990) Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop Relat Res* 256:280–285
46. Adams CI, Keating JF, Court-Brown CM (2001) Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury* 32(1):61–65
47. Matsuda Y, Sakayama K, Okumura H, Kawatani Y, Mashima N, Shibata T (1998) Percutaneous autologous bone marrow transplantation for nonunion of the femur. *Nippon Geka Hokan* 67(1):10–17
48. Hernigou P, Beaujean F (1997) Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 83(1):33–40
49. Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nunez Batalla D, Fernandez Rodriguez MA, Alvarez-Viejo M, Ferrero Gutierrez A, Menendez-Menendez Y, Garcia-Gala JM, Escudero D et al (2013) Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. *Cytotherapy* 15(5):571–577
50. Axelrad TW, Steen B, Lowenberg DW, Creevy WR, Einhorn TA (2008) Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. *J Bone Joint Surg (Br)* 90(12):1617–1622
51. Wysocki RW, Cohen MS (2007) Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant nonunion: a case report. *J Hand Surg [Am]* 32(5):647–650
52. Mroz TE, Wang JC, Hashimoto R, Norvell DC (2010) Complications related to osteobiologics use in spine surgery: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)* 35(9 Suppl):S86–S104
53. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K (2009) The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg (Br)* 91(8):987–996
54. Lenza M, Ferraz Sde B, Viola DC, Santos OF, Cendoroglo Neto M, Ferretti M (2013) Platelet-rich plasma for long bone healing. *Einstein (Sao Paulo)* 11(1):122–127
55. Hernigou P, Homma Y, Flouzat-Lachaniette CH, Poignard A, Chevallier N, Rouard H (2013) Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *J Bone Joint Surg Am* 95(24):2215–2221
56. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA (2001) Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19(1): 117–125
57. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J (2008) The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 29(29):3973–3982
58. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H (2009) Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop* 43(1):40–45



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



General review

Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery



J. Stanovici^{a,b,c,1}, L.-R. Le Nail^{a,b,c,1}, M.A. Brennan^{a,b}, L. Vidal^{a,b}, V. Trichet^{a,b},
 P. Rosset^{a,b,c}, P. Layrolle^{a,b,c,*}

^a Inserm, UMR 957, équipe labellisée Ligue 2012, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes, France

^b Laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, faculté de médecine, université de Nantes, Nantes Atlantique universités, 1, rue Gaston-Veil, 44035 Nantes, France

^c Service de chirurgie orthopédique et traumatologique 2, hôpital Trousseau, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2016
 Accepted 14 April 2016
 Available online 1 June 2016

Keywords:

Cell therapy
 Orthopaedic surgery
 Mesenchymal stromal stem cells
 Bone substitutes
 Osteonecrosis
 Non-union fractures
 Concentrated bone marrow

ABSTRACT

Bone is the most transplanted tissue human with 1 million procedures every year in Europe. Surgical interventions for bone repair are required for varied reasons such as trauma resulting non-union fractures, or diseases including osteoporosis or osteonecrosis. Autologous bone grafting is the gold standard in bone regeneration but it requires a second surgery with associated pain and complications, and is also limited by harvested bone quantity. Synthetic bone substitutes lack the osteoinductive properties to heal large bone defects. Cell therapies based on bone marrow or ex vivo expanded mesenchymal stromal stem cells (MSCs) in association with synthetic calcium phosphate (CaP) bone substitutes may be alternatives to autologous bone grafting. This manuscript reviews the different conventional biological and synthetic bone grafting procedures as well as the more recently introduced cell therapy approaches used in orthopaedic surgery for bone regeneration. Some clinical studies have demonstrated safety and efficacy of these approaches but regeneration of large bone defects remain challenging due to the absence of rapid and adequate vascularisation. Future directions in the field of bone regeneration are presented, such as testing alternative cell sources or in situ fabrication of vascularized bone grafts in patients.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Bone maintenance comprises a tightly coupled balance between bone formation and bone resorption. When this is interrupted by trauma in the form of a bone fracture, bone tissue possesses an innate capacity to repair itself. Indeed apart from the liver, bone is the only tissue in the human body with the capacity of scarless self-renewal [1]. Bone healing is a complex, multi-stage process involving different cell types, extracellular matrices and a myriad of signalling molecules [2]. When a perturbation of the bone-healing cascade occurs, it may result in a delayed bone healing or non-union fracture. A surgical intervention and bone regeneration strategies are required to help fracture repair. In addition to non-union fractures, instances requiring bone-healing approaches include bone diseases such as osteoporosis, osteonecrosis and bone cancer.

The current gold standard for regenerating bone defects remains biological bone grafting, with the bone graft retrieved either from the patient themselves (autograft) or from a donor (allograft). Synthetic bone graft substitutes made from biomaterials can also be employed to fill bone voids. More recently, recent progress in both material science and biology has resulted in the possibility of bone tissue engineering, which combines cells and biomaterials. Mesenchymal stromal stem cells (MSCs), which can be retrieved from the patient's bone marrow, can be combined with synthetic three-dimensional scaffolds and this approach has been proposed as a potential alternative to overcome the critical shortcomings associated with biological or synthetic bone grafts.

At present, in the bone tissue engineering field, three strategies make use of the patient's own bone marrow cells to engineer autologous osteogenic grafts. The first approach consists of aspirating bone marrow, followed by centrifugation [3] to concentrate mononuclear cells, and then immediate implantation into the bone defect with or without a synthetic bone substitute. However, this strategy has not led to reproducible bone which may be due to the low number of MSCs in the bone marrow (e.g. 0.01%

* Corresponding author. Inserm, UMR 957, équipe labellisée Ligue 2012, 44035 Nantes, France. Tel.: +33 2 72 64 11 43; fax: +33 2 40 41 28 60.

E-mail address: pierre.layrolle@inserm.fr (P. Layrolle).

¹ Both first authors have contributed equally to this manuscript.

of mononucleated cells) [4]. In the second approach, the harvested MSCs are cultured for 2–3 weeks in a cell therapy unit in order to isolate and amplify the MSC fraction. Several tens of millions of these cells are then injected alone into a bone defect or seeded onto a suitable scaffold shortly before implantation. These hybrid MSC + biomaterial grafting materials have shown bone-inducing ability in animal models [5]. The third strategy comprises harvesting bone marrow, isolating and expanding the osteoprogenitor cells for several weeks, then seeding them on to a scaffold, where they are cultured for a further few weeks to promote the formation of a bone-like tissue layer on the implant [6]. This hybrid construct is finally transplanted into orthotopic site to regenerate a bone defect. As such, the latter two strategies require several weeks of culturing under strict aseptic conditions making the clinical applications for bone tissue engineering extremely difficult in terms of regulations. In spite of this, the therapeutic value of MSCs are evidenced by the growing number of on-going clinical trials to treat bone defects [7]. However, even though it has been over 30 years since the first efforts in this area, only few bone tissue-engineering techniques have been translated into clinical trials and none of them has become the standard of care. This manuscript reviews the different approaches currently used in orthopaedic surgery for bone regeneration. After considering the challenges of two major indications, non-union fractures and osteonecrosis of the femoral head, strategies for bone induction, augmentation and regeneration will be considered. A particular emphasis will be placed on cell therapy applications in bone healing.

2. Non-union fractures

In the regular follow-up of patients after bone fracture, the course of fracture consolidation is reviewed by conventional, two orthogonal projection plain radiographs. Therefore, the development of a bone healing can be monitored clinically and through imaging. In general, physiological bone repair results in the production of a mechanically strong bone after a few weeks of immobilization and weight bearing suppression for lower limb fractures. In spite of bone's extraordinary healing capability, many cases of long bone fractures require therapeutic intervention to facilitate bone healing and regeneration. An estimated 5% to 10% of fractures result in delayed union or non-union [8] causing patients

to endure impaired function as well as repeated hospitalizations and surgeries. Radiographs in Fig. 1 show examples of long bones non-union fractures. In these radiological images, a large persistent radiolucent zone in the fracture gap can be observed indicating a non-union. Risk factors for long bone non-union fractures include smoking, infection, postoperative fracture gap, polytrauma, and a high degree of initial fracture displacement [9]. Non-union may also result from lack of post-surgery mechanical stability or, conversely, an excessive rigid fixation of osteosynthesis material. Furthermore, important local conditions in the fracture environment such as inadequate blood supply and soft tissue injury can impact bone healing. The reduced numbers and efficacy of host bone marrow progenitor cells is also thought to play a role.

The treatment of non-union fractures is a major challenge in orthopaedic surgery. The total estimated cost of these complications is between 10,000 € and 100,000 € per patient in Europe [10,11]. Surgical interventions aim to enhance mechanical stability through modification of osteosynthesis and reduction of the fracture gap, to increase of compressive motion between fracture fragments, to improve the biological environment by the introduction of new cells, vascular supply and eventually grafting of autologous bone tissue into the fracture gap. The current gold standard of treatment for atrophic non-union includes surgical stabilization and autologous bone grafting with success rates as high as 70%–95%. However, autologous bone grafting is a limited source of material and can be associated with complications, including persistent donor site pain in 16–26% of patients at 3 to 12 months follow-up [12,13]. Increasingly, alternative methods have been tested with variable success in clinical trials. For instance collagen sponges loaded with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and 7 (rhBMP-2 and -7). However, the supraphysiological dosages of these growth factors have resulted in several clinical complications, in particular, the increase of cancer risk [14]. Other alternative treatments of non-unions consist of the percutaneous injections of concentrated autologous bone marrow (CABM) or ex vivo culture expanded MSCs as well as their combinations with synthetic bone fillers in open surgery. These new cell therapy treatments are currently being investigated to facilitate bone healing in clinical trials and will be discussed in further detail in the following sections.

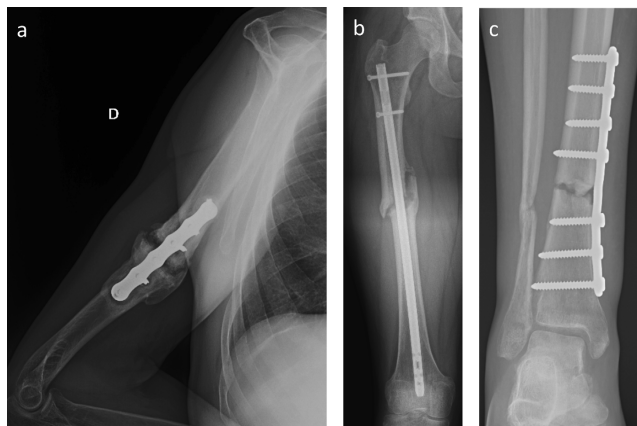


Fig. 1. Plain radiographs of long bone non-union fractures (a: humerus; b: femur; c: tibia).

3. Avascular necrosis of femoral head

Osteonecrosis, or non-traumatic avascular necrosis of the femoral head (ANFH), is a painful and debilitating skeletal disorder of impaired blood supply to the bone [15]. Femoral head ischemia can lead to cellular death and collapse of the necrotic femoral head. The disease progresses to osteoarthritis and often requires a total hip joint replacement [16]. Non-traumatic ANFH manifests in relatively young patients (average age: 38 years) [17,18] and accounts for up to 12% of total hip replacements performed in developed countries [19]. Risk factors for this disorder include corticosteroid use [20], alcohol abuse [21], and idiopathic causes [22]. It is more prevalent in males than females with a gender ratio of 7:3 [23]. Non-traumatic ANFH was first described in 1738, by Alexander Munro, yet since then, relatively little consensus regarding the pathophysiology or the best treatment strategy have been established [19]. The underlying etiology of steroid induced osteonecrosis remains elusive. Several causative mechanisms have been postulated including the hypertrophy of adipocytes causing extravascular compression and collapse of blood vessels [24], fat emboli disrupting circulation [25], and the direct damage of smooth muscle cells in the walls of blood vessels by steroids [26]. Alcohol-associated ANFH patients show disturbed liver function [21] and similarly to steroid use, alcohol consumption also causes lipid metabolism abnormalities [27] which could contribute to progression of osteonecrosis in alcohol-associated ANFH cases.

Treatments for ANFH can be divided into non-operative conservative treatments including drug therapies and biophysical stimulations, and surgical interventions including core decompression, osteotomy, bone grafting, and total hip arthroplasty [28]. Treatment of ANFH depends largely on the stage of disease progression [22]: for the early stages (as depicted in Fig. 2), in which femoral sphericity is maintained, conservative treatments or less invasive surgical treatment modalities are proposed. Pharmacological management of ANFH include bisphosphonate [29], statins [30], anticoagulants [31] vasoactive drugs [32] as well as analgesics. For the late symptomatic stages, in which the femoral head collapses, a total joint replacement with prosthesis is usually required. Currently, there is no consensus regarding the best surgical treatment of early stage ANFH to avoid femoral head collapse but the most common procedure performed remains core decompression [33]. It consists of drilling the osteonecrotic zone of the femoral head. Although decompression has been shown to consistently alleviate pain [28,34], its success in delaying ANFH progression is controversial. Randomized clinical trials showed that the core decompression treatment of ANFH was superior [35], or conversely showed no difference [34] in delaying the disease progression and the femoral head collapse compared to

conventional treatments. A recent meta-analysis of all randomized clinical trial data to date concluded that the core decompression treatment of ANFH is effective at averting femoral collapse within short term follow-up durations compared to conventional treatments such as physical therapy and non-weight bearing [28]. However, this meta-analysis study also pointed that non-invasive biophysical stimulation was even better at preventing femoral collapse than core decompression [28]. Specifically, these biophysical stimulations included pulsed electromagnetic fields [36] and extracorporeal shock wave treatments [37]. More recently, core decompression has been combined with a further treatment such as osteotomy, biological agents [38], or bone grafting [18] and with the aim of averting the need for a total hip joint replacement. Both non-vascularized and vascularized bone grafts have been shown to be effective at stalling the requirement for a total hip arthroplasty [39,40]. Cell therapy treatments of early stage ANFH have also been proposed and will be discussed in details below.

4. Biological bone grafts

Bone grafting is widely used in orthopaedic surgery to repair injured, aged or diseased skeletal tissues. Each year, there are approximately 2.2 million bone graft procedures performed worldwide, including 1 million procedures in Europe [41], with numbers set to increase due to our aging population. Autologous bone grafting is the safest and most effective grafting procedure and entails harvesting the patient's own bone fragments at a second surgical site, generally the iliac crest, and transplanting them to the site of injury [42]. Bone autograft contains bone cells to enhance osteogenesis and proteins to boost osteoinduction, while providing a scaffold to fill the bone void and to support bone healing by osteoconduction. However, bone autograft is limited in quantity (about 20 cm³) and the harvesting process may induce morbidity, pain and complications at the second surgical site [43,44]. The harvesting procedure also requires a significant extension of surgery time for the preparation and collection of bone tissue, thereby increasing staff costs and analgesic treatments.

Allografting is a further type of bone grafting whereby bone is recovered from one individual for transplantation to another. This method circumvents the need for the patient to have sufficient volumes of good quality bone available at a second surgical site. However, allografts only guarantee osteoconductive properties due to the various processing steps to avoid immunological rejection but still carry the risk of disease transfer, infection and rejection [45,46]. Allografts are sourced from bone banks and are prepared by either fresh freezing or freeze-drying (lyophilisation) in order to reduce immunogenicity and allow storage for extended periods of time [39]. Fresh frozen allografts can be stored frozen

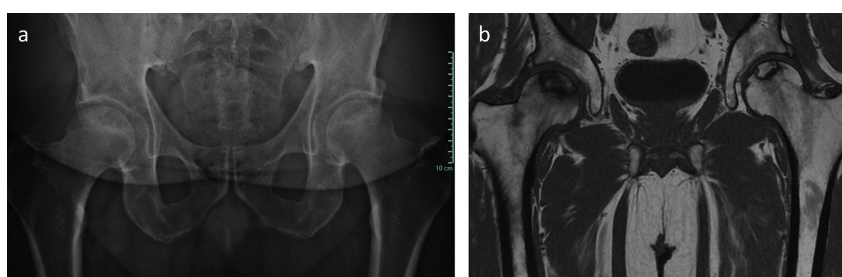


Fig. 2. Radiograph (a) and magnetic resonance imaging (b: T1 sequence) of bilateral avascular osteonecrosis of the femoral head at early stage.

with no change in structural characteristics, while despite widespread belief that freezing eradicates living cells in allogeneic grafts, this has been proven not to be the case [47]. Freeze-drying kills all cells, thereby further reducing immunogenicity than fresh freezing, however, the mechanical strength of the graft is compromised by this technique [48]. Nowadays, sophisticated virus inactivation treatments and irradiating techniques prevent disease transmission with these allogeneic bone grafts [49].

5. Synthetic calcium phosphates as bone substitutes

Considering the drawbacks associated with both autografts and allografts, scientists have long sought biocompatible synthetic materials that could be used in place of the transplanted bone. Currently, there are several biomaterials that are used for filling bone defects. The most popular are calcium-phosphate ceramics, which usually combine hydroxyapatite (HA) and beta tricalcium phosphate (β-TCP) – so-called biphasic calcium phosphate (BCP) [50]. These compounds closely resemble the mineral component of bone [51]. Upon implantation, these biomaterials partly dissolve and precipitate on their surface a biological carbonate apatite containing proteins that favour cell adhesion, osteoblastic differentiation and deposition of mineralized collagen thus, guiding bone tissue in-growth [51]. Nevertheless, these synthetic bone substitutes have insufficient bone regenerative properties to heal large bone defects and are often employed to supplement autologous bone graft.

Depending on the clinical indication and the surgical technique (e.g. open surgery or percutaneous), calcium phosphate ceramics are prepared in the form of granules, anatomical porous blocks, putties or injectable pastes (Fig. 3). Like autografts and allografts, synthetic bioceramics have insufficient strength to sustain the body load and therefore, are always accompanied with metal fixation devices like plates and screws, intramedullary nails or external fixators in load-bearing sites. As shown in Fig. 3, these biomaterials exhibit macroporosity with interconnected pores or inter-granular spaces of 100–400 μm mimicking the structure of trabecular bone, thus facilitating the permeability to body fluids, neovascularisation and bone in-growth. Submicron-scale surface architecture of CaP ceramics facilitates osteogenic and osteoclastic differentiation and bone formation *in vivo* [52]. It has also been shown that these biomaterials promote the adhesion, proliferation, and osteoblastic differentiation of bone marrow derived MSCs into osteoblasts that produce the collagen matrix that subsequently undergoes mineralization [53]. More recently, microporous CaP ceramics have been shown to induce a beneficial response to macrophages and their differentiation into osteoclasts, the bone resorbing cells that further trigger osteoinduction [54,55]. The favourable biocompatibility and osteoconductive properties of synthetic calcium phosphate bioceramics have made them the

third choice of material for bone reconstructive surgery, after autologous bone and allografts. However, despite decades in development, synthetic calcium phosphate bone substitutes still only represent approximately 10% of the bone graft market [56]. Osteoconductive bioceramics alone lack the osteogenic properties that would allow them to repair large bone defects, therefore, there is extensive on-going research and development to impart them with bone regenerative properties similar to autografts.

6. Bone regeneration with bone marrow

Bone marrow can be aspirated into heparin syringes by using a trocar with several punctures in the posterior iliac crest, under local or general anaesthesia. Non-concentrated whole bone marrow grafting has been used successfully to treat non-union fractures, by percutaneous injection into the injury site [57–60]. The mononuclear cell fraction of bone marrow comprises monocytes, lymphocytes, and hematopoietic stem and progenitor cells. In order to increase the number of injected mononuclear cells and consequently of MSCs, the aspirated bone marrow can be concentrated by centrifugation (Fig. 4). Typically, 400 to 500 mL of bone marrow is either centrifuged in a cell therapy unit or intraoperatively with concentrators to produce 40 to 50 mL of concentrated bone marrow within 2 hours or 30 min. After concentration, Hernigou et al. have obtained 2579 ± 1121 MSCs/mL, which is between 3- to 6-fold the number in the bone marrow [3]. Due to the ease of collecting, concentration and re-injection in non-union or osteonecrotic sites, bone marrow is the most commonly used cell therapy for bone regeneration in orthopaedic surgery. Concentrated bone marrow contains a mononuclear cell fraction that contributes to both the vascularization and the bone-healing cascade. Since a surgical approach for the treatment of delayed-union or non-union sites can lead to complications, particularly infections, percutaneous injections of concentrated bone marrow are preferred and have proved their effectiveness at healing non-unions [3,61–63]. Concentrated bone marrow can also be combined intraoperatively with a synthetic or natural osteoconducting matrix (e.g., allogeneic bone graft) before implantation and has been shown efficacy in achieving bone healing in long bone non-union fractures [64,65], as well as spinal fusions [66–68], bone defects following revision hip surgery [3] and long bone pseudarthrosis [69]. Concentrated bone marrow is also successfully used in ONFH after core decompression. Indeed, patients with glucocorticoid induced ANFH have a decreased number of MSCs in their proximal femur [70], and injection of concentrated bone marrow in unison with core decompression has shown remarkable improvement in pain and disease progression as well as significant capability to avoid the need for hip arthroplasty [38,71,72]. Further studies showed the benefit of concentrated bone marrow to treat ANFH [73] or in unison with

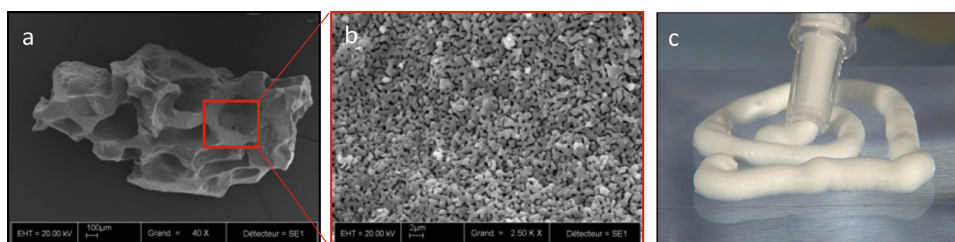


Fig. 3. Synthetic bone substitutes made of biphasic calcium phosphate ceramics. SEM micrographs showing BCP granules (a) and their microporous surface at high magnification (b). Injectable paste consisting of calcium phosphate granules suspended in a hydroxy propyl methyl cellulose hydrogel (c).

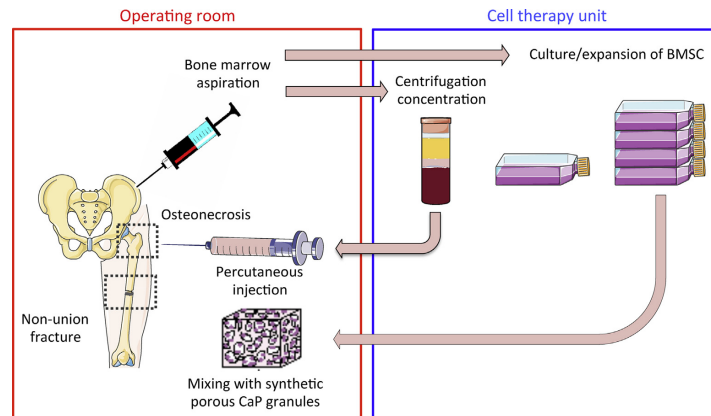


Fig. 4. Cell therapies for bone regeneration in orthopaedic surgery.

porous hydroxylapatite composite [74] following core decompression. Aarvold et al. have impacted milled allograft bone and concentrated bone marrow into the necrotic region of the femoral head and found the treatment to be effective at delaying the need for total hip replacement in most patients. Furthermore, they observed that the newly formed bone was structurally and functionally similar to standard trabecular bone tissue [75].

7. Bone regeneration with ex vivo culture expanded mesenchymal stromal cells

Pioneering reports in the 1960s by Alexander Friedenstein et al. laid the foundations for the modern era of multipotent stromal cell MSCs research. Bone marrow is a good source of MSCs that have

clonogenicity and multipotential characteristics. In general, MSC are isolated from bone marrow by their capacity to attach on treated culture polystyrene (Fig. 5). After culturing bone marrow for a few days, fibroblastic spindle shape adherent cells are observed forming colonies that are so-called colony forming units-fibroblast (CFU-F). In addition to plastic adherence, the International society for cellular therapy [76] have outlined specific surface marker antigens expression and trilineage differentiation potential for osteogenic, adipogenic, and chondrogenic lineages as minimal criteria for defining MSC (Fig. 5).

The contribution of MSC to bone repair has been well-established in preclinical models [5,54,77]. Furthermore, several clinical trials are underway to study the role of bone marrow derived MSCs in healing long bone fractures as summarized by

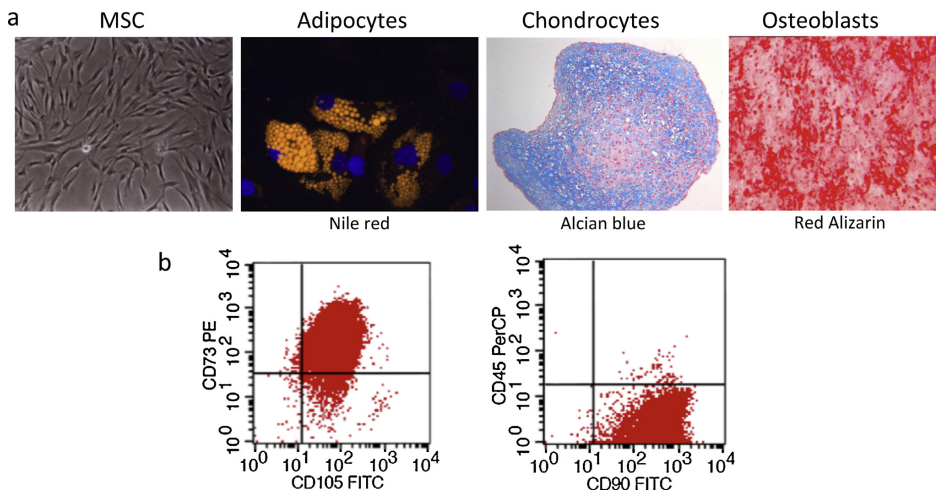


Fig. 5. Characteristics of mesenchymal stromal stem cells isolated and cultured from bone marrow. a: adherent fibroblastic-like cells able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts; b: flow cytometry.

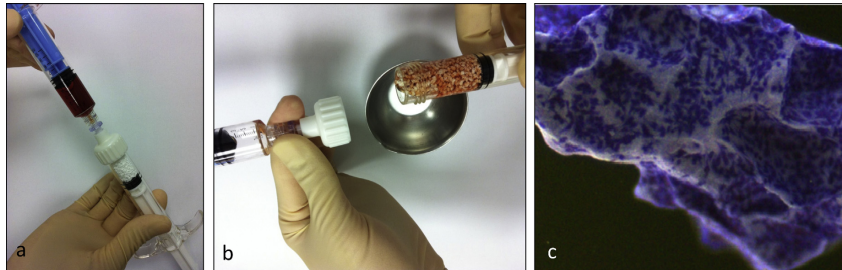


Fig. 6. Association of cells and biomaterials in the surgical room. a: concentrated bone marrow or culture-expanded MSC are mixed with BCP granules in syringes; b: After 60 min, cells attach on granules (c: methylene blue staining) and the mixture is implanted in the bone defect.

Watson et al. [7]. Quarto et al. were the first to present a report on preliminary clinical data of three patients, which were treated with autologous bone marrow stromal cells and hydroxyapatite porous blocks in long bone defects. Complete fusion in all three cases was observed [78,79]. Furthermore, Liebergall et al. showed that bone marrow MSCs in combination with demineralized bone matrix applied early after fracture occurrence of the distal tibia reduced the healing duration [80]. Our strategy in bone regeneration of non-union long bone fractures involves the harvesting of 30 mL of bone marrow from the patient, the transportation to the cell therapy unit where autologous MSCs are isolated and expanded in culture with blood platelet lysate for 3 weeks and shipment to the surgery room. As shown in Fig. 6, MSCs are then mixed with synthetic biphasic calcium phosphate granules for 1 h to allow cells to attach on the biomaterial. The mixture of autologous MSCs and synthetic bone substitute is finally implanted into the site of non-unions (clinical trial number: NCT01842477).

MSCs have also been applied to treat osteonecrosis of the femoral head, but mainly in preclinical models. Lebouvier et al. developed a procedure for delivery of bone marrow MSCs to the necrotic site via intra-osseous injection, and observed rapid healing after only 9 weeks in a porcine ANFH [81]. It was also shown in sheep that MSCs loaded onto bone matrix scaffolds and implanted after core decompression regenerate bone tissue more efficiently compared to both core decompression alone and core decompression followed by implantation of an acellular scaffold [82]. The lack of vascularization is a major limitation to the success of tissue engineered constructs [83] and given the angiogenic potential of MSCs, it has been postulated that their delivery would enhance the neovascularisation and hence, bone healing in ANFH patients [84]. Ex vivo amplification hugely increases the quantities of MSCs administered compared to concentrated bone marrow. Müller et al. applied ex vivo expanded MSCs to treat osteonecrosis in 5 patients and observed clinical improvements in all cases radiological findings, pain levels, and daily activity [84]. A further study observed bone regeneration with no progression of disease state when they applied ex vivo expanded MSCs and a free vascularized fibula to osteonecrotic femoral heads in three patients [85]. While these data to date suggests positive benefits of the application of cell therapy for ANFH, these studies include small numbers of patients and further larger studies are required before accurate conclusions can be made.

8. Future directions

Few published data are available with regard to the clinical use of bone tissue engineering. Significant work remains to be done before determining whether this method is suitable for the routine

filling of bone tissue defects. Comprehensive clinical results are required to further progress in cell therapy strategies for bone regeneration and clinical trials already launched may provide important information in the near future. If clinical results are positive, this may pave the way for the development of more complex tissue engineering techniques, permitting the treatment of large bone defects where vascularisation is critical. A multidisciplinary approach will be required to improve implanted cell survival and to ensure prompt vessel in-growth into the biomaterial via careful selection of structure, composition and shape of biomaterial, together with addition of cells, cytokines and growth factors.

Among adult stem cells, MSCs are the most suitable for bone tissue engineering. They can be isolated from a variety of mesenchymal tissues and can differentiate into osteoblasts when given appropriate mechanical support and osteoinductive signal [53,86]. Several tissue sources have been considered as a source of MSC for bone regeneration, including but not limited to bone marrow [87], adipose tissue [83], umbilical cord [88], induced pluripotent stem cells [89] and embryonic and foetal stem cells [90]. Due to safety issues, currently induced pluripotent stem cells [91] and foetal stem cells [92] may be more suitable for studying human development and tissue formation under diverse experimental conditions, and represent an excellent base for understanding human diseases and development of innovative therapeutic solutions instead of clinical applications. The immunosuppressive properties of MSCs may allow the transplantation of allogeneic MSCs in various orthopaedic conditions, with the establishment of cell banks for regenerative medicine. Early trials evaluating allogeneic MSCs in delayed unions are already under way in companies such as Mesoblast and bone therapeutics but results have not yet been published.

In situ bone tissue engineering may overcome the difficulty of donor-site morbidity associated with autologous bone grafts as well as the lack of a vascularized system in MSCs/biomaterial constructs to heal large bone defects. The feasibility of in situ production of a custom made vascularized bone graft has been demonstrated in a few clinical cases [93,94]. It consists of implantation of a composite material (cells + scaffold) into a heterotopic site, e.g. subcutis site with artery and vein, or a highly-vascularized muscle, to promote angiogenesis and blood vessel growth into the construct for some weeks. Then, the vascularized bone graft is transferred to the bone defect site with vascular anastomoses. Although the use of the patient as its own bioreactor seems a good alternative for regenerating large bone defects, only anecdotic experience is available. It is envisioned that a vascularized custom bone graft may be produced from medical imaging and 3D printing, by implantation in ectopic sites of the

patient and connection to a vascular pedicle. After a few weeks, the vascularized bone graft may be transplanted to reconstruct a large bone defect resulting from trauma, resection of tumors or osteomyelitis. Finally, a future step that may help to further define and spread these innovative cell therapy treatments is a careful cost–benefit assessment and a broad economic evaluation to clarify the best indications of bone repair cell therapy as a standard procedure, if confirmation of safety and efficacy is clearly derived from current clinical trials.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

This work was supported in part by the European Commission, Seventh Framework Programme (FP7), through the Reborne Project, grant agreement no. 241879.

References

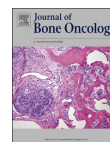
- [1] Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration – bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14(2):247–59.
- [2] Marzona L, Pavolini B. Play and players in bone fracture healing match. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2009;6(2):159–62.
- [3] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for non-unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(7):1430–7.
- [4] Caplan AL. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429–35.
- [5] Brennan MA, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Preclinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(5):114.
- [6] Dong Y, Chen X, Hong Y. Tissue-engineered bone formation in vivo for artificial laminae of the vertebral arch using β -tricalcium phosphate bioceramics seeded with mesenchymal stem cells. *Spine* 2013;38(21):E1300–6.
- [7] Watson L, Elliman SJ, Coleman CM. From isolation to implantation: a concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(2):51.
- [8] Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(6):940–56.
- [9] Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury* 2015;46(Suppl. 8):S8–19.
- [10] Mills LA, Simpson AHRW. The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): a 5-year epidemiological study. *BMJ Open* 2013;3(2):e002276.
- [11] Dahabreh Z, Giannoudis P. A cost analysis of treatment of tibial fracture non-unions: a comparative study between autologous iliac crest bone grafting and bone morphogenetic protein-7. *Orthop Proc* 2012;94–B(Suppl. IV):94.
- [12] Kim DH, Rhim R, Li L, Martha J, Swaim BH, Banco RJ, et al. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine J* 2009;9(11):886–92.
- [13] Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 2003;28(2):134–9.
- [14] Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST, et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95(17):1537–45.
- [15] Lavernia CJ, Sierra RJ, Grieco FR. Osteonecrosis of the femoral head. *J Am Acad Orthop Surg* 1999;7(4):250–61.
- [16] Ohzono K, Saito M, Takaoka K, Ono K, Saito S, Nishina T, et al. Natural history of nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. *Bone Joint J* 1991;73–B(1):68–72.
- [17] Feng CK, Yu JK, Chang MC, Chen TH, Lo WH. Vascularized iliac bone graft for treating avascular necrosis of the femoral head. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1998;61(8):463–9.
- [18] Liu D, Chen Q, Chen Y, Liu Y. [Long-term follow-up of early-middle stage avascular necrosis of femoral head with core decompression and bone grafting]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2012;26(10):1165–8.
- [19] Hamilton TW, Goodman SM, Figgie M. SAS weekly rounds: avascular necrosis. *HSS J* 2009;5(2):99–113.
- [20] Beckmann R, Shaheen H, Kweider N, Ghassemi A, Fragoulis A, Hermanns-Sachweh B, et al. Enoxaparin prevents steroid-related avascular necrosis of the femoral head. *Sci World J* 2014;2014:347813.
- [21] Antti-Poika I, Karaharju E, Vanikka E, Paavilainen T. Alcohol-associated femoral head necrosis. *Ann Chir Gynaecol* 1987;76(6):318–22.
- [22] Moya-Angeler J, Gianakos AL, Villa JC, Ni A, Lane JM. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World J Orthop* 2015;6(8):590–601.
- [23] Cui L, Zhuang Q, Lin J, Jin J, Zhang K, Cao L, et al. Multicentric epidemiologic study on 6395 cases of femoral head osteonecrosis in China. *Int Orthop* 2015.
- [24] Johnson L. Histogenesis of avascular necrosis. In: Proceedings of the conference on aseptic necrosis of the femoral head; 1964. p. 55–79.
- [25] Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1977;59(6):729–35.
- [26] Nishimura T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K. Histopathologic study of veins in steroid treated rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1997;334:37–42.
- [27] Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Iwasaki K, Yamaguchi R, Zhao G, et al. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated rabbits: a morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses. *Int J Exp Pathol* 2011;92(4):290–5.
- [28] Hong Y-C, Zhong H-M, Lin T, Shi J-B. Comparison of core decompression and conservative treatment for avascular necrosis of femoral head at early stage: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):5207–16.
- [29] Yuan H-F, Guo C-A, Yan Z-Q. The use of bisphosphonate in the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis of randomized control trials. *Osteoporos Int* 2016;27(1):295–9.
- [30] Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res* 2001;386:173–8.
- [31] Glueck CJ, Freiberg RA, Sieve L, Wang P. Enoxaparin prevents progression of stages I and II osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:164–70.
- [32] Jäger M, Tillmann FP, Thornhill TS, Mahmoudi M, Blondin D, Hetzel GR, et al. Rationale for prostaglandin I₂ in bone marrow oedema – from theory to application. *Arthritis Res Ther* 2008;10(5):R120.
- [33] Lieberman JR, Berry DJ, Montv MA, Aaron RK, Callaghan JJ, Rayadhyaksha A, et al. Osteonecrosis of the hip: management in the 21st century. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84(5):834–52.
- [34] Koo KH, Kim R, Ko GH, Song HR, Jeong ST, Cho SH. Preventing collapse in early osteonecrosis of the femoral head. A randomised clinical trial of core decompression. *Bone Joint J* 1995;77–B(6):870–4.
- [35] Stulberg BN, Davis AW, Bauer TW, Levine M, Easley K. Osteonecrosis of the femoral head. A prospective randomized treatment protocol. *Clin Orthop Relat Res* 1991;268:140–51.
- [36] Aaron RK, Lennox D, Bunce GE, Ebert T. The conservative treatment of osteonecrosis of the femoral head. A comparison of core decompression and pulsing electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* 1989;249:209–18.
- [37] Wang C-J, Wang F-S, Huang C-C, Yang KD, Weng L-H, Huang H-Y. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(11):2380–7.
- [38] Gangji V, Hauzeur JP. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(Suppl. 1)(Pt 1):106–12.
- [39] Mont MA, Etienne G, Ragland PS. Outcome of non vascularized bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res* 2003;417:84–92.
- [40] Babhulkar S. Osteonecrosis of femoral head: Treatment by core decompression and vascular pedicle grafting. *Indian J Orthop* 2009;43(1):27–35.
- [41] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36(3 Suppl.):S20–7.
- [42] Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84–A(5):716–20.
- [43] Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71(4):677–80.
- [44] Gamradt SC, Lieberman JR. Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res* 2003;417:183–94.
- [45] Conrad EU, Gretsch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(2):214–24.
- [46] Shegari H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2009;17(2):206–11.
- [47] Heyligers IC, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005;6(1):25–31.
- [48] Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA. Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78(3):363–8.
- [49] Selves P, Mirabet V, Alvarez M. Hepatitis B transmission by cell and tissue allografts: how safe is safe enough? *World J Gastroenterol* 2014;20(23):7434–41.
- [50] LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(3):201–9.
- [51] Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 2006;1(3):317–32.
- [52] Davison NL, Luo X, Schoenmaker T, Everts V, Yuan H, Barrère-de Groot F, et al. Submicron-scale surface architecture of tricalcium phosphate directs osteogenesis in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater* 2014;27:281–97 [discussion 296–7].
- [53] Gambin AL, Renaud A, Charrier C, Hulín P, Louarn G, Heymann D, et al. Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem

- cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules. *Acta Biomaterialia* 2014;10(12):5139–47.
- [54] Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lézot F, Heymann D, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials* 2014;35(36):9660–7.
- [55] Davison NL, Gamblin AL, Layrolle P, Yuan H, de Bruijn JD, Barrère-de Groot F. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicronstructured beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2014;35(19):5088–97.
- [56] Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:44–52.
- [57] Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1991;266:259–70.
- [58] Garg NK, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand* 1993;64(6):671–2.
- [59] Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 2005;36(1):203–6.
- [60] Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci* 2001;55(6):326–36.
- [61] Le Nail LR, Stanovici J, Fournier J, Spingard M, Domenech J, Rosset P. Percutaneous grafting with bone marrow autologous concentrate for open tibia fractures: analysis of 43 cases and literature review. *Int Orthop* 2014;38(9):1845–53.
- [62] Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res* 1995;313:8–18.
- [63] Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355(Suppl.):S257–66.
- [64] Scaglione M, Fabrizi L, Dell'omo D, Gambini F, Guido G. Long bone non-unions treated with autologous concentrated bone marrow-derived cells combined with dried bone allograft. *Musculoskelet Surg* 2014;98(2):101–6.
- [65] Thua THL, Bui DP, Nguyen DT, Pham DN, Le QB, Nguyen PH, et al. Autologous bone marrow stem cells combined with allograft cancellous bone in treatment of non-union. *Biomed Res Ther* 2015;2(12):1–9.
- [66] Johnson RC. Bone marrow concentrate with allograft equivalent to autograft in lumbar fusions. *Spine* 2014;39(9):695–700.
- [67] Ajiboye RM, Hamamoto JT, Eckardt MA, Wang JC. Clinical and radiographic outcomes of concentrated bone marrow aspirate with allograft and demineralized bone matrix for posterolateral and interbody lumbar fusion in elderly patients. *Eur Spine J* 2015;24(11):2567–72.
- [68] Hart R, Komzák M, Okál F, Náhlik D, Jajtner P, Puskeiler M. Allograft alone versus allograft with bone marrow concentrate for the healing of the instrumented posterolateral lumbar fusion. *Spine J* 2014;14(7):1318–24.
- [69] Fernandez-Bances I, Perez-Basterrechea M, Perez-Lopez S, Nuñez Batalla D, Fernandez Rodríguez MA, Alvarez-Viejo M, et al. Repair of long-bone pseudoarthrosis with autologous bone marrow mononuclear cells combined with allogenic bone graft. *Cytotherapy* 2013;15(5):571–7.
- [70] Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81(2):349–55.
- [71] Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2002;405:14–23.
- [72] Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop* 2009;43(1):40–5.
- [73] Ma Y, Wang T, Liao J, Gu H, Lin X, Jiang Q, et al. Efficacy of autologous bone marrow buffy coat grafting combined with core decompression in patients with avascular necrosis of femoral head: a prospective, double-blinded, randomized, controlled study. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(5):115.
- [74] Liu Y, Liu S, Zhou S, Su X, Wang L, Jiang W, et al. Efficacies of bone-marrow-derived mononuclear cells with a hydroxylapatite composite in the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2013;93(27):2126–30.
- [75] Aarvold A, Smith JO, Tayton ER, Jones AMH, Dawson JI, Lanham S, et al. A tissue engineering strategy for the treatment of avascular necrosis of the femoral head. *Surgeon* 2013;11(6):319–25.
- [76] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–7.
- [77] Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells* 2006;24(9):2140–9.
- [78] Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344(5):385–6.
- [79] Maracci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007;13(5):947–55.
- [80] Liebergall M, Schroeder J, Mosheiff R, Gazit Z, Yoram Z, Rasooly L, et al. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study. *Mol Ther* 2013;21(8):1631–8.
- [81] Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, Amiaud J, Leotot J, Hernigou P, et al. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:68.
- [82] Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012;132(11):1611–8.
- [83] Brennan M, Davaine JM, Layrolle P. Prevascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(4):96.
- [84] Müller I, Vaegler M, Holzwarth C, Tzaribatchev N, Pfister SM, Schütt B, et al. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. *Leukemia* 2008;22(11):2054–61.
- [85] Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, Kotobuki N, Sugimoto K, Ohmura T, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 2006;30(12):960–2.
- [86] Brennan MA, Renaud A, Gamblin A-L, D'Arros C, Nedellec S, Trichet V, et al. 3D cell culture and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells plated onto jet-sprayed or electrospun micro-fiber scaffolds. *Biomed Mater* 2015;10(4):045019.
- [87] Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010;31(13):3572–9.
- [88] Todeschi MR, El Backly R, Capelli C, Daga A, Patrone E, Introna M, et al. Transplanted umbilical cord mesenchymal stem cells modify the in vivo microenvironment enhancing angiogenesis and leading to bone regeneration. *Stem Cells Dev* 2015;24(13):1570–81.
- [89] Hayashi K, Ochiai-Shino H, Shiga T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, et al. Transplantation of human-induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. *BDJ Open* 2016;2. [Internet, cité 5 février 2016] <http://www.nature.com/articles/bdjopen20157>.
- [90] Marolt D, Campos IM, Bhumiratana S, Koren A, Petridis P, Zhang G, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. *PNAS* 2012;109(22):8705–9.
- [91] Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotech* 2009;27(8):743–5.
- [92] Amariglio N, Hirschberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6(2):e1000029.
- [93] Horch RE, Beier JP, Kneser U, Arkudas A. Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2014;18(7):1478–85.
- [94] Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmüller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364(9436):766–70.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Bone Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbo

Research Paper

Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status



Pierre Avril^{a,b}, Louis-Romée Le Nail^{a,b,c,d}, Meadhbh Á. Brennan^{a,b}, Philippe Rosset^{a,b,c,d}, Gonzague De Pinieux^{a,b,d,f}, Pierre Layrolle^{a,b}, Dominique Heymann^{a,b}, Pierre Perrot^{a,b,e}, Valérie Trichet^{a,b,*}

^a INSERM, UMR 957, Equipe Labellisée LIGUE 2012, Nantes F-44035, France

^b Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France

^c University Hospital, Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Tours F-37044, France

^d Faculté de Médecine, Université François Rabelais, Tours F-37044, France

^e University Hospital, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes F-44093, France

^f University Hospital, Service d'Anatomie Pathologique, Tours F-37044, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2015

Received in revised form

13 November 2015

Accepted 30 November 2015

Available online 12 December 2015

Keywords:

Mesenchymal stem cell

Osteosarcoma

Adipose tissue transfer

Cell cycle

Quiescence

ABSTRACT

Conventional therapy of primary bone tumors includes surgical excision with wide resection, which leads to physical and aesthetic defects. For reconstruction of bone and joints, allografts can be supplemented with mesenchymal stem cells (MSCs). Similarly, adipose tissue transfer (ATT) is supplemented with adipose-derived stem cells (ADSCs) to improve the efficient grafting in the correction of soft tissue defects. MSC-like cells may also be used in tumor-targeted cell therapy. However, MSC may have adverse effects on sarcoma development. In the present study, human ADSCs, MSCs and pre-osteoclasts were co-injected with human MNNG-HOS osteosarcoma cells in immunodeficient mice. ADSCs and MSCs, but not the osteoclast precursors, accelerated the local proliferation of MNNG-HOS osteosarcoma cells. However, the osteolysis and the metastasis process were not exacerbated by ADSCs, MSCs, or pre-osteoclasts. *In vitro* proliferation of MNNG-HOS and Saos-2 osteosarcoma cells was increased up to 2-fold in the presence of ADSC-conditioned medium. In contrast, ADSC-conditioned medium did not change the dormant, quiescent state of osteosarcoma cells cultured in oncospheres. Due to the enhancing effect of ADSCs/MSCs on *in vivo/in vitro* proliferation of osteosarcoma cells, MSCs may not be good candidates for osteosarcoma-targeted cell therapy. Although conditioned medium of ADSCs accelerated the cell cycle of proliferating osteosarcoma cells, it did not change the quiescent state of dormant osteosarcoma cells, indicating that ADSC-secreted factors may not be involved in the risk of local recurrence.

© 2015 Elsevier GmbH. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

High-grade osteosarcoma is an aggressive primary malignant bone tumor that is associated with a relatively good outcome; since pre-operative and adjuvant combination chemotherapy has been introduced the survival rate at 5 years for the non-metastatic form at diagnosis has been 50–70% [1,2]. Osteosarcoma treatment comprises surgical excision with wide resection of the tumor after neo adjuvant chemotherapy. Adjuvant chemotherapy is then

adapted to histological response [3]. Concerning surgical techniques, limb sparing is currently the preferred option. Reconstruction is dependent on resection site: if epiphysis cannot be preserved, mega prosthesis sometimes associated with an allograft is typically used [4]. Otherwise, different conservative techniques are described: massive autograft [5], vascularized autograft sometimes associated with allograft or isolated allograft [6–8].

A permanent remission from osteosarcoma can be anticipated after 10 years of event free survival [9–13], where after the primary challenge is to ameliorate the quality of life of patients suffering from physical and aesthetic defects caused by tumor resection. For recovery of damaged soft tissues, plastic and reconstructive surgery includes autologous grafts of adipose tissue. Regenerative medicine promises new alternatives through the use

* Corresponding author at: Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France.

E-mail address: valerie.trichet@univ-nantes.fr (V. Trichet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbo.2015.11.002>

2212-1374/© 2015 Elsevier GmbH. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved.

of mesenchymal stem cells (MSCs), which are bone marrow-resident and multipotent cells. They have been originally identified as a source of bone progenitor cells, but they also differentiate into adipocytes, chondrocytes and myoblasts. Human MSCs may be combined with scaffolds to increase bone healing as reported previously [10,12]. Moreover, the use of MSCs cultured from bone marrow to supplement an osteoarticular allograft in patients treated after bone tumor resection did not increase the risk of local tumor recurrence compared to control populations. Additionally, MSCs can be modified to express tumor-targeted agents [14,15] and used as “mesenkillers” [16].

Adipose tissue represents an alternative source of MSC-like cells, avoiding the problems of pain, morbidity and low cell number associated with bone marrow harvest [17]. In plastic and reconstructive surgery, adipose tissue-derived stromal cells (ADSCs) may be used to increase *in situ* survival of the autologous adipose-tissue graft [18–23]. ADSC have also been utilized as cellular delivery vehicles in bone reconstruction [24].

The use of adjuvant MSC-like cells in the treatment of osteosarcoma may be an important therapeutic issue for patients with lung metastasis associated with poor outcome (30% survival rate at 5 years) [25]. However, the impact of unmodified MSCs on tumor progression remains unpredictable [26]. For instance, it has been observed that rat and human MSCs can promote tumor growth and metastasis in osteosarcoma models [27–30].

Facing a unique clinical case of osteosarcoma recurrence following autologous adipose-tissue transfer [30], we started to investigate the interactions between osteosarcoma and adipose tissue by using pre-clinical experiments [30,64]. In the present report, we compared the interactions of MNNG-HOS cells-induced osteosarcoma with human ADSCs/MSCs and with human pre-osteoclasts. It is established that osteoclasts are involved in osteosarcoma progression and are believed to either enhance or suppress metastases [31–33]. In this study, pre-osteoclasts did not increase the tumor size and the lung metastasis. In contrast, ADSCs and MSCs increased the size of MNNG-HOS-induced tumors, but the metastasis process and rate of osteolysis were not exacerbated. Paracrine effects of ADSCs were investigated on osteosarcoma cells after culture in monolayer or oncospheres in order to observe the effects on proliferative or quiescent cell stages. The addition of 50% ADSC-conditioned medium significantly increased the *in vitro* proliferation of two osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS and Saos-2), whereas it did not decrease the proportion of cells in G₀ phase. These results suggest that ADSCs/MSCs may be safe in reconstructive surgery after bone tumor resection and not involved in the risk of local recurrence. However, ADSCs/MSCs do not appear to be good candidates for tumor-targeted cell therapy in osteosarcoma, given their enhancing effects on tumor progression.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Adipose tissue samples were obtained from patients who underwent abdominal liposuction in the plastic surgery department of Nantes University Hospital (France). Bone marrow aspirates were obtained from patients during orthopaedic surgical procedures in Tours University Hospital (France). Blood samples were obtained from the “Etablissement Français du Sang” in Nantes. Oral consent was obtained from informed patients in accordance with French law (Art. L. 1245-2 of the French public health code, Law no. 2004-800 of 6 August 2004, Official Journal of 7 August 2004). The donors had no significant medical history.

Experiments involving animals were conducted in accordance with French guidelines (named “Charte nationale portant sur

l'éthique de l'expérimentation animale” by the French ethics committee) and were approved by the regional committee on animal ethics named CEEA.PdL06, with project authorization number 2013.4.

2.2. Cell lines and culture conditions

2.2.1. Osteosarcoma cell lines

MNNG-HOS and Saos-2 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC numbers CRL-1547 and HTB-85 respectively, Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Minimum Essential Medium alpha with nucleosides and 1 g/L D-Glucose (Gibco[®] MEM α ; Life technologies, Saint Aubin, France) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France), at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). For culture under anchorage-independent conditions, medium was supplemented with 1.05% of methylcellulose (R&D Systems, Lille, France) and 2.5% FBS. MNNG-HOS cells were named LucF-HOS cells when they were modified to express the Enhanced Fluorescent Green Protein (EGFP) and firefly luciferase (LucF) genes as previously described [34].

2.2.2. Adipose- or bone marrow-derived stem cells

ADSCs were obtained from human fat samples which were removed using the Coleman's procedure [30,35–37] and MSCs were obtained from human bone marrow aspirates [38]. From human fat or bone marrow samples, adherent cells were obtained and at passage 3, they were characterized. As previously described, [30,39] flow cytometry analysis was performed to detect surface markers (CD105, CD90, CD75, CD45, CD34 and CD3) and their differentiation capacity towards osteogenic, adipogenic, chondrogenic or leiomyocyte lineages was assessed. ADSCs were transduced using EGFP-expressing lentiviral particles [34].

2.2.3. CD14 cells

They were obtained from human peripheral blood mononuclear cells and selected with CD14 Microbeads by MACS technology (Miltenyi Biotec, Paris, France) [40]. To induce pre-osteoclast differentiation, CD14⁺ monocytes were cultured in alpha-MEM containing 10% FBS, 25 ng/mL⁻¹ of human macrophage colony stimulating factor (M-CSF; from R&D Systems) and 100 ng/mL⁻¹ of human RANKL (kindly provided by Amgen Inc, Thousand Oaks, USA) for 7 days.

2.2.4. Conditioned media

ADSCs and MSCs were cultured to near confluence with MEM α medium supplemented with 10% FBS, washed twice and cultured overnight in serum-free medium which was then collected and frozen (–20 °C), constituting ADSC- or MSC-conditioned medium (CM).

2.3. Osteosarcoma model

2.3.1. Tumor induction

Four-week-old female athymic mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France). The mice were anaesthetized by inhalation of an isoflurane-air mix (2% for induction and 0.5% for maintenance, 1 L/min) before any surgical manipulation and by intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mix (16 mg/kg and 66 mg/kg respectively) for bioluminescence measurements. Osteosarcoma development was induced into the tibial anterior muscle, by injection of 2×10^6 MNNG-HOS cells, alone or with ADSCs, MSCs or pre-osteoclasts at indicated ratios. Tumor volume was calculated with the formula $(l^2 \times L)/2$ where l and L represent

the smallest and largest diameter respectively.

2.3.2. Histology analysis

Tumor samples were fixed in 10% buffered formaldehyde and then decalcified in 4% EDTA 0.2% paraformaldehyde (PFA, pH 7.4) buffer for 4 weeks. After embedding in paraffin wax, 5 μm -thick sections were stained with Haematoxylin–Eosin–Safran (HES). Human nucleus detection was performed using a digoxin-labeled human locked nucleic acid *Alu* probe (Exiqon, Vedbaek, Denmark) as described previously [10]. Briefly, 70 nM *Alu* was hybridized on histological sections following DNA denaturation, in a buffer containing 4 X SSC (S6639, Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), 50% deionized formamide, 1 X Denhardt's solution, 5% dextran sulfate and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Salmon sperm DNA, for 19 h at 56 °C. Finally, the *Alu* probe was detected by peroxidase-based immunohisto-chemical procedure. For Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) detection slides were incubated 1 h in a 1 mg ml⁻¹ naphthol AS-TR phosphate, 60 mmol l⁻¹ N,N-dimethylformamide, 100 mmol l⁻¹ sodium tartrate and 1 mg ml⁻¹ Fast Red TR salt solution (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and counterstained with haematoxylin. EGFP detection was observed on frozen sections with fluorescence microscopy directly or after immunostaining using mouse monoclonal to GFP primary antibody (Abcam, Paris, France) and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Life Technologies, Saint-Aubin, France).

2.3.3. Lung metastasis detection

Lungs were systematically observed for macroscopic nodules at necropsy. Macroscopic detection was completed by bioluminescence detection for tumor models induced with luciferase-expressing MNGG-HOS cells. The animals were placed individually in an induction chamber, and anaesthesia was induced with 3% isoflurane in oxygen. Then, mice were intra-peritoneally injected with 3 mg D-Luciferin (Interchim, Montluçon, France) in 250 μl of water, based on 25 g weight. After 7 min, mice were sacrificed for quick extraction of the lungs, which were placed into a photon Imager NightOWL LB 981 (Berthold technologies, Thoiry, France). Bioluminescence acquisition was performed for two 1.5 min. The BLI is expressed as photons per pixel per second after background subtraction.

2.3.4. Micro-computed tomography (μCT)

Mouse tibiae were fixed in 10% buffered formaldehyde and scanned with a high resolution X-ray micro-computed tomography Skyscan 1076 (Skyscan, Kontich, Belgium) using the following parameters: pixel size 18 μm , 50 kV, 0.5 mm Al filter, for 15 min. The 3D reconstruction was analyzed using the NRecon software. Bone parameters following the bone ASBMR nomenclature were quantified using the CTan software (Skyscan) and performed on 2 mm of tibia from the fibula insertion point.

2.4. Cell viability

Three thousand cells per well were seeded into 96-well plates and after the appropriate culture period, WST-1 reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France) was added to each well and incubated for 15 h at 37 °C; absorbance was read at 490 nm. During the culture period, medium was supplemented with fat-CM or ADSC-CM or recombinant human leptin as indicated (R&D Systems) or with an antibody directed against the subunit gp130 of IL-6 family receptor (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; clone BK5 from Diaclone, Besançon, France) as described [41].

2.5. Cell cycle analysis

Subconfluent cells were treated as indicated and labeled with propidium iodide [42]. FITC-coupled mouse anti-human Ki-67 antibody or irrelevant isotype antibody for control (BD Pharmingen, France) was eventually added before DNA staining with propidium iodide. Cell cycle distribution based on 2n or 4n DNA content was analyzed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter, France) and 20,000 events were analyzed with MultiCycle AV Software, Windows version (Phoenix Flow System; San Diego, CA, USA) and CXP Analysis software version 2.2 (Beckman Coulter).

2.6. Multiplex assay

Quantification of soluble factors listed in Fig. 3c was performed using the Luminex technology (Bio-Plex Pro Assays, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Reverse Transcription and Quantitative PCR

RNA was extracted using NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel, Düren, Germany). Reverse transcription (RT) was performed using 2 μg of total RNA and ThermoScript RT (Invitrogen Life Technologies). Then 20 ng of cDNA were amplified using the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) with primers. Gene names and primer sequences are indicated in Table 1. Quantitative analysis was performed with the iCycler iQ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Relative fold change of gene expression was calculated following the delta delta Ct method [43]. The reference genes *ACTB* and *GAPDH* were used for normalization.

2.8. Statistical analysis

GraphPad InStat v3.02 software (La Jolla, CA, USA) was used. *In vivo* experimentation results were analyzed with the unpaired nonparametric method and Dunn's multiple comparisons following the Kruskal–Wallis test. A *p* value of less than 0.05 was

Table 1

List of genes analyzed by real time RT-PCR. Genes are presented with official gene symbols, corresponding full name and other used name. Forward and reverse primer sequences used to perform the analyses are indicated.

Official Symbol	Official full name:Other name	Sense primer Antisense primer
<i>ACTB</i>	Actin beta	CCAACCGGAGAAGATGA CCAGAGCCCTACAGGGATAG
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG GGTGCAGGAGGCATTGCT
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1; Oct4	CAATTTGCCAAGCTCCTGA AGATGTGCTGTTGGCTGAAT
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAA
<i>NANOG</i>	NanogHomeobox	ATGCCTCACACGGAGACTGT AAGTGGGTGTTTGCCTTTG
<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2; CBFA1	GTGCTTAGGCGCATTTC A GCTCTTCTACTGAGAGTGGAAAG
<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	GTACCCGACTTGCACAAC TCGCTCTGTTCAAGAGCTCTC
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	GACCTGAACTTCAAGAGTACAAA TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC
<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4	CCTTTAAAATACTGAGATTTCCTCA GGACACCCCATCTAAGGTT
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogene homolog	CACCAGCAGGACTCTGA GATCCAGACTCTGACCTTTTGC

considered statistically significant.

3. Results

3.1. MSC-like cells increase MNNG-HOS osteosarcoma growth without exacerbation of osteolytic lesions and lung metastases

In order to know whether MSC-like cells can affect human osteosarcoma growth, they were co-injected with MNNG-HOS cells in mice. Adherent cells derived from human bone marrow or adipose tissue displayed similar phenotype, being CD3, CD34 and CD45 negative and CD73, CD90 and CD105 positive (Fig 1a). For meeting the minimal criteria to define mesenchymal stem cells [44], these cells were differentiated into at least three different lineages as previously shown [30,39]. MSCs or ADSCs have induced a similar increase in the growth of MNNG-HOS-induced tumors when they were co-injected in comparison with MNNG-HOS cells alone (Fig. 1b). Furthermore we observed that a higher dose of ADSCs induced a stronger growth of tumors (Fig. 2a). It was shown that osteolysis enhances osteosarcoma growth in some murine models [33,45]. Therefore, human osteoclast precursors, obtained by stimulating CD14 positive cells with MCSF and RANKL were also co-injected with MNNG-HOS cells. In contrast to human MSCs, osteoclast precursors (CD14 positive cells) did not change tumor growth (Fig. 3a). ADSCs, MSCs or CD14-positive cells did not induce any tumor development when injected alone in mice.

As depicted in Fig. 2b, histology analysis showed very similar characteristics with undifferentiated connective tissues in all

groups. When EGFP-expressing ADSCs were co-injected with MNNG-HOS cells in mice, EGFP was detected within the tumor sections at day 10 post-tumor induction (Fig. 2c), but was no longer detected at day 24. Starting with 33% of ADSCs, the MNNG-HOS tumors contained less than 5% of ADSC at day 10 and none at day 24 post-tumor induction. Therefore, the tumor mass grew mostly through the MNNG-HOS cell proliferation and was not due to ADSC proliferation.

Bone morphometry parameters for the tibia in contact to tumors appeared very similar in all groups (Figs. 1c and 2d). In mice that were co-injected with human pre-osteoclasts, *Alu*-sequence-hybridization and TRAP staining were performed on serial sections of mouse tibia bearing osteosarcoma at day 30 post-tumor induction (Fig. 3b). *Alu*-sequence-hybridization signal identified the human tumor cells, but did not co-localize with TRAP-positive osteoclasts, indicating that no functional osteoclast may have derived from human CD14 positive cells. This result correlated with the fact that no increase in osteolysis was observed in MNNG-HOS+CD14 group (data not shown).

Firefly luciferase-expressing MNNG-HOS cells were used to reveal lung metastases by bioluminescence. During the entire animal imaging, strong signals at the primary-tumor injection sites were detected, but signals in lungs were rarely detected (Fig. 3c). Imaging of excised lung lobes detected metastases in all animals, even though only half of the mice were identified with macroscopic lung metastases. Bioluminescence quantification of lung metastases did not show significant differences between the groups injected with tumor cells alone or those with MSCs or osteoclast precursors (Fig. 3c).

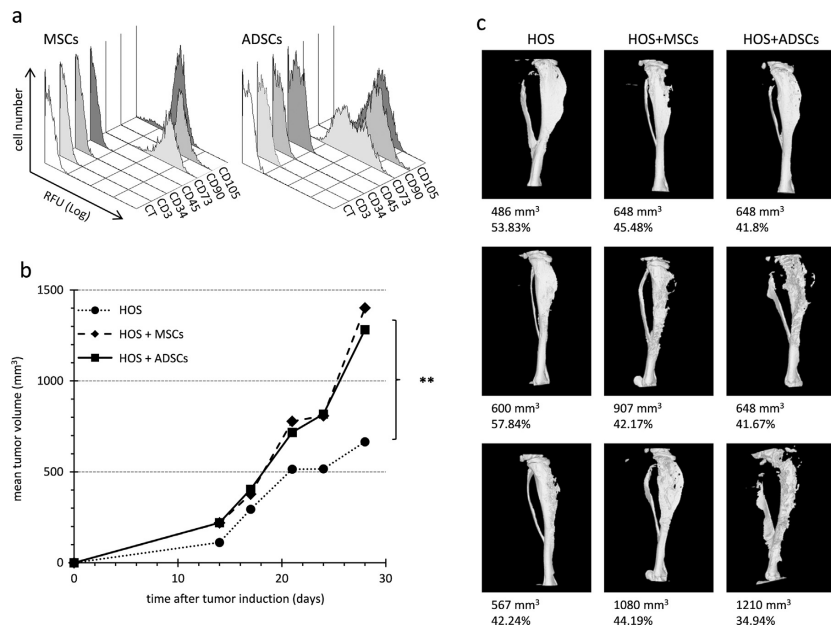


Fig. 1. Co-injection of MNNG-HOS cells with ADSCs and MSCs in athymic mouse. (a) ADSCs and MSCs were characterized by flow cytometry analysis. After the third passage in culture, cells were incubated with fluorescent-coupled antibody directed against the indicated clusters of differentiation (CD) and compared to unlabelled cells (CT). (b) Mean tumor volume evolution is presented for each group of mice ($n=8$). HOS group was induced with 2.10^6 MNNG-HOS cells, while the groups HOS+ADSCs and HOS+MSCs were injected with 2.10^6 MNNG-HOS cells plus 5.10^5 ADSCs or MSCs, respectively. Significant differences are indicated only for HOS groups with other groups at day 30 (**: $p < 0.01$). (c) Microscanner images of tibiae bearing tumors are shown. Tumor volume (mm³) and specific bone volume (%) are indicated.

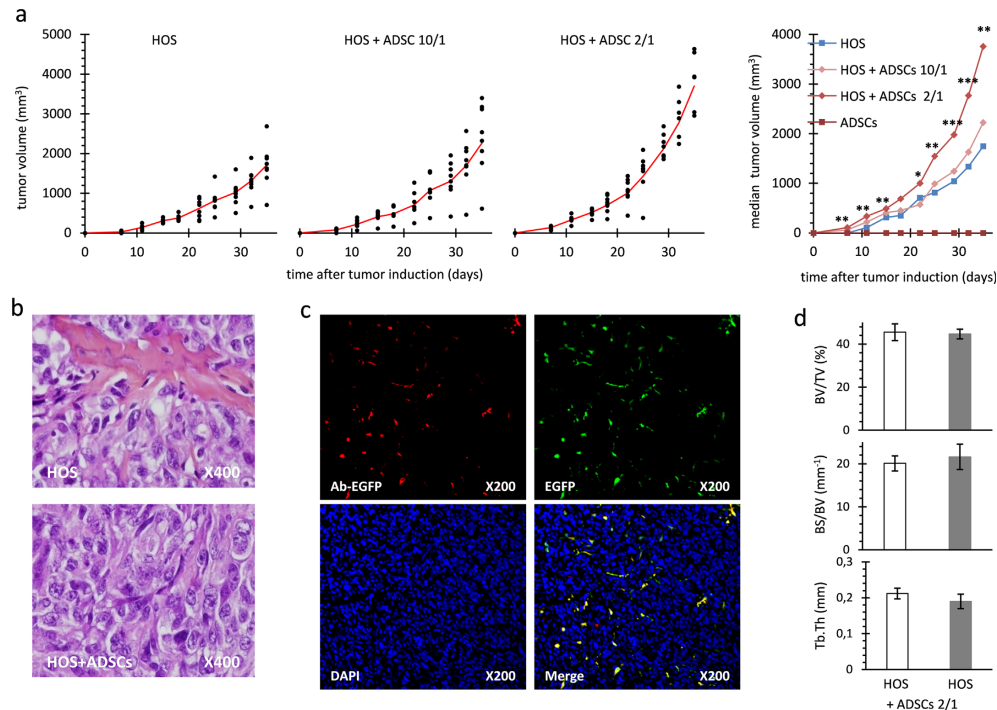


Fig. 2. Co-injection of MNNG-HOS cells with ADSCs at ratio 10/1 or 2/1 in athymic mouse. (a) Tumor progression is reported for three groups of mice ($n=8$) injected with 2 million MNNG-HOS cells either alone, or with 1 million or 0.2 million of ADSCs, named HOS, HOS+ADSCs 10/1, and HOS+ADSCs 2/1 respectively. Individual tumor volumes are represented as dots and mean tumor volumes as red lines. Mean tumor volumes are presented for the three groups injected with MNNG-HOS cells and for the group injected with 1 million ADSCs alone. Significant differences between the MNNG-HOS and the HOS+ADSCs 2/1 groups are indicated (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). (b) Hematoxylin-Eosin-Safran staining on tumor sections revealed undifferentiated sarcomas. (c) EGFP-expressing ADSCs were detected at day 10 post-tumor induction. EGFP was detected either indirectly by immunofluorescence (red, Ab-EGFP) or by direct fluorescence (green, EGFP). Nuclei were stained with DAPI (blue). Images (red, green, blue) were combined using ImageJ software (Merge). Original magnifications are indicated. (d) Tibia remodelling was analyzed when mean tumor volume reached 3000 mm³ in each group, corresponding to day 45 or 35 after tumor induction for HOS and HOS+ADSCs 2/1 groups, respectively. Mean parameters and SD are shown for percent bone volume (BV/TV in %), bone surface/volume ratio (BS/BV) and trabecular thickness (Tb.Th).

In a manner very similar to what was observed with the injection of human adipose tissue, MSCs and ADSCs increased the tumor growth of primary human osteosarcoma, whereas human osteoclast precursors did not. The metastasis process and the massive osteolysis that is always observed on mouse tibia bearing MNNG-HOS-induced tumors were not exacerbated by the co-injection of human MSC-like cells or pre-osteoclasts.

3.2. Paracrine effect of MSC-like cells on proliferative or quiescent osteosarcoma cells

MSC-like cells may support osteosarcoma growth through secreted growth factors and cytokines. Supporting this hypothesis, the addition of 50% ADSC-conditioned medium (CM) without FBS complementation significantly increased the *in vitro* proliferation of two osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS and Saos-2) as measured by trypan blue counting or WST-1 assay (Fig. 4a). MSC-CM also activated the *in vitro* proliferation of osteosarcoma cell lines. As deciphered by cell cycle analysis (Fig. 4b), MSC-CM increased the proportion of MNNG-HOS cells in the G2/M phase similarly to 10% FBS complementation in comparison to 0% FBS. Among 29

cytokines/growth factors measured by multiplex assay (Fig. 4c), we did not identify a paracrine mediator that would be present in both MSC- and ADSC-CM, but that would not be an autocrine mediator secreted by MNNG-HOS and Saos-2 cells. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations were greater in osteosarcoma cell-CM than in medium conditioned by MSCs. Interleukin-8 and -6 (IL-8 and IL-6) concentrations were higher in medium conditioned by ADSCs than in osteosarcoma cell-CM or MSC-CM. Similarly to what was observed using adipose tissue-CM [64], the osteosarcoma cell proliferation induced by ADSC-CM was not prevented by inhibition of IL-6 or IL-8 signaling with neutralizing antibody directed against the gp130 subunit or the chemokine (C-X-C motif) receptor 1/2 respectively (data not shown).

Considering that MSC-like cells are only used following chemotherapy and tumor resection for bone or soft tissue repair, it may be of interest to test their paracrine effect on quiescent osteosarcoma cells rather than on proliferating ones. To this aim, MNNG-HOS cells were cultured without anchorage, inducing the formation of oncospheres (Fig. 5a), as done to isolate cancer stem cells from osteosarcoma biopsies [46] or to induce a cancer stem cell-like phenotype [47]. As expected [48], we observed a

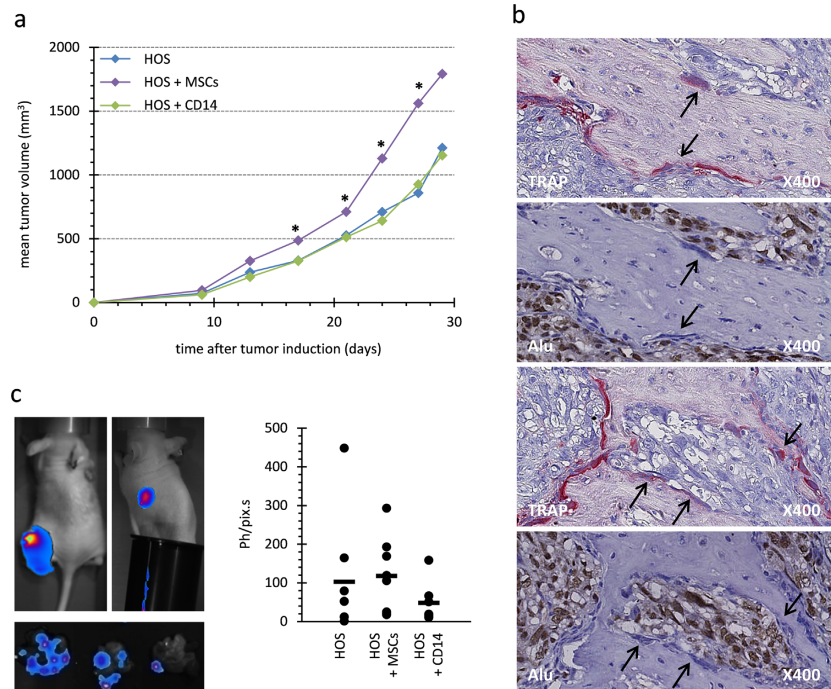


Fig. 3. Co-injection of MNNG-HOS cells with MSCs or pre-osteoclasts in athymic mouse. (a) Evolution of median tumor volumes is reported for each group of mice ($n=6$). The HOS groups were injected with 2.10^6 MNNG-HOS cells, while the groups HOS+MSCs and HOS+CD14 were injected with 2.10^6 MNNG-HOS cells plus 1 million MSCs or RANKL-MCSF-activated CD14 cells, respectively. Significant differences between HOS+MSCs and HOS groups are indicated by single stars for $p < 0.05$. (b) TRAP staining and *Alu*-sequence hybridization were performed on serial sections of tumors obtained 34 days after HOS+CD14 injection. Arrows indicate potential osteoclasts that were TRAP positive (red staining) but negative for *Alu* hybridization (nuclei stained in blue). In contrast numerous *Alu*-positive nuclei corresponding to MNNG-HOS cells were stained in brown. (c) Luciferase-activity was detected at day 34 after cell injections. One representative image of bioluminescence *in vivo* detection is shown for primary-tumor sites (top left panel), for secondary-tumor sites at lungs using a cache for primary sites (top right panel) and for excised lung lobes (low panel). The quantification of *ex vivo* luciferase activity of lung lobes is expressed as photons per pixel per second (Ph/pix s) after subtraction of photon noise. Quantification is showed for each animal (point) and the mean value is showed for each group (bar). No significant differences were observed between groups.

significant enhanced expression of embryonic stem-cell specific transcription factors such as *OCT4* (*POU5F1*; > 300 fold), *SOX2* (> 50 fold) and *NANOG* (> 9 fold) for MNNG-HOS cells cultured in oncospheres compared to those cultured in monolayers (Fig. 5b). A concomitant down-regulation of osteogenic and chondrogenic specific genes (0.33-fold for *RUNX2* and 0.4-fold for *SOX9*) was noted, while expression of adipogenic specific genes were slightly increased (1.7-fold for *PPARG* and 2.4-fold for *FABP4*). Furthermore, MNNG-HOS cells cultured in oncospheres slowed down their proliferation as shown by the decrease of *MYC* expression (Fig. 5b) and by the low proportion of MNNG-HOS cells that were detected in S/G2/M phases (< 15%) (Fig. 5c). Cell cycle analysis combining DNA and Ki-67 staining also revealed a high proportion (30%) of non-dividing cells corresponding to cells in G_0 cell cycle phase in oncospheres. However, FBS complementation enabled part of G_0 cells to enter G_1 phase (2-fold decrease of G_0 cells). In contrast ADSC- or MSC-CM did not decrease the proportion of cells in G_0 . These results indicate that ADSCs and MSCs, through secreted factors, may accelerate the cell cycle of proliferating osteosarcoma cells, but may not change the quiescent state of dormant tumor cells.

4. Discussion

We have previously shown that murine MSC-like cells increased tumor growth when they were co-injected with osteosarcoma cells in mice. In this study, we demonstrate that osteosarcoma growth is also supported by the co-injection of human MSC-like cells, either derived from adipose tissue or bone marrow, but not by osteoclast precursors. In tumors induced by the co-injection of MNNG-HOS cells and ADSCs, ADSCs were not identified at the end of *in vivo* experiments. Soluble factors produced by ADSC increased by up to 2-fold the *in vitro* proliferation of two different osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS and Saos-2). These results indicate that ADSCs/MSCs may modulate the early MNNG-HOS tumor development, at least partially through paracrine effects as described for cancer-associated adipocytes and breast cancer [49] or adipose tissue and osteosarcoma [64]. It has been suggested that MSCs improve angiogenesis after an ischemic lesion [50,51] or facilitate successful fat injection during surgery for breast augmentation or reconstruction [19]. By stimulating neovascularization, MSC-like cells may contribute to sarcoma growth [25,44]. VEGF was identified in ADSC/MSC-conditioned medium but in concentrations similar to MNNG-HOS/Saos-2 cell-conditioned medium. In samples of MNNG-HOS-induced tumors which have otherwise

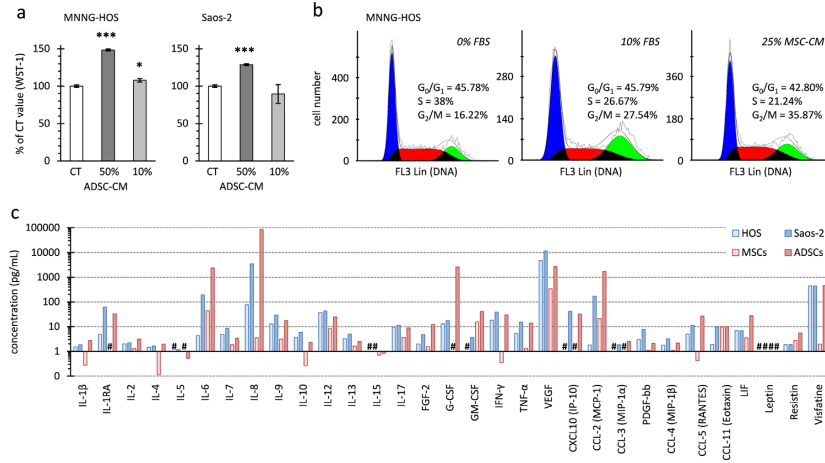


Fig. 4. MSC-like cell secreted factors on proliferation of osteosarcoma cells *in vitro*. (a) Mitochondrial activity of MNNG-HOS or Saos-2 cells was measured after 24 h in medium without FBS (CT) or supplemented with ADSC-conditioned medium representing 10% or 50% of the total volume. Results are the means of 3 wells and are presented as percentage of control (CT) with standard deviations. Significant differences between CT and ADSC-CM are indicated (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$). (b) Cell cycle analysis of MNNG-HOS cells was measured after 24 h in medium not supplemented (0%) or supplemented with FBS (10%) or MSC-CM (25%). The histograms represent cells numbers in cell phases. Because only 3–2% of cells were identified in the sub-G₀ phase, only the proportion of cells in the G₀/G₁, S and G₂/M phases are indicated. (c) Quantification of different cytokines or growth factors using multiplex immunoassay in medium conditioned by MNNG-HOS, Saos-2 cells, ADSCs or MSCs. Interleukins (IL), chemokine ligands (CCL and CXCL), growth factors (fibroblast GF-2, vascular endothelial GF-A, platelet-derived GF-bb, tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, leukemia inhibitory factor) and adipokines (leptin, resistin, visfatin) were measured. #: not detected.

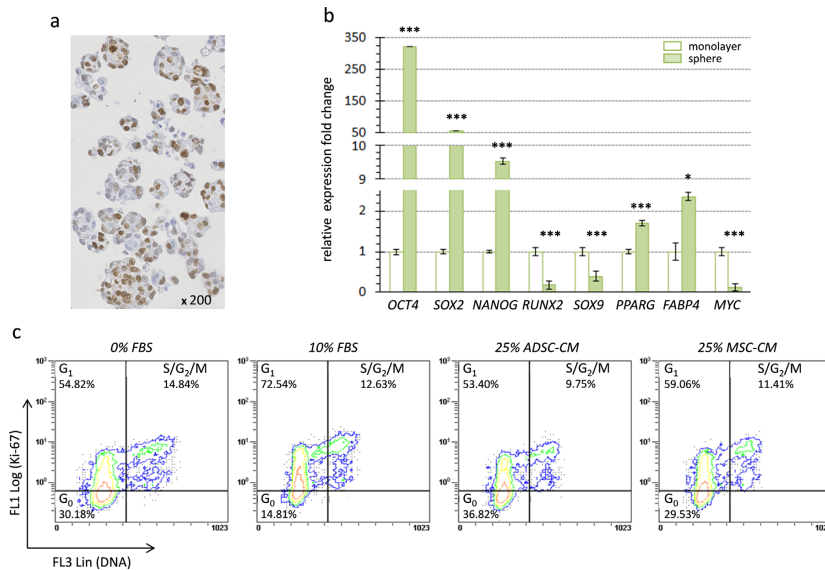


Fig. 5. MSC-like cell secreted factors on quiescent osteosarcoma cells *in vitro*. (a) Representative image of spheres obtained with MNNG-HOS cells cultured under an anchorage-independent condition. Immunohistochemistry detection of Ki-67 revealed a high proportion of proliferating cells (> 50%). (b) Relative expression fold changes are presented for mRNA of MNNG-HOS cells cultured either under anchorage (monolayer) or non-anchorage conditions (spheres). Gene name symbols with corresponding full names are indicated in Table 1. Results are means of 3 samples and are presented with standard deviations. Significant differences between the anchorage and non-anchorage culture conditions are indicated (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$). (c) Dot plots present the % of MNNG-HOS cells in different cell cycle phases following DNA and Ki-67 detection by flow cytometry. MNNG-HOS cells cultured in oncosphere were incubated for 48 h in medium not supplemented (0% FBS) or supplemented with 10% FBS (10%) or 25% ADSC/MSC-CM. Results are representative of 3 independent experiments.

overgrown due to MSC-like cells, we could not observe any change in VEGFA expression nor in tumor neovascularization (data not shown). Bian et al. [27] have reported that human MSCs promoted Saos-2 osteosarcoma growth but through Interleukin 6 (IL-6) secretion. In the present study, IL-6 and IL-8 were indeed detected in the ADSC-conditioned medium. Nonetheless, they were not identified as the molecules that could mediate enhanced proliferation of MMNG-HOS and Saos-2 cells. Similarly, basic fibroblast growth factor (FGF-2) did not enhance the proliferation of osteosarcoma cells *in vitro* (data not shown), despite the fact that a role for FGF-2 in tumor progression was suggested, especially in an original mouse model of osteosarcoma [52]. Other soluble factors that were not investigated in this study included metalloproteinase 11 which can favor tumor progression, collagen VI involved in the breast cancer-adipocyte interaction [53] and lysophosphatic acids implicated in development of bone metastases [54]. All these factors may be implicated, possibly acting in combination, in osteosarcoma cell proliferation.

Preclinical studies have shown that adipocytes and MSCs play an important role in migration and dissemination of cancer cells [55,56]. Concerning osteosarcoma, one publication has reported that human MSCs injected through the caudal vein of mice bearing Saos-2- induced an increase in tumor volume associated with more severe osteolytic lesions and a higher rate of pulmonary metastasis [29]. A similar pro-metastatic effect was observed with rat MSCs injected intravenously in rats bearing osteosarcoma [28,57], while co-implantation of rat MSCs and osteosarcoma cells did not promote lung metastasis [28]. In the present study, we did not observe an aggravation of osteolytic lesions and lung metastases despite tumor growth increase following co-injection of ADSCs/MSCs with MNNG-HOS cells in mice. Because the metastasis process was not changed by ADSCs/MSCs injection *in vivo*, ADSC-derived soluble factors were not tested in *in vitro* migration assays of osteosarcoma cells.

Growth of osteosarcoma is supported by the bones micro-environment including the activity of osteoclasts. The role of osteoclasts was demonstrated in osteosarcoma models through osteolysis blockage which enhanced tumor regression or allowed tumor growth inhibition [33,58]. However, Endo-Munoz et al. [31] have reported that the loss of osteoclasts in the early development of osteosarcoma is associated with increased potential for osteosarcoma cells to metastasize. Surprisingly in the present study, the osteosarcoma development including local growth, lung metastasis and osteolysis, were not changed by the early co-injection of pre-osteoclasts (MCSF and RANKL-stimulated CD14 positive cells) with MNNG-HOS cells in mice. This experiment did not confirm that osteoclasts could activate osteosarcoma growth or prevent the metastasis process while no mature human osteoclasts could be detected *in vivo* following co-injection.

MSC appear to have a dual nature, regarding their ability to promote tumor growth and metastasis or to suppress tumor progression [26]. The reasons for the discrepant actions of MSCs on tumor growth are under investigation but potentially may be attributed to differences in tumor models, the dose or timing of MSC injections, the animal host, or the inflammatory status of MSCs [59]. In view of the enhancing effect of ADSCs/MSCs on the proliferation of osteosarcoma cells both *in vivo* and *in vitro*, MSCs may not be good candidates for osteosarcoma-targeted cell therapy.

Nonetheless, the models of MSC injection in rodents bearing fast-growing tumors are unlikely useful for clinical application in reconstructive surgery following chemotherapy and/or tumor resection. Aanstoos et al. [60] have recently tested MSC injection after amputation in mice bearing osteosarcoma and showed that MSC injection at the surgical site did not promote pulmonary metastasis or local recurrence compared to no-MS injection; however MSC intravenous injection induced a faster development of pulmonary metastasis. More than 20 years ago, Hernigou et al.

supplemented bone allografts with autologous bone marrow from the iliac crest and then started to use nucleated cells concentrated from bone marrow aspirate. Following implantation of autologous concentrated bone marrow cells including MSCs into 1873 patients without malignancy, there was no excess of neoplastic events over the expected number in a normal population [61]. Similarly, no increased risk of neoplasia was reported in a cohort of more than 200 patients treated with MSCs for different regenerative medicine applications [62]. Furthermore, Hernigou et al. reported that the autologous concentrated bone marrow cell adjuvant therapy in 92 patients treated after bone tumor resection did not increase the risk of local tumor recurrence compared to control populations [63].

In the present study, the effect of ADSC-secreted factors were tested on dormant cancer cells that could be present following therapy. For this purpose, osteosarcoma cells were cultured in oncospheres to induce a cancer stem cell-like phenotype [47]. We observed that conditioned medium of ADSCs did not change the quiescent state of dormant osteosarcoma cells when they were cultured in oncospheres, while such medium accelerated the cell cycle of proliferating osteosarcoma cells. This result indicates that ADSC-secreted factors may not be involved in the local recurrence by activation of cancer stem cells. This result combined with those obtained with adipose tissue-secreted factors [64] is reassuring for the complementation of adipose tissue transfer with ADSCs in plastic reconstructive surgery, but further investigation using preclinical models which mimic quiescent state of osteosarcoma are still needed to warrant safe clinical use of ADSCs following osteosarcoma resection.

Grant support

This work was supported by INSERM, the "Ligue Contre le Cancer" (Equipe Labellisée LIGUE 2012; grant EL2012NCC/DH), the "Fédération Nationale Enfants et Santé" and the "Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent" ("appel à projet 2013").

Acknowledgments

The authors wish to thank Guylène Hamery and Yohann Allain from the Experimental Therapy Unit platform of the Faculty of Medicine (Nantes, France) for their technical assistance. We thank Céline Charrier, Séverine Battaglia, Régis Brion, Jérôme Amiaud (all from INSERM UMR957, Nantes, France) for their kind technical assistances.

References

- [1] N. Marina, M. Gebhardt, L. Teot, R. Gorlick, Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma, *Oncologist*, 9 (2004) 422–441.
- [2] P. Picci, Osteosarcoma (osteogenic sarcoma), *Orphanet J. Rare Dis.* 2 (2007) 6.
- [3] A. Luetke, P.A. Meyers, I. Lewis, H. Juergens, Osteosarcoma treatment—where do we stand? A state of the art review, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 523–532.
- [4] D. Donati, M. Colangeli, S. Colangeli, C. Di Bella, M. Mercuri, Allograft-prosthetic composite in the proximal tibia after bone tumor resection, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466 (2008) 459–465.
- [5] P. Hernigou, G. Delepine, D. Goutallier, A. Julieron, Massive allografts sterilised by irradiation. Clinical results, *J. Bone Jt. Surg. Br.* 75 (1993) 904–913.
- [6] M.P. Bus, P.D. Dijkstra, M.A. van de Sande, A.H. Taminiu, H.W. Schreuder, P. C. Jutte, et al., Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study, *J. Bone Jt. Surg. Am.* 96 (2014) e26.
- [7] P.H. Hilven, L. Bayliss, T. Cosker, P.D. Dijkstra, P.C. Jutte, L.U. Lahoda, et al., The vascularised fibular graft for limb salvage after bone tumour surgery: a multicentre study, *Bone Jt. J.* 97 (2015) 853–861.


- [8] M.N. Zimel, A.M. Cizik, T.B. Rapp, J.S. Weisstein, E.U. Conrad 3rd, Mega-prosthesis versus Condyle-sparing intercalary allograft: distal femoral sarcoma, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467 (2009) 2813–2824.
- [9] S.S. Bielack, B. Kempf-Bielack, G. Delling, G.U. Exner, S. Flege, K. Helmke, et al., Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 776–790.
- [10] M.A. Brennan, A. Renaud, J. Amiaud, M.T. Rojewski, H. Schrezenmeier, D. Heymann, et al., Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate, *Stem Cell. Res. Ther.* 5 (2014) 114.
- [11] S. Ferrari, G. Bacci, P. Picci, M. Mercuri, A. Briccoli, D. Pinto, et al., Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy, *Ann. Oncol.* 8 (1997) 765–771.
- [12] A.L. Gambelin, M.A. Brennan, A. Renaud, H. Yagita, F. Lezot, D. Heymann, et al., Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages, *Biomaterials* 35 (2014) 9660–9667.
- [13] P.A. Meyers, G. Heller, J. Healey, A. Huvos, J. Lane, R. Marcove, et al., Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience, *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 5–15.
- [14] G. Grisendi, C. Spano, N. D'Souza, V. Rasini, E. Veronesi, M. Prapa, et al., Mesenchymal progenitors expressing TRAIL induce apoptosis in sarcomas, *Stem Cells* 33 (2015) 859–869.
- [15] A. Mohr, M. Iyama, L. Desligan, T. Harte, G. Shaw, L. Howard, et al., Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model, *J. Cell. Mol. Med.* 12 (2008) 2628–2643.
- [16] G. Grisendi, R. Bussolari, E. Veronesi, S. Piccinno, J.S. Burns, G. De Santis, et al., Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers, *Am. J. Cancer Res.* 1 (2011) 787–805.
- [17] P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol. Biol. Cell.* 13 (2002) 4279–4295.
- [18] F. Lu, J. Li, J. Gao, R. Ogawa, C. Ou, B. Yang, et al., Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells, *Plast. Reconstr. Surg.* 124 (2009) 1437–1446.
- [19] K. Yoshimura, K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi, K. Harii, Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells, *Aesthetic Plast. Surg.* 32 (2008) 48–55.
- [20] A. Sterodimas, J. de Faria, B. Nicaretta, F. Boriani, Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study, *Aesthetic Surg. J.* 31 (2011) 682–693.
- [21] R. Perez-Cano, J.J. Vranckx, J.M. Lasso, C. Calabrese, B. Merck, A.M. Milstein, et al., Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial, *Eur. J. Surg. Oncol.* 38 (2012) 382–389.
- [22] S.F. Trojahn Kolle, R.S. Oliveri, P.V. Glovinski, J.J. Elberg, A. Fischer-Nielsen, K. T. Drzewiecki, Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies, *J. Plast. Surg. Hand Surg.* 46 (2012) 59–68.
- [23] Z. Yingbo, Y. Daping, Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention, *Ann. Plast. Surg.* 68 (2012) 111.
- [24] W.K. Hsu, J.C. Wang, N.Q. Liu, L. Krenek, P.A. Zuk, M.H. Hedrick, et al., Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model, *J. Bone Jt. Surg. Am.* 90 (2008) 1043–1052.
- [25] J.S. Burns, A. Safwat, G. Grisendi, M. Kassem, M. Dominici, Sarcomas as a mine en abyme of mesenchymal stem cells: exploiting interrelationships for cell mediated anticancer therapy, *Cancer Lett.* 325 (2012) 1–10.
- [26] A.H. Klopp, A. Gupta, E. Spaeth, M. Andreeff, F. Marini 3rd, Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29 (2011) 11–19.
- [27] Z.Y. Bian, Q.M. Fan, G. Li, W.T. Xu, T.T. Tang, Human mesenchymal stem cells promote growth of osteosarcoma: involvement of interleukin-6 in the interaction between human mesenchymal stem cells and Saos-2, *Cancer Sci.* 101 (2010) 2554–2560.
- [28] S. Tsukamoto, K. Honoki, H. Fujii, Y. Tohma, A. Kido, T. Mori, et al., Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model, *Int. J. Oncol.* 40 (2012) 163–169.
- [29] W.T. Xu, Z.Y. Bian, Q.M. Fan, G. Li, T.T. Tang, Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis, *Cancer Lett.* 281 (2009) 32–41.
- [30] P. Perrot, J. Rousseau, A.L. Bouffaut, F. Redini, E. Cassagnau, F. Deschaseaux, et al., Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence, *PLoS One* 5 (2010) e10999.
- [31] L. Endo-Munoz, A. Cumming, D. Rickwood, D. Wilson, C. Cueva, C. Ng, et al., Loss of osteoclasts contributes to development of osteosarcoma pulmonary metastases, *Cancer Res.* 70 (2010) 7063–7072.
- [32] L. Endo-Munoz, A. Evdokiou, N.A. Saunders, The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis, *Biochim. Biophys. Acta.* 2012 (1826) 434–442.
- [33] D. Heymann, B. Ory, F. Blanchard, M.F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, et al., Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma, *Bone* 37 (2005) 74–86.
- [34] J. Rousseau, V. Escriou, P. Perrot, G. Picarda, C. Charrier, D. Scherman, et al., Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models, *Cancer Gene Ther.* 17 (2010) 387–397.
- [35] S.R. Coleman, Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations, *Aesthetic Plast. Surg.* 19 (1995) 421–425.
- [36] P. Covarrubias, L. Cardenas-Camarena, J. Guerrero Santos, L. Valenzuela, I. Espejo, J.A. Robles, et al., Evaluation of the histologic changes in the fat-grafted facial skin: clinical trial, *Aesthetic Plast. Surg.* 37 (2013) 778–783.
- [37] E. Delay, S. Garson, G. Tousson, R. Sinna, Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years, *Aesthetic Surg. J.* 29 (2009) 360–376.
- [38] T. Cordonnier, A. Langonne, J. Sohier, P. Layrolle, P. Rosset, L. Sensebe, et al., Consistent osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum, *Tissue Eng. Part C. Methods* 17 (2011) 249–259.
- [39] M.A. Brennan, A. Renaud, A.L. Gambelin, C. D'Arros, S. Nedellec, V. Trichet, et al., 3D cell culture and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells plated onto jet-sprayed or electrospun micro-fiber scaffolds, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 045019.
- [40] L. Duplomb, M. Baud'huin, C. Charrier, M. Berreur, V. Trichet, F. Blanchard, et al., Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3, *Endocrinology* 149 (2008) 3688–3697.
- [41] S.P. Gibbs, Y.G. Kulekova, J.D. Reith, O. Tchigrinova, O.N. Suslov, E.W. Scott, et al., Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis, *Neoplasia* 7 (2005) 967–976.
- [42] H. Wilson, M. Huelsmeyer, R. Chun, K.M. Young, K. Friedrichs, D.J. Argyle, Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma, *Vet. J.* 175 (2008) 69–75.
- [43] P.P. Levings, S.V. McGarry, T.P. Currie, D.M. Nickerson, S. McClellan, S. C. Ghivizzani, et al., Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma, *Cancer Res.* 69 (2009) 5648–5655.
- [44] L. Bochet, C. Lehuède, S. Dauvillier, Y.Y. Wang, B. Dirat, V. Laurent, et al., Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer, *Cancer Res.* 73 (2013) 5657–5668.
- [45] A. Carriere, T.G. Ebrahimi, S. Dehez, N. Auge, C. Joffre, M. Andre, et al., Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1093–1099.
- [46] J. Rehman, D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C.J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, et al., Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells, *Circulation* 109 (2004) 1292–1298.
- [47] T. Shimizu, T. Ishikawa, S. Iwai, A. Ueki, E. Sugihara, N. Onishi, et al., Fibroblast growth factor-2 is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma, *Mol. Cancer Res.* 10 (2012) 454–468.
- [48] E.R. Mottrescu, S. Blaise, N. Etique, N. Messaddeq, M.P. Chenard, I. Stoll, et al., Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions, *Oncogene* 27 (2008) 6347–6355.
- [49] M. David, E. Wannecq, F. Descotes, S. Jansen, B. Deux, J. Ribeiro, et al., Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts, *PLoS One* 5 (2010) e9741.
- [50] B. Dirat, L. Bochet, M. Dabek, D. Daviaud, S. Dauvillier, B. Majed, et al., Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion, *Cancer Res.* 71 (2011) 2455–2465.
- [51] K.V. Nguyen-Ngoc, K.J. Cheung, A. Brenot, E.R. Shamir, R.S. Gray, W.C. Hines, et al., ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012) E2595–E2604.
- [52] P. Zhang, L. Dong, K. Yan, H. Long, T.T. Yang, M.Q. Dong, et al., CXCR4-mediated osteosarcoma growth and pulmonary metastasis is promoted by

- mesenchymal stem cells through VEGF. *Oncol. Rep.* 30 (2013) 1753–1761.
- [58] F. Lamoureux, P. Richard, Y. Wittrant, S. Battaglia, P. Pilet, V. Trichet, 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 (2007) 7308–7318.
- [59] R.S. Waterman, S.L. Henkle, A.M. Betancourt, Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One* 7 (2012) e45590.
- [60] M.E. Aanstoos, D.P. Regan, R.J. Rose, L.S. Chubb, N.P. Ehrhart, Do Mesenchymal Stromal Cells Influence Microscopic Residual or Metastatic Osteosarcoma in a Murine Model? *Clin. Orthop. Relat. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-015-4362-2>.
- [61] P. Hernigou, Y. Homma, C.H. Flouzat-Lachaniette, A. Poignard, N. Chevallier, H. Rouard, Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 95 (2013) 2215–2221.
- [62] C.J. Centeno, J.R. Schultz, M. Cheever, M. Freeman, S. Faulkner, B. Robinson, et al., Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* 6 (2011) 368–378.
- [63] P. Hernigou, C.H. Flouzat Lachaniette, J. Delambre, N. Chevallier, H. Rouard, Regenerative therapy with mesenchymal stem cells at the site of malignant primary bone tumour resection: what are the risks of early or late local recurrence? *Int. Orthop.* 38 (2014) 1825–1835.
- [64] P. Avril, F. Duteille, P. Ridel, M.F. Heymann, G. De Pinieux, F. Gouin, F. Rédini, F. Blanchard, D. Heymann, V. Trichet, P. Perrot, Opposite effects of soluble factors secreted by adipose tissue on proliferating and quiescent osteosarcoma cells. *Plast. Reconstr. Surg.* (2015) (in press).

ANNEXE 4

Liste des 482 gènes de la région 17q concernés par la trisomie des CDOS DIA :

MGC57346, C17orf69, CRHR1, LOC100128977, IMP5, MAPT, LOC100130148, STH, KIAA1267, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, LRRC37A2, ARL17A, NSF, WNT3, WNT9B, GOSR2, RPRML, CDC27, MYL4, ITGB3, C17orf57, LOC100272146, NPEPPS, KPNB1, TBKBP1, TBX21, OSBPL7, MRPL10, LRRC46, SCRIN2, SP6, SP2, PNPO, PRR15L, CDK5RAP3, COPZ2, MIR152, NFE2L1, CBX1, SNX11, SKAP1, MIR1203, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB4, MIR10A, LOC404266, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB9, MIR196A1, PRAC, C17orf93, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2, ATP5G1, UBE2Z, SNF8, GIP, IGF2BP1, B4GALNT2, GNGT2, ABI3, PHOSPHO1, ZNF652, PHB, NGFR, NXPH3, SPOP, SLC35B1, FAM117A, MYST2, TAC4, DLX4, DLX3, ITGA3, PDK2, SAMD14, PPP1R9B, SGCA, HILS1, **COL1A1**, TMEM92, XYLT2, MRPL27, EME1, LRRC59, ACSF2, CHAD, RSAD1, MYCBPAP, EPN3, SPATA20, CACNA1G, ABCC3, ANKRD40, LUC7L3, C17orf73, WFIKKN2, TOB1, SPAG9, NME1-NME2, NME1, NME2, MBTD1, UTP18, CA10, KIF2B, TOM1L1, COX11, STXBP4, HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1, NOG, C17orf67, DGKE, MTRV2, TRIM25, COIL, SCPEP1, RNF126P1, AKAP1, MSI2, MRPS23, CUEDC1, VEZF1, SFRS1, DYNLL2, OR4D1, MSX2P1, OR4D2, EPX, MKS1, LPO, MPO, BZRAP1, MIR142, SUPT4H1, RNF43, HSF5, MTMR4, SEPT4, C17orf47, TEX14, RAD51C, PPM1E, TRIM37, SKA2, MIR454, MIR301A, PRR11, C17orf71, GDPD1, YPEL2, DHX40, CLTC, PTRH2, TMEM49, MIR21, TUBD1, RPS6KB1, RNFT1, DHX40P, HEATR6, LOC645638, LOC653653, CA4, USP32, SCARNA20, C17orf64, APPBP2, PPM1D, BCAS3, TBX2, C17orf82, TBX4, NACA2, BRIP1, INTS2, MED13, TBC1D3P2, EFCAB3, METTL2A, TLK2, MRC2, MARCH10, TANC2, CYB561, ACE, KCNH6, DCAF7, TACO1, MAP3K3, LIMD2, STRADA, CCDC47, DDX42, FTSJ3, PSMC5, SMARCD2, TCAM1, CSH2, GH2, CSH1, CSHL1, GH1, CD79B, SCN4A, C17orf72, ICAM2, ERN1, SNORD104, SNORA76, TEX2, PECAM1, C17orf60, POLG2, DDX5, CCDC45, SMURF2, LOC146880, PLEKHM1P, LRRC37A3, FLJ32065, GNA13, RGS9, AXIN2, CCDC46, APOH, PRKCA, MIR634, CACNG5, CACNG4, CACNG1, HELZ, PSMD12, PITPNC1, NOL11, SNORA38B, BPTF, C17orf58, KPNA2, LOC651250, LOC440461, AMZ2, ARSG, SLC16A6, WIP1, MIR635, PRKAR1A, FAM20A, **ABCA8**, **ABCA9**, **ABCA6**, **ABCA10**, **ABCA5**, MAP2K6, KCNJ16, KCNJ2, **SOX9**, SLC39A11, SSTR2, COG1, FAM104A, C17orf80, CPSF4L, CDC42EP4, SDK2, C17orf54, RPL38, MGC16275, TTYH2, DNAI2, KIF19, BTBD17, GPR142, GPRC5C, CD300A, CD300LB, CD300C, CD300LD, C17orf77, CD300E, RAB37, CD300LF, SLC9A3R1, NAT9, TMEM104, GRIN2C, FDXR, FADS6, USH1G, OTOP2, OTOP3, C17orf28, CDR2L, ICT1, ATP5H, KCTD2, SLC16A5, ARMC7, NT5C, HN1, SUMO2, NUP85, GGA3, MRPS7, MIF4GD, SLC25A19, GRB2, KIAA0195, CASKIN2, TSEN54, LLGL2, MYO15B, **RECQL5**, LOC643008, LOC100130933, SAP30BP, ITGB4, GALK1, H3F3B, UNK, UNC13D, WBP2, TRIM47, TRIM65, MRPL38, FBF1, ACOX1, C17orf106, CDK3, EVPL, SRP68, GALR2, ZACN, EXOC7, FOXJ1, RNF157, FAM100B, QRICH2, PRPSAP1, SPHK1, UBE2O, AANAT, RHBDF2, CYGB, PRCD, SNORD1C, SNORD1B, SNORD1A, ST6GALNAC2, ST6GALNAC1, MXRA7, JMJD6, C17orf95, SFRS2, MIR636, MFSD11, MGAT5B, C17orf86, SCARNA16, SEC14L1, SEPT9, FLJ45079, TNRC6C, TMC6, TMC8, C17orf99, SYNGR2, TK1, AFMID, BIRC5, EPR1, LOC283999, SOCS3, PGS1, DNAH17, CYTH1, USP36, TIMP2, LGALS3BP, CANT1, C1QTNF1, ENGASE, HRNBP3, ENPP7, CBX2, CBX8, CBX4, TBC1D16, CCDC40, GAA, EIF4A3, CARD14, SGSH, SLC26A11, RNF213, LOC100294362, FLJ35220,



NPTX1, RPTOR, CHMP6, FLJ90757, BAIAP2, AATK, MIR657, MIR338, MIR1250, LOC388428, AZI1, C17orf56, C17orf89, SLC38A10, C17orf55, TMEM105, BAHCC1, ACTG1, FSCN2, C17orf70, NPLOC4, TSPAN10, PDE6G, C17orf90, CCDC137, ARL16, HGS, MRPL12, SLC25A10, GCGR, FAM195B, DYSFIP1, P4HB, ARHGDI, THOC4, ANAPC11, NPB, PCYT2, SIRT7, MAFG, LOC92659, PYCR1, MYADML2, NOTUM, ASPSCR1, STRA13, LRRC45, RAC3, DCXR, RFNG, GPS1, DUS1L, FASN, CCDC57, SLC16A3, CSNK1D, CD7, SECTM1, TEX19, UTS2R, C17orf101, HEXDC, C17orf62, NARF, FOXK2, WDR45L, RAB40B, FN3KRP, FN3K, TBCD, ZNF750, B3GNTL1, METRNL)



Thèse de Doctorat

Louis-Romée LE NAIL

Caractérisation de cellules dérivées d'ostéosarcomes humains.

Characterization of human osteosarcoma derived cells.

Résumé

L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont suspectées d'être à l'origine de l'OS. Nous avons émis l'hypothèse que des CSM avec des caractéristiques de cellules souches cancéreuses (CSC) pouvaient être impliquées dans le développement de l'OS, la résistance à la chimiothérapie et l'évolution métastatique.

Nous avons isolé et cultivé des cellules dérivées d'OS (CDOS) à partir de fragments tumoraux et nous les avons comparées aux propres CSM de moelle osseuse (CSMMO) de 6 malades.

Les CDOS avaient la même morphologie et le même profil d'expression de récepteurs membranaires que les CSMMO. Elles présentaient des capacités de différenciation ostéoblastique plus importantes que les CSMMO. Le caryotype était normal dans les 6 populations de CSMMO et dans 4 populations de CDOS. Les CDOS présentaient des caractéristiques de CSC, avec la formation de sphères en milieu semi solide, la diminution du métabolisme mitochondrial en normoxie. Deux populations de CDOS présentaient des anomalies caryotypiques minimes. Il n'y avait pas de formation de tumeur chez la souris immunodéprimée (SCID). Dans les modèles de coinjection chez la souris Nude, 4 populations de CDOS soutenaient la croissance tumorale de la lignée d'OS (MNNG-HOS).

Les CDOS isolées n'étaient vraisemblablement pas tumorales. Elles se présentaient plus comme des cellules du microenvironnement, suspectées de soutenir et moduler la croissance tumorale. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour identifier quels sont les facteurs stromaux influençant la croissance de l'OS.

Mots clés :

Ostéosarcome, Cellules souches cancéreuses, Cellules souches mésenchymateuses, Microenvironnement

Abstract

Osteosarcoma (OS) is the most frequent primitive malignant bone tumor. We hypothesised that some MSC with cancer stem cell (CSC) characteristics may be involved in OS development, chemotherapy resistance and metastatic progression.

Adherent cells from six human OS samples were isolated after tumor dissociation and culture. They were named OS derived cells (OSDC) and were compared to own patient bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC). We tested MSC characteristics, CSC characteristics, and tumor growth support capacities in an induced human OS mouse model.

OSDC had the same morphologic aspect and membrane expression profile as BMMSC. They kept differentiation capacities toward osteoblastic lineage and to less extend toward adipogenic and chondrogenic lineage, with variability between different OSDC populations. Karyotype was normal for all 6 BMMSC and for 4 OSDC. OSDC showed CSC characteristics, with sphere formations in semi solid conditions, decrease of mitochondrial metabolism in normoxia condition. Some minimal karyotype abnormalities were found in 2 OSDC populations. However, no tumor formation was induced in immunocompromised mice (SCID). In coinjection mouse model, 4 out of 6 OSDC increased tumor growth compared to osteosarcoma cells (MNNG-HOS) alone.

OSDC that were isolated from human OS samples did not demonstrate own tumor properties. They are highly suspected to be part of tumor microenvironment, rather than the tumor origin, and to support and modulate the tumor growth. More studies are necessary to identify which CDOS factors influence tumor growth suggesting new stromal targets for combined therapy.

Key Words :

Osteosarcoma, Cancer stem cells, Mesenchymal stem cells, Microenvironment