

Thèse de Doctorat

Pierre AVRIL

Mémoire présenté en vue de l'obtention du **grade de Docteur de l'Université de Nantes** sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : **Biologie-Santé**

Discipline : **Biologie cellulaire**

Spécialité : **Cancérologie**

Unité de recherche :

Laboratoire de Physiopathologie
de la Résorption Osseuse et
Thérapie des Tumeurs Osseuses
Primitives – INSERM UMR957

Soutenue le 19 novembre 2015

Thèse N° :

IMPACT DU TRANSFERT DE TISSU ADIPEUX ET DE CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES SUR LE RISQUE CARCINOLOGIQUE

JURY

Rapporteurs :

Dominique MODROWSKI, Chargée de Recherche, Université de Paris 7 - Bioscar - INSERM UMR1132

Ali MOJALLAL, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Lyon

Examineurs :

Pierre HARDOUIN, Professeur des Universités, Université du Littoral Côte d'Opale - PMOI- EA 4490

Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE, Directeur de Recherche, Université de Toulouse 3 - I2MC - INSERM U1048

Directeurs de Thèse :

Valérie TRICHET, Maître de Conférences des Universités, Université de Nantes – LPRO – INSERM UMR957

Pierre PERROT, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes - LPRO - INSERM UMR957

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier
de la **Société Française de lutte contre
les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent**



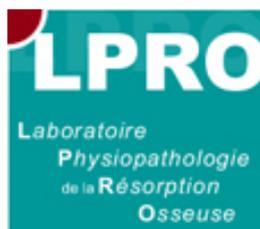
au sein du

**Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse
et thérapie des tumeurs osseuses primitives**

INSERM UMR957

Faculté de Médecine - 1 rue Gaston Veil

44035 NANTES Cedex 1



Remerciements

Les remerciements dans une thèse, c'est comme la cravate à l'Élysée : même de travers, ça fait partie du protocole. Et le protocole, c'est une notion à laquelle nous, les scientifiques en herbe de tous poils, sommes sensibilisés très tôt, dès les premiers plateaux techniques. Néanmoins, les remerciements qui vont suivre seront courts, non pas par manque de sincérité et de chaleur, mais parce-que l'expression écrite n'a jamais été franchement mon fort (svp, ne pas tenir compte de cette phrase en lisant les deux cents et quelques pages qui suivent)...

Tout d'abord, je tiens à remercier **Valérie TRICHET**, pour tout. Pour m'avoir accueilli/recueilli en stage de master 1. Pour y avoir cru, et parfois pour avoir été la seule à y croire. Pour son amour des causes perdues. Pour sa patience, sa pédagogie, son accessibilité, sa franchise et son pragmatisme. Pour son ouverture à mes goûts musicaux parfois discutables, aussi. Merci. Un jour peut-être parviendrai-je à dire « tu ». Attention cependant, cette partie risque de comporter des phrases de plus de quatre lignes !

Merci à **Pierre PERROT**, initiateur et fournisseur de ce projet tant en des idées, infos et suggestions, qu'en matières premières (je parle ici, bien entendu de matières grasses). Merci pour cette bienveillance permanente et cette disponibilité, même au bout du monde !

Suivre l'évolution de cette thèse n'aura pas été une mince affaire, merci donc à **Isabelle CORRE** et **Gonzague De PINIEUX** d'avoir été mes membres de Comité de Suivi de Thèse.

Merci à **Dominique MODROWSKI** et **Ali MOJALLAL** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux de thèse. Et merci à **Pierre HARDOUIN** et **Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE** d'en être les deux membres examinateurs. À vous quatre, merci par avance pour les discussions constructives que j'espère pouvoir alimenter dignement lors de ma soutenance.

Merci également à **Sophie BARILLE** d'avoir rendu possible toute la troisième partie de ces travaux, de nous avoir aidés à en poser les jalons ainsi que pour sa disponibilité.

Merci enfin à **Cédric Le CAIGNEC**, **Olivier PICHON** et **Gaëlle THIERRY** ainsi qu'à **Mazène HOCHANE** pour m'avoir ouvert d'autres horizons lors cette période de thèse.

Merci à tous les membres du Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives, qu'ils y officient encore (voire pour longtemps) ou qu'ils nous aient depuis quittés pour d'autres vents, non sans avoir marqué de leur empreinte notre quotidien.

Tout d'abord, merci à **Dominique HEYMANN** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Merci à la section personnel technique : **Céline, Séverine, Rachel, Jérôme**. Sans vous le labo serait comme un bon repas sans fromage, une tête qui n'a qu'un œil... bref, il manquerait l'essentiel ! Merci à **Audrey R, Martine, Julie C, Éric M** et **Soizic**, véritable mère de substitution en matière de Western Blot.

Julien... Merci d'avoir assumé pleinement ton rôle, c'était pas de la tarte, même aux myrtilles ! Merci pour tous ces souvenirs, qu'ils soient parisiens (Olympiens, même, on ira pisser ensemble la prochaine fois), mayennais (tu m'as quand-même fait jouer dans une église), malouins (la prochaine rencontre au sommet se jouera à domicile), ou bellilois (en 4L ou avec une bière, un ampli et des pommes de terre) et j'en passe (ça serait pas arrivé dans un Touran). Merci pour tous ceux à venir... Au fait, H - combien, déjà ?

Merci à nos ingénieurs, piliers du pragmatisme expérimental : **Bénédicte, Catherine, Gwénola** et nos trois larrons aux savoirs et humours complémentaires, parmi lesquels **Mathias**, bourreau des cœurs à la répartie cinglante et parois (seulement parfois ?) douteuse.

Kévin, véritable homme d'intérieur (un jour, tu auras tes boutures) comme d'extérieur (rdv au Briord très vite), presque aussi râleur que moi, quoique tes coups de gueule aient plus de portée. Parce qu'il faut bien un troisième aux mots fléchés (tenace cependant car tu n'abandonnes jamais), merci pour les jeux, le bad' avorté, aux jeux de mots que je n'oserais pas, inavouables et perpétuels, pour ton sens de l'initiative (tu as réussi à dépoussiérer la Game Boy d'une partie d'entre nous) et j'en passe.

Régis, pierre angulaire du labo, tant sur la capacité d'accueil des nouveaux dans son bureau que sur sa capacité d'accueil de manips en cours sur son bureau. J'ai une pensée émue pour toutes tes phrases inachevées... Merci pour ta patience, notamment à exercer quotidiennement ton sens de la conciliation. Merci de parvenir à renouveler le concept de gentillesse, tout en assumant tes origines douteuses (grâce à toi, nous savons que la Vendée possède une enclave libanaise). « Tu es vraiment un mec à la cool » (Guiho, 2015). Pas mieux.

Merci à la section logistique sans qui ce laboratoire ne serait qu'un colosse aux pieds d'argile : **Laurent, Marie-Hélène, Sandrine** et **Annie**. À vous deux, encore pardon pour les erreurs de référence, un jour peut-être une commande se déroulera sans encombre !

Merci aux chercheurs du labo, aux tauliers qui m'ont tous fait regretter d'avoir hésité à solliciter leur aide au cours de ces quatre années (la peur de déranger). Merci à **Françoise, Béné, Fred B, Franck, Fred L, Pierre L**, ainsi qu'aux trois mousquetaires **François, Ben** et **Marco**, sans vous le labo n'existerait pas. Merci d'être tous disponibles en toutes circonstances, même au détour d'un couloir ou d'un café.

Évidemment, une pensée pour **Marc** sans qui beaucoup de choses ne seraient pas ce qu'elles sont. Mes souvenirs émus remontent jusqu'à bien avant que je ne débarque au labo. Sans lui, je n'en serais pas là aujourd'hui (cette thèse non plus d'ailleurs).

Merci aux chercheurs en herbe qui se succèdent. Merci aux post-docs, étudiants et vacataires de tous poils et horizon, vents frais soufflant dans les murs du premier étage de la faculté de Médecine.

Certains de ces vents ont d'ailleurs un chant caractéristique et reconnaissable lorsqu'ils passent près de vous (je pense bien sûr au bruit de talons). Merci donc à **Marta, Lidia, Camille, Aude** ou encore **Anne-Laure**, voisine de bureau, copine de commande ou encore preuve que l'on peut rédiger sa thèse en regardant un film sur son ordi (ce qui en a scié plus d'un qui passait par là)

Merci aux vents exotiques : **Meadhbh** (un jour, l'ensemble du labo -moi y compris- prononcera correctement ton prénom ; un autre jour, j'irai à Galway, non sans te demander les bonnes adresses), **Kosei** et **Luis** pour votre disponibilité et votre bonne humeur malgré la (fausse) barrière de la langue.

Merci donc à **Gaëlle**, **Julie T**, **Bérengère** (oui, écouter Scorpion à fond en 123 un vendredi matin n'est pas la meilleure des idées), **David**, **Pierre** (ne serait-ce que pour être parvenu à encanailler Romain) et notre briéron national **Steven**.

Merci à **Nathalie**, **Thibault**, à **Laëtitia** et **Éric D**, venant d'autres contrées scientifiques et partis pour d'autres aventures.

J'aurais pu inclure à la liste des vents au chant reconnaissables, **Benjam'**, homme à presque tout faire (sauf les Western Blot, faut pas exagérer non plus), digne représentant d'une autre région française oubliée : le Berry (merci de nous en épargner l'accent, je t'aurais inclus dans les vents exotiques).

Merci à **Marie**, **MAB** pour les intimes et autres flasques de culture, pour ta douceur (méfiez-vous quand-même de l'eau qui dort, tu nous as récemment montré de quoi tu étais capable en chemise/lunettes), pour tes talents culinaires (vivement une soirée belge), pour ta contribution à faire de l'équitation le sport officiel du labo (le cheval, c'est trop génial) et pour ta patience (notamment avec Romain, n'importe-qui d'autre l'aurait déjà mis au pain sec et à l'eau, même en Tupperware) !

Merci aux stagiaires qui se sont succédé, je ne vais pas tous les citer car j'en oublie (entre les masters, BTS et autres). Merci simplement à **Aurélie**, véritable deuxième maman lors de mon M1 ainsi qu'à **Oliv'** alias **Grand Chbeb**, notre Breton-Volleyeur transfuge (ça fait beaucoup de concepts dans la même phrase). Merci à la relève, aux bleus, aux M2 de cette année : **Sarah R** (Tic ou Tac ?), **Sarah M** (Tac ou Tic ?), **Julie B**, **Marie-Alice**, **Brice** et **Geoffroy**, qui risquent d'en faire voir des vertes et des pas mûres à Régis ! Merci également à **Mathilde**, pour qui je n'aurai plus de MNNG-HOS à passer le lundi !

Merci à celles et ceux qui ont eu à me suivre pendant quelques jours ou quelques mois : **Emmanuelle** (la meilleure Minette du quartier), **Éline**, **Mylène**, **Adeline**, **Fanny**, **Zoé**, **Arnaud**, **Briec** et **Quentin**, merci pour votre patience et votre persévérance.

Merci aux nombreux médecins (qui l'eut cru ?) de toutes spécialités et tous services qui ont daigné délaissé leur vrai travail pour venir faire de la vraie science ; si

nombreux que j'en oublierai la moitié si je devais tous les citer. Merci à tous, donc et particulièrement à **Audrey G** et ses bébés chauves, **Géraldine** (comment as-tu fait pour tenir toute une année dans ce bureau ?) ou encore **Hélios**, ne serait-ce que pour la formule citée plus haut.

Merci bien sûr à **Perrine** et **Ludovic** pour avoir relayé la flamme de ce projet jusqu'à moi.

Merci à ceux assez fous pour entreprendre le « double D » : **Audrey L**, pour ton sourire, pour les champignons en boîte au McDo Gare du Nord, pour le wine et pour le cheese, un jour peut-être, j'irai trinquer à l'Île aux Moines ! Merci à **Louis-Romée**, pour au moins un millllllion de raisons en plus de ta bonne humeur, de ton humour ravageur et pour m'avoir empêché tout chômage technique pendant mon M2 et ma thèse !

Ai-je gardé le meilleur pour la fin ? Un immense merci à toi, **Romain, docteur GUIHO**, Radical parmi les Radicaux. Utile, Déterminé et Indépendant apatride, devenu depuis simple militant du parti des oiseaux... Tant des souvenirs durant ces quatre années, merci pour les coups de gueules et coups de cœurs (pour te citer à nouveau), pour les thés (de baltringue ou non), les grilles nantaises ou les belottes parisiennes. Merci pour les moments scientifiques, spirituels ou musicaux, parfois en même temps (principalement en 121). Merci pour Vincent, Alain et Laurent, pour les chemises même à la plage ou à un déménagement (j'allais oublier Francis, du coup). Merci d'avoir parfois troqué le Martini pour la Chouffe, pour le meilleur et pour le pire. Merci d'avoir dérangé plus qu'arrangé, parce qu'au final, c'est bien mieux comme ça.

Ces remerciements étaient annoncés courts... finalement ça s'éternise un peu.

Cependant, je ne peux pas ne pas remercier mes parents. Grâce à eux je n'ai jamais eu de contraintes, jamais eu d'entraves pour apprendre, bien que ça puisse les avoir dépassés rapidement. **Maman**, tu as été un modèle de persévérance et de volonté, notamment pour avoir décroché ce diplôme (un après-midi où j'étais en cours de lettres à Jean Perrin) ; **Papa**, un exemple d'humilité et d'ouverture d'esprit face à des idées ou concepts pouvant pourtant paraître obtus mais que tu abordes avec le sourire (au moins au début).

Enfin, merci à toi, **Marine**, pour m'avoir supporté, tiré, poussé. Ce travail est aussi ton œuvre en fait. Merci d'être là, auprès de moi, de me permettre de partager tes jours, tes nuits. Ce manuscrit, c'est le début d'autre-chose, le premier jour du reste de notre vie...

Harmonie, Réalisation ; Doubter, Croire ; 16/10/15.

*À Danielle,
À Paul.*

*À ceux qui partent,
À ceux qui restent.*

Table des matières

REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES TABLEAUX	XVIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PROPRIÉTÉS DU TISSU ADIPEUX ET INTÉRÊT EN RECONSTRUCTION.....	2
<i>Description du tissu adipeux.....</i>	2
<i>Utilisation du TA en reconstruction : la Greffe de Tissu Adipeux.....</i>	11
OSTÉOSARCOME.....	16
<i>Description de l'ostéosarcome</i>	16
<i>Cas clinique : récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome suite à une GTA.....</i>	23
<i>Cellules Souches Cancéreuses.....</i>	25
PARTIE I : EFFET DES FACTEURS SOLUBLES DU TISSU ADIPEUX SUR LES CELLULES D'OSTÉOSARCOME	34
INTRODUCTION	35
<i>Greffes de Tissu Adipeux et récurrence tumorale : cas clinique</i>	35
<i>Facteurs solubles du TA et croissance tumorale.....</i>	38
<i>CSC dans l'ostéosarcome.....</i>	40
<i>Objectifs : évaluer les interactions des facteurs solubles du TA avec les cellules d'ostéosarcome en</i> <i>prolifération ou en quiescence</i>	41
MATÉRIEL ET MÉTHODES	44
<i>Cellules et conditions de culture</i>	44
<i>Évaluation de la croissance cellulaire in vitro.....</i>	47
<i>Analyse de l'expression génique.....</i>	48
<i>Étude de l'expression protéique</i>	50
<i>Analyses histologiques</i>	52
<i>Analyses statistiques</i>	54
RÉSULTATS	55
<i>Effet pro-tumoral du TA sur le développement de l'ostéosarcome</i>	55
<i>Prolifération de cellules d'ostéosarcome accélérée par les facteurs solubles du tissu adipeux</i>	58
<i>Modélisation de la quiescence in vitro et impact du MCTA</i>	63
<i>Identification des facteurs solubles responsables de l'effet pro-prolifératif du MCTA.....</i>	71
CONCLUSION	78
PARTIE II : IMPLICATION DES CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX DANS LE DÉVELOPPEMENT DES OSTÉOSARCOMES	80
INTRODUCTION	81
<i>Greffes de Tissu Adipeux enrichies en Cellules Souches Mésenchymateuses</i>	81

<i>Greffes de moelle osseuse et de Cellules Stromales Méenchymateuses dans la reconstruction osseuse...</i>	83
<i>Interactions des CSM avec les cellules d'ostéosarcome</i>	84
<i>Interactions des ostéoclastes avec les cellules d'ostéosarcome</i>	87
<i>Objectifs : évaluer les interactions des CSM avec les cellules d'ostéosarcome en prolifération ou en quiescence</i>	88
MATÉRIEL ET MÉTHODES	90
<i>Cellules et conditions de culture</i>	90
<i>Modèle d'ostéosarcome in vivo</i>	94
<i>Analyses histologiques</i>	96
<i>Évaluation de la croissance cellulaire in vitro</i>	98
RÉSULTATS	100
<i>Les ADSC et MSC accélèrent la croissance de l'ostéosarcome primitif</i>	100
<i>Effet pro-prolifératif des facteurs solubles des CSM^{TA} sur les cellules d'ostéosarcome</i>	105
<i>Co-culture directe des cellules d'ostéosarcomes et des CSM</i>	114
CONCLUSION	116
PARTIE III : EFFETS DES FACTEURS SOLUBLES DU TISSU ADIPEUX SUR LES CELLULES DE CARCINOME	
MAMMAIRE	118
INTRODUCTION	119
<i>Le cancer du sein</i>	119
<i>Application de la GTA en reconstruction après un cancer du sein</i>	120
<i>Carcinome mammaire et CSM</i>	123
<i>Cellules Souches Cancéreuses du carcinome mammaire</i>	125
<i>Objectifs : évaluer les interactions du TA et des CSM^{TA} avec les cellules de carcinome mammaire en prolifération ou en quiescence</i>	128
MATÉRIELS ET MÉTHODES	130
<i>Cellules tumorales et conditions de culture</i>	130
<i>Évaluation de la croissance cellulaire in vitro</i>	131
<i>Analyse de l'expression génique</i>	131
<i>Étude de l'expression protéique</i>	131
<i>Migration cellulaire</i>	131
<i>Modèle de carcinome mammaire in vivo</i>	132
<i>Analyses histologiques</i>	133
RÉSULTATS	134
<i>Prolifération accélérée de cellules de carcinome mammaire par les facteurs solubles du tissu adipeux...</i>	134
<i>Modélisation de la quiescence in vitro et impact du MCTA</i>	140
<i>Impact du TA injecté dans un carcinome mammaire in vivo</i>	146
<i>Variabilité des prélèvements de tissu adipeux</i>	153
CONCLUSION	158

DISCUSSION GÉNÉRALE	161
PAR QUEL(S) MÉCANISME(S) LE TA ET LES CSM SOUTIENNENT-ILS LE DÉVELOPPEMENT DE L'OSTÉOSARCOME ?	162
QUEL MÉDIATEUR DE L'EFFET PRO-PROLIFÉRATIF DU TA ET DES CSM ?	164
CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES : MODÉLISATION, CARACTÉRISATION ET STIMULATION.....	167
GTA ET CANCER DU SEIN, FAUT-IL CONTINUER ?	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	172
ANNEXES.....	188
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	189
SÉQUENCES DES AMORCES ADN UTILISÉES EN RT-PCR.....	190
ARTICLE 1	191
ARTICLE 2	199

Liste des figures

Figure 1 :	Images d'adipocytes blancs observés en microscopie.	2
Figure 2 :	Images d'adipocytes bruns observés en microscopie.	3
Figure 3 :	Image en microscopie d'adipocytes beiges.	4
Figure 4 :	Co-localisation d'adipocytes blancs et bruns dans un dépôt de TA sous-cutané.	5
Figure 5 :	Images de macrophages du TA détectés par immuno-histochimie.	6
Figure 6 :	Visualisation du TA dans la MO.	7
Figure 7 :	Schéma de la régulation de la lipolyse par l'insuline et les catécholamines dans les adipocytes blancs.	8
Figure 8 :	Schéma de la thermogénèse induite par la protéine UCP1 dans les adipocytes bruns.	9
Figure 9 :	Schéma de la régulation de la lipogénèse induite par l'insuline dans les adipocytes.	10
Figure 10 :	Images montrant le traitement du TA destiné à une GTA.	12
Figure 11 :	Exemples de séquelles causées par le traitement d'un carcinome mammaire et résultat de la reconstruction comprenant une procédure de Greffe de Tissu Adipeux.	14
Figure 12 :	Hétérogénéité des zones cellulaires dans l'ostéosarcome.	16
Figure 13 :	Ostéosarcomes non centraux.	17
Figure 14 :	Ostéosarcome commun.	18
Figure 15 :	Ostéosarcome télangiectasique.	19
Figure 16 :	Observation du génome des ostéosarcomes de haut et bas-grade.	20
Figure 17 :	Schéma de la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome en France.	21
Figure 18 :	Diagnostic et traitement d'un ostéosarcome télangiectasique.	24
Figure 19 :	Récidive tumorale sur le site de GTA.	24
Figure 20 :	Schémas des théories sur le développement tumoral.	26
Figure 21 :	Schéma de la différenciation des CSM.	29
Figure 22 :	Observation du potentiel de différenciation des CSM.	30
Figure 23 :	Cellules d'ostéosarcome en sphères.	31
Figure 24 :	Évaluation de la tumorigénicité des CSC d'ostéosarcome.	32
Figure 25 :	Suivi temporel du développement d'ostéosarcome induit chez la souris nude.	36
Figure 26 :	Culture de cellules d'ostéosarcome en présence d'un prélèvement de TA.	37
Figure 27 :	Effet pro-prolifératif de l'IL-6 sur les cellules d'ostéosarcome Saos-2.	39
Figure 28 :	Impact de l'injection de TA sur le développement de l'ostéosarcome.	42
Figure 29 :	Fractionnement des composants du MCTA en fonction de leur poids moléculaire.	46
Figure 30 :	Analyse du phénotype de tumeurs injectées avec du PBS ou du TA.	56
Figure 31 :	Détection in vivo de composants du TA injecté et influence sur la prolifération de cellules tumorales.	57
Figure 32 :	Obtention des MCTA.	58
Figure 33 :	Prolifération de cellules d'ostéosarcome en présence de MCTA.	59

FIGURE 34 :	Cycle cellulaire de cellules HOS en présence de MCTA.....	61
Figure 35 :	Impact du MCTA sur les protéines du cycle cellulaire des cellules HOS.	62
Figure 36 :	Photographies de cellules HOS cultivées en conditions d'adhérence ou en oncosphères.	64
Figure 37 :	Influence de la culture en oncosphères sur l'expression génique de cellules HOS.....	65
Figure 38 :	Influence du MCTA sur l'expression génique de cellules HOS en oncosphères.....	66
Figure 39 :	Influence du MCTA sur la formation d'oncosphères par les cellules HOS.	66
Figure 40 :	Observation de la quiescence de cellules HOS en sphères et effet de l'ajout de MCTA.....	68
Figure 41 :	Observation de la prolifération de cellules HOS cultivées en oncosphères.....	69
Figure 42 :	Prolifération de cellules HOS après une période de quiescence.....	70
Figure 43 :	Dosage multiplex du MCTA.	72
Figure 44 :	Implication de l'IL-6 et de la leptine dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.	73
Figure 45 :	Implication de la voie de signalisation STAT dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.	74
Figure 46 :	Implication des MAPK dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.....	75
Figure 47 :	Implication du LPA dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.....	76
Figure 48 :	Effet du MCTA fractionné en fonction du poids moléculaire sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.....	77
Figure 49 :	Schéma du principe de l'enrichissement en fraction stromale vasculaire du TA injecté lors d'une greffe.	81
Figure 50 :	Schéma du principe de l'injection de MO concentrée en reconstruction osseuse.	83
Figure 51 :	Impact des CSMMO sur la croissance de l'ostéosarcome.	86
Figure 52 :	Schéma du cercle vicieux entre les cellules d'ostéosarcome et les cellules du tissu osseux.	87
Figure 53 :	Caractérisation membranaire des CSM.....	92
Figure 54 :	Impact des CSMTA sur la croissance tumorale et le remodelage osseux l'ostéosarcome.....	100
Figure 55 :	Détection des CSMTA co-injectées dans l'ostéosarcome à un stade précoce.....	101
Figure 56 :	Comparaison de l'effet pro-tumoral des CSMTA et des CSMMO sur la croissance de l'ostéosarcome.	102
Figure 57 :	Comparaison de l'effet des CSMMO et des CD14 ⁺ sur la croissance de l'ostéosarcome.	103
Figure 58 :	Recherche d'ostéoclastes humains dans les tumeurs induites par co-injection de cellules HOS et CD14 ⁺	104
Figure 59 :	Prolifération de cellules d'ostéosarcome en présence de MC-CSM.	106
Figure 60 :	Cycle cellulaire de cellules HOS en présence de MC-CSM.	107
Figure 61 :	Effet de l'ajout de MC-CSM sur la quiescence de cellules HOS en sphères.	109
Figure 62 :	Dosage multiplex des MC de CSM.....	110
Figure 63 :	Implication de l'IL-6 et de l'IL-8 dans l'effet pro-prolifératif du MC- CSMTA sur les cellules d'ostéosarcome.....	111
Figure 64 :	Différenciation adipocytaire des CSMTA.	112

Figure 65 : Impact du niveau de différenciation adipocytaire des CSM _{TA} sur leur effet pro-prolifératif observé sur les cellules HOS.....	113
Figure 66 : Effet du niveau de différenciation adipocytaire des CSM _{TA} sur la quiescence de cellules HOS en sphères.....	114
Figure 67 : Formation de sphères mixtes de cellules HOS et de CSM _{TA}	115
Figure 68 : Tissu mammaire et carcinomes de différents stades observés en histologie.....	119
Figure 69 : Chirurgie du cancer du sein.....	120
Figure 70 : Impact de la GTA sur la récurrence locale du carcinome mammaire.	122
Figure 71 : Effet de l'âge de la patiente, du grade et de l'indice Ki-67 de la tumeur initiale sur la récurrence locale du carcinome mammaire in situ après une GTA.....	123
Figure 72 : Promotion de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique des CSM _{MO} dans le carcinome mammaire.	124
Figure 73 : Propriétés de CSC chez une sous-population de la lignée cellulaire MDA-MB-231.....	126
Figure 74 : Expression de marqueurs de la TEM par des cellules non tumorigènes aux caractéristiques de cellules souches.....	127
Figure 75 : Induction de la TEM par surexpression de c-myc dans des cellules épithéliales.	128
Figure 76 : Cellules de carcinome mammaire en culture.....	129
Figure 77 : Prolifération de cellules de carcinome mammaire en présence de MCTA.	135
Figure 78 : Cycle cellulaire de cellules MCF7 en présence de MCTA.	136
Figure 79 : Impact du niveau de différenciation adipocytaire des CSM _{TA} sur leur effet pro-prolifératif observé sur les cellules MCF7.	137
Figure 80 : Activation des voies de signalisation STAT et ERK1/2 par le MCTA dans les cellules MCF7.	138
Figure 81 : Implication de la leptine dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.....	138
Figure 82 : Implication des voies de signalisation STAT et ERK1/2 dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.	139
Figure 83 : Photographies de cellules MCF7 cultivées en conditions d'adhérence ou en oncosphères.	140
Figure 84 : Influence de la culture en oncosphères sur l'expression génique de marqueurs de CSC par les cellules MCF7.	140
Figure 85 : Schéma de la voie d'induction de la TEM dans les cellules de carcinome mammaire.....	141
Figure 86 : Influence de la culture en oncosphères et du MCTA sur l'expression génique de marqueurs de la TEM par les cellules MCF7.....	142
Figure 87 : Capacité de migration des cellules MCF7 et impact du MCTA.	143
Figure 88 : Impact de la culture en oncosphères des MCF7 sur leur capacité de migration.	144
Figure 89 : Observation de la quiescence de cellules MCF7 en sphères et effet de l'ajout de MC de TA et de CSM _{TA}	145
Figure 90 : Observation de la prolifération de cellules MCF7 cultivées en oncosphères.	146
Figure 91 : Induction d'un modèle de carcinome mammaire humain orthotopique chez la souris.	148
Figure 92 : Organisation des tumeurs induites par injection intra-canalair de cellules MCF7.	150

Figure 93 :	Suivi temporel du développement du carcinome mammaire induit chez la souris nude.....	151
Figure 94 :	Influence du TA et du MCTA sur la prolifération de cellules tumorales in vivo.	152
Figure 95 :	Effet du liquide d'infiltration utilisé lors d'une GTA sur la prolifération de cellules MCF7.....	154
Figure 96 :	Impact de l'infiltration du TA sur l'effet pro-prolifératif de ses facteurs solubles.	154
Figure 97 :	Dosage des AG dans le TA de 2 patients.	155
Figure 98 :	Effet des AG sur la prolifération des cellules tumorales.	156
Figure 99 :	Implication du LPA dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.	157
Figure 100 :	Schéma de la mutlimérisation de l'adiponectine.	165

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Récapitulatif de l'effet des CSM sur les différents types de cancers.	85
Tableau 2 :	Séquences des amorces utilisées en RT-PCR	190

*Le silence éternel de ces espaces infinis m'effraie.
Et la seule chose qu'on puisse lui opposer ... c'est la poésie ou la musique.*

Alexandre Astier, d'après Blaise Pascal

INTRODUCTION GÉNÉRALE

PROPRIÉTÉS DU TISSU ADIPEUX ET INTÉRÊT EN RECONSTRUCTION

Description du tissu adipeux

3 types d'adipocytes

Le Tissu Adipeux (TA) est un organe principalement composé d'adipocytes (40 à 60% des types cellulaires du TA). Chez les mammifères, il existe 2 principaux types d'adipocytes : le blanc et le brun. Tous les deux sont des stades terminaux de la différenciation adipocytaire de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM). Ces 2 types cellulaires présentent une structure et une fonction distinctes,

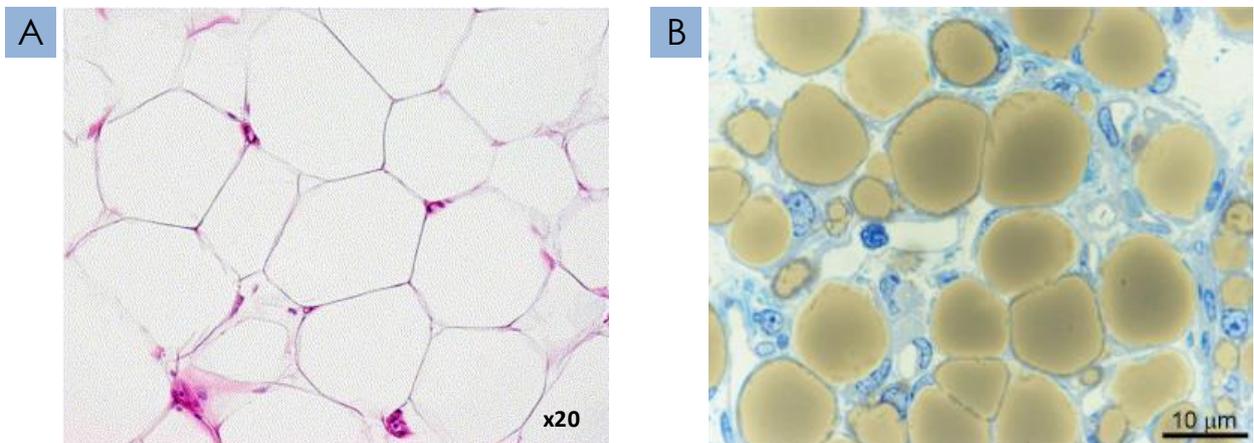


Figure 1 : Images d'adipocytes blancs observés en microscopie.

A- Extrait de Cinti, 2005. B- Extrait de Smorlesi et al., 2012.

Les adipocytes blancs (figures 1A et 1B) sont de volumineuses cellules (25 à 2000 μm ; Trujillo and Scherer, 2006) et caractérisés par une vacuole lipidique unique qui occupe 90% du volume cellulaire, sa forme sphérique permettant une optimisation du stockage dans l'espace.

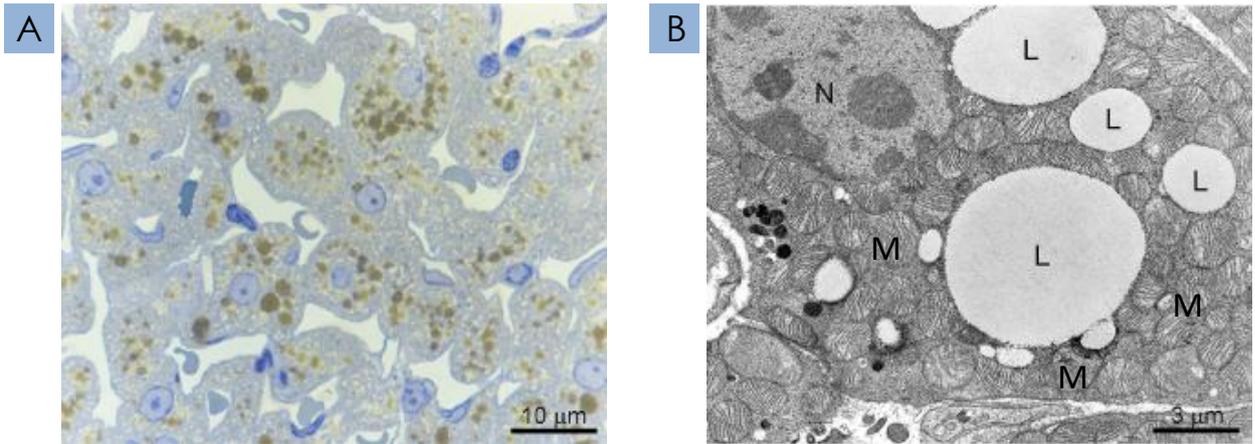


Figure 2 : Images d'adipocytes bruns observés en microscopie.

Adipocytes bruns observés en microscopie optique (A) et en microscopie électronique à transmission (B). L : vacuole lipidique ; N : noyau ; M : mitochondrie. Extraits de Smorlesi et al., 2012.

Les adipocytes bruns (figure 2A) sont des cellules thermogéniques. Très minoritaires dans le TA humain adulte, ils stockent également les triglycérides dans des vacuoles, mais celles-ci sont multiples dans le cytoplasme, et plus petites que dans les adipocytes blancs. Étroitement connectés au système nerveux sympathique, les adipocytes bruns sont activés lorsque la température corporelle descend et brûlent leurs lipides au sein de leurs mitochondries sphériques (figure 2B). Leur protéine mitochondriale spécifique UCP1 leur permet de libérer de chaleur sans produire d'ATP au cours de la lipolyse (Ricquier, 2006).

Un troisième type d'adipocyte est retrouvé dans le TA : l'adipocyte beige. Ces adipocytes représentent une forme intermédiaire entre les adipocytes blancs et bruns. Ils peuvent en effet avoir une ou plusieurs vacuoles et n'expriment pas, ou peu, la protéine UCP1 (figure 3). Leurs mitochondries ont également un aspect à mi-chemin entre celles des adipocytes blancs et bruns. Les adipocytes beiges se localisent généralement entre des adipocytes bruns et blancs mais leur fonction est actuellement encore mal connue.

Il est décrit depuis plus de 30 ans que les adipocytes pourraient passer successivement d'un phénotype blanc ou brun à l'autre sans se différencier, par un phénomène de trans-différenciation (Cinti, 2009; Young et al., 1984). Les adipocytes beiges pourraient alors représenter un stade intermédiaire de cette trans-différenciation.

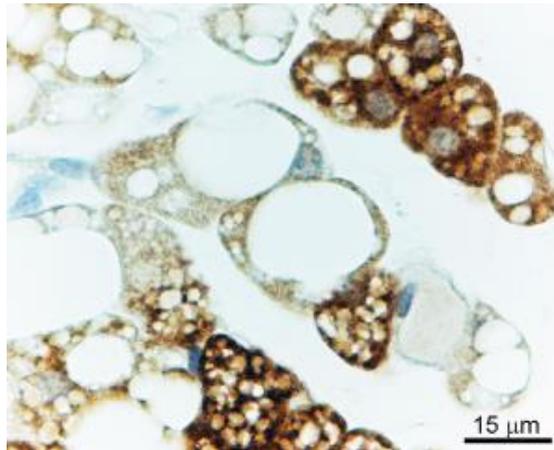


Figure 3 : Image en microscopie d'adipocytes beiges.

Marquage histologique de la protéine UCP1 identifiant les adipocytes bruns en sombre et les adipocytes beiges en clair. Extrait de Smorlesi et al., 2012.

Adipocytes organisés en dépôts ou isolés

Adipocytes organisés : dépôts de TA

Les adipocytes, qu'ils soient bruns ou blancs sont inclus dans des dépôts de TA retrouvés sous la peau ou autour des organes (dépôts sous-cutané et viscéraux respectivement). Dans les 2 cas, les zones adipeuses sont délimitées anatomiquement par une capsule conjonctive pour les dépôts sous-cutanés, ou par un feuillet péritonéal pour les dépôts viscéraux (à l'exception du dépôt médiastinal, viscéral, qui est discontinu des dépôts sous-cutanés environnants). Chaque dépôt est rendu anatomiquement autonome grâce à une vascularisation et une innervation propres, ce qui incite certains à parler de « mini-organes ». Au sein des dépôts de TA, des études anatomiques ont montré la présence conjointe d'adipocytes blancs et bruns (figure 4 ; Cinti, 2005; Smorlesi et al., 2012).

Dans ces conditions, le TA adipeux est composé d'adipocytes et d'autres types cellulaires composant la fraction stromale vasculaire. Dans cette fraction, on retrouve des Cellules Souches Mésenchymateuses (TA), qui représentent environ 1% de la population cellulaire du TA (Strem et al., 2005) et dont les caractéristiques seront développées plus en détails dans un chapitre ultérieur de cette introduction (page 29). ainsi que des fibroblastes, des précurseurs adipocytaires et des CSM sont identifiés dans le TA (Cinti, 2005). L'ensemble de ces types cellulaires constituent la fraction stromale vasculaire (Rodbell, 1964).

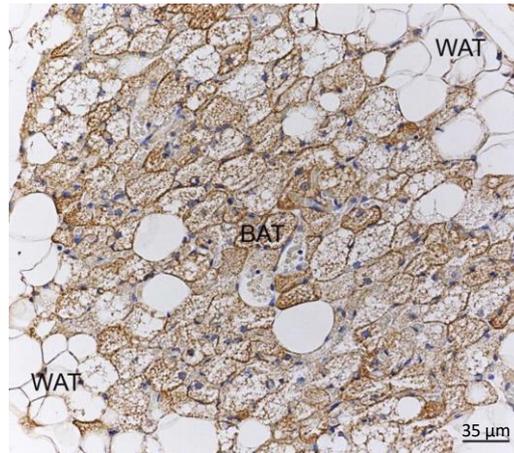


Figure 4 : Co-localisation d'adipocytes blancs et bruns dans un dépôt de TA sous-cutané.

Image de la détection de la protéine UCP1 par immuno-histologie. WAT : adipocyte blanc ; BAT : adipocyte brun. Extrait de Cinti, 2009

Dans ces unités anatomiques, les adipocytes sont à proximité avec des éléments sanguins permettant les échanges d'énergie (par acides gras et chaleur) et les échanges hormonaux, afférents (par exemple : insuline) et efférents (par exemple : leptine). Le TA est également en contact avec le système nerveux sympathique, responsable de la régulation de la lipogenèse et de la lipolyse, notamment par l'intermédiaire de la noradrénaline.

Parmi les cellules immunitaires retrouvées dans le TA, les macrophages semblent jouer un rôle dans l'inflammation chronique relative à l'obésité. En effet, le nombre de macrophages du TA augmente avec la masse grasseuse pour atteindre jusqu'à 30 macrophages pour 100 adipocytes chez des sujets obèses (figure 5A ; Bastard and Fève, 2013; Cinti, 2005; Heilbronn and Campbell, 2008). Les macrophages exerceraient leur rôle de phagocytose de corps cellulaires d'adipocytes ayant atteint une taille critique les faisant entrer en apoptose, ce qui donne lieu à des formations cellulaires en couronnes (figure 5B ; Bastard and Fève, 2013; Cinti, 2009; Smorlesi et al., 2012). Ces macrophages du TA normalement anti-inflammatoires sont responsables en cas d'obésité de la production de cytokines pro-inflammatoires comme par exemple le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), ou les Interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8 ; Bourlier et al., 2008; Zeyda and Stulnig, 2007). L'inflammation chronique qui en résulte serait en partie responsable d'une désensibilisation des adipocytes à l'insuline pouvant aboutir à l'établissement d'un diabète de type 2 (Heilbronn and Campbell, 2008; Zeyda and Stulnig, 2007).

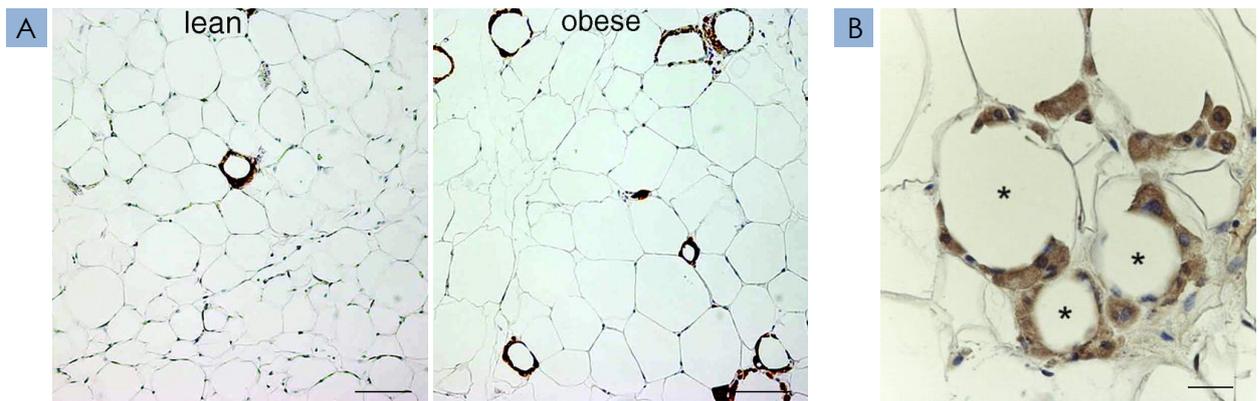


Figure 5 : Images de macrophages du TA détectés par immuno-histochimie.

A- Détection de la protéine Mac-2 dans le TA de souris minces (*lean*) ou obèses (*obese*). Échelle = 100 μ m. Extrait de Cinti, 2005. B- Détection de la protéine F4/80 dans le TA humain montrant la disposition en couronne (*) des macrophages autour d'adipocytes morts. Échelle = 20 μ m. Extrait de Cinti, 2009.

D'autres cellules immunitaires comme des lymphocytes, des mastocytes. Les différents types cellulaires du TA sont organisés au sein d'un réseau de fibres de collagène de types I et III (réticuline).

Adipocytes isolés : TA de la moelle osseuse

La Moelle Osseuse (MO) est le siège de l'hématopoïèse, qui consiste en la production des cellules sanguines et de leur libération dans la circulation. C'est donc un tissu très vascularisé qui représente 85% du volume interne des os, le reste étant occupé par l'os trabéculaire (Sheu and Cauley, 2011).

Il existe deux types de MO : la MO rouge hématopoïétique et la jaune, adipeuse. La moelle rouge est progressivement convertie en moelle jaune avec l'âge. Cette conversion débute aux extrémités du squelette et progresse de façon centripète pour atteindre les vertèbres (Moerman et al., 2004). Au sein d'un os, il semble que la moelle jaune progresse à partir de la diaphyse vers les métaphyses (Hwang and Panicek, 2007). Néanmoins, la conversion de la MO peut être réversible et peut être influencée notamment par l'adiposité d'un individu ou son régime alimentaire.

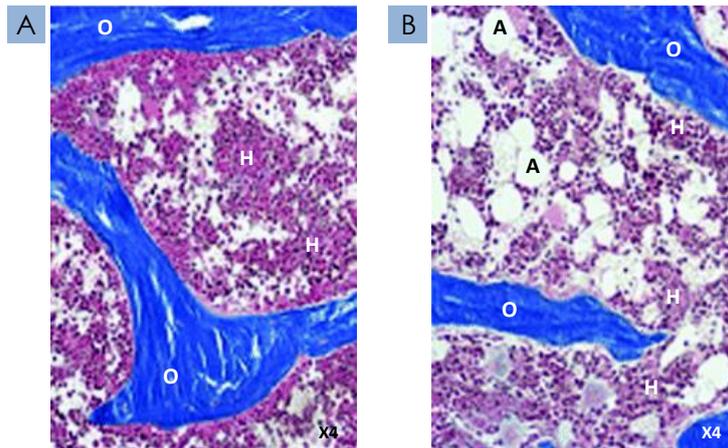


Figure 6 : Visualisation du TA dans la MO.

Images de coloration histologique au Trichrome de Masson sur des coupes de tibia proximal de souris C57BL/6 âgées de 8 (A) et 24 (B) mois. H : moelle hématopoïétique ; O : os ; A : adipocyte. Extrait de Moerman et al., 2004.

Au sein de la MO, les adipocytes sont retrouvés isolés parmi les autres types cellulaires, au contact direct de l'os des vaisseaux sanguins et des précurseurs hématopoïétiques (figure 6).

Qu'ils soient organisés en dépôts ou inclus isolément dans la moelle osseuse, les adipocytes interagissent donc avec les grands systèmes de régulation de l'organisme, leur permettant d'assurer différentes fonctions.

Rôles et fonctions du TA

Protection et structure

Le TA, principalement sa composante viscérale, assure la protection face à des contraintes mécaniques (chocs et pressions) des organes autour desquelles il est situé : reins, ganglions lymphatiques, globes oculaires... Situé dans les coussinets de la paume des mains et de la plante des pieds le TA peut également permettre une répartition des charges.

Le TA est également retrouvé de manière transitoire au sein d'organes en remaniement, notamment dans le sein de la femme, servant de comblement entre les épisodes de lactation des glandes mammaires. Une théorie de trans-différenciation adipo-épithéliale avance que les adipocytes contribueraient à la

lactation par l'acquisition d'un phénotype proche de celui de cellules de l'épithélium ductal (Smorlesi et al., 2012).

Réserve énergétique

Le TA adulte est majoritairement composé d'adipocytes blancs et est particulièrement soumis aux conditions nutritionnelles. Les adipocytes assurent en effet le stockage de la quasi-totalité des triglycérides de l'organisme, représentant la plus grande réserve énergétique mobilisable lors de l'épuisement des réserves en glucides.

Ainsi, en cas de carence en apport énergétique, le TA de réserve peut s'atrophier et presque disparaître. Les adipocytes blancs sont le siège d'une intense hydrolyse des triglycérides qui permet la libération d'acides gras libres non estérifiés dans la circulation sanguine. Cette lipolyse est réalisée par des lipases activées en réponse à l'adrénaline et la noradrénaline par l'intermédiaire du récepteur β_3 -adrénergique (figure 7 ; Morak et al., 2012).

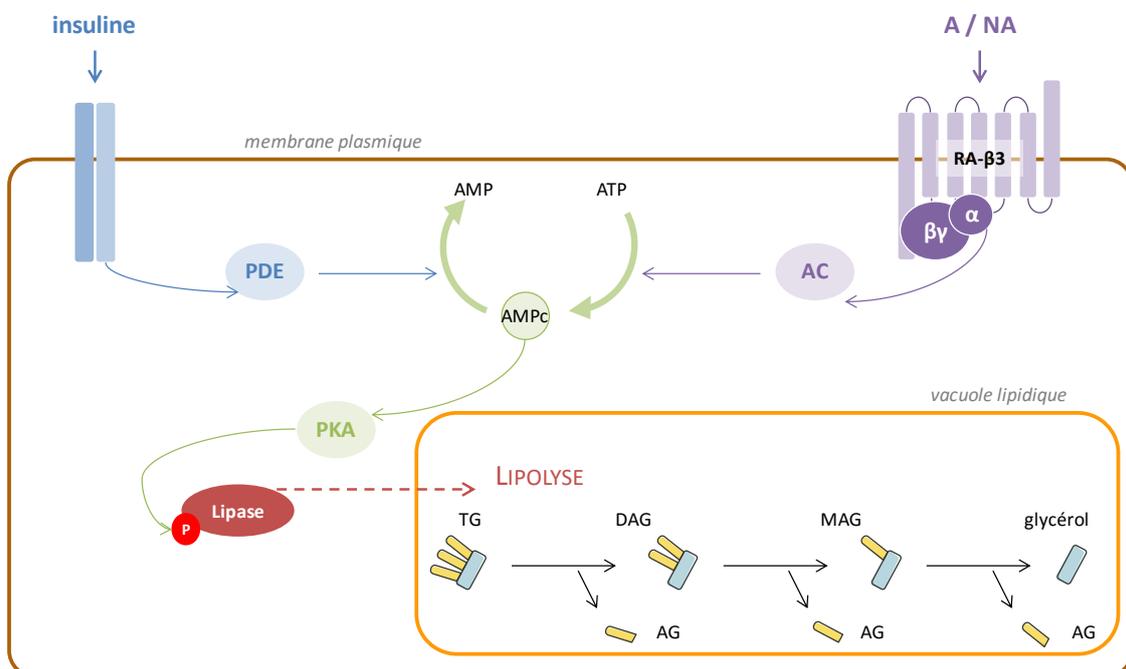


Figure 7 : Schéma de la régulation de la lipolyse par l'insuline et les catécholamines dans les adipocytes blancs.

PDE : phosphodiésterase ; A : adrénaline ; NA : noradrénaline ; AC : adénylate cyclase ; AMPC : AMP cyclique ; PKA : protéine kinase A ; TG : triglycéride ; DAG : diacyl-glycérol ; MAG : monoacyl-glycérol ; AG : acide gras.

Au sein des adipocytes bruns, les acides gras libérés par la lipolyse sont responsables de l'activation de la protéine spécifique UCP1 (pour UnCoupled Protein 1, aussi appelée thermogénine), retrouvée dans les mitochondries adipocytaires. Cette protéine a la propriété de perméabiliser la membrane interne des mitochondries et de dissiper le gradient de protons généré par la chaîne respiratoire entre la matrice et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. La dissipation du gradient de protons permet de libérer une grande quantité d'énergie par chaleur (thermogénèse) et non plus par l'intermédiaire de l'ATP-synthase (figure 8 ; Kozak and Anunciado-Koza, 2008).

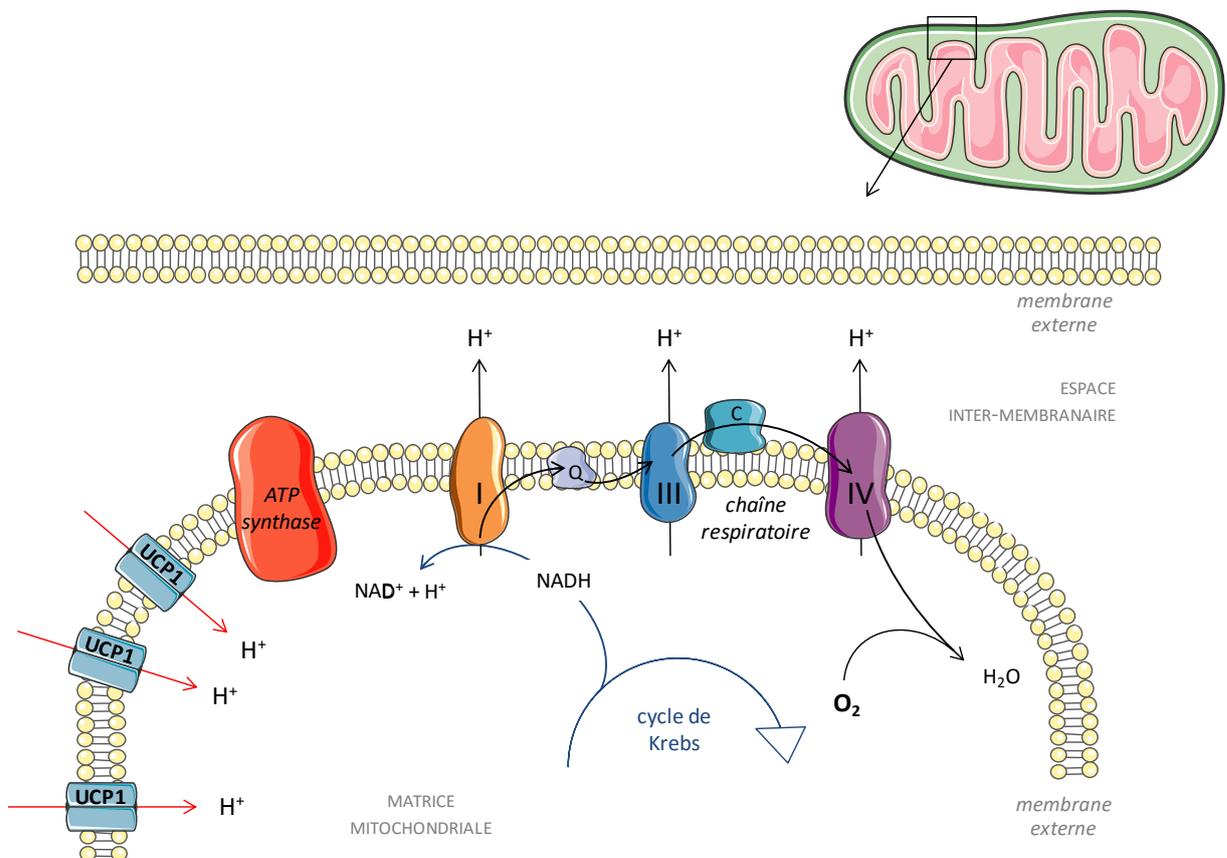


Figure 8 : Schéma de la thermogénèse induite par la protéine UCP1 dans les adipocytes bruns.

Lors d'épisodes nutritionnels hypercaloriques, les adipocytes blancs sont stimulés par l'insuline pour absorber le glucose sanguin, notamment par translocation du transporteur GLUT4 vers la membrane plasmique (Lizunov et al., 2013). Le glucose internalisé est alors converti en triglycérides lors de la lipogénèse (figure 9). L'insuline a également pour effet de bloquer la lipolyse (figure 7). Les adipocytes blancs

s'hypertrophient et leur activité de réserve peut être soutenue par la transdifférenciation d'adipocytes bruns.

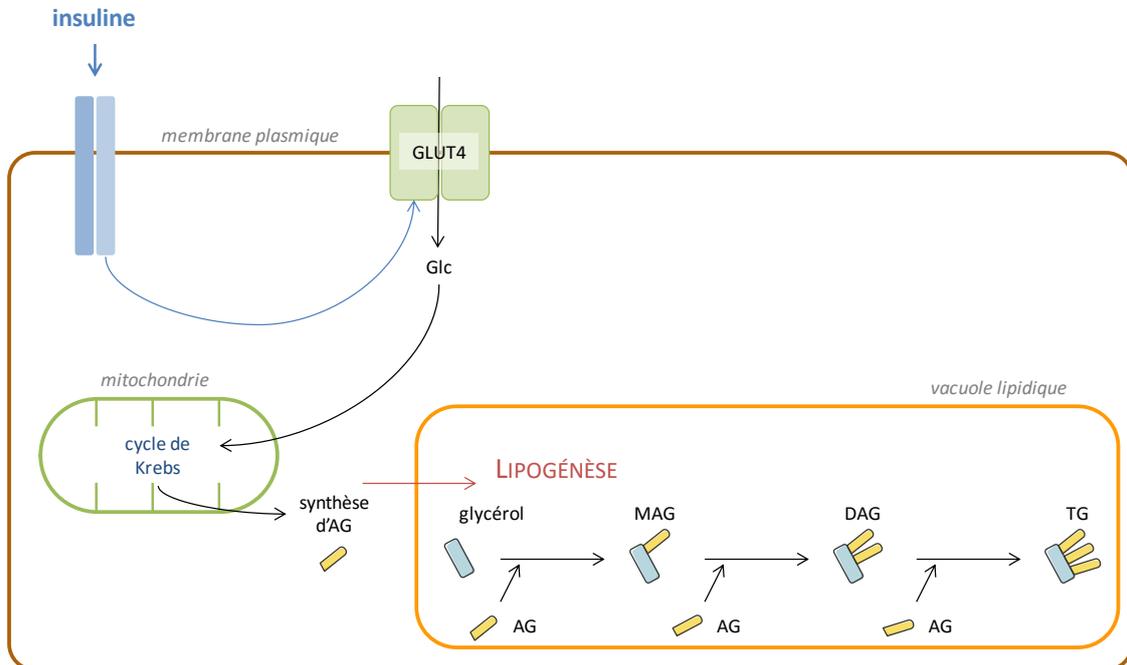


Figure 9 : Schéma de la régulation de la lipogénèse induite par l'insuline dans les adipocytes.

Glc : glucose ; TG : triglycéride ; DAG : diacyl-glycérol ; MAG : monoacyl-glycérol ; AG : acide gras.

Environ 10% des adipocytes d'un individu sont renouvelés chaque année. Ce renouvellement semble être un mécanisme hautement régulé puisque le nombre total d'adipocytes d'un individu adulte demeure constant avec l'âge et ce malgré les variations de poids (Spalding et al., 2008).

Sécrétion et fonction endocrine : importance des adipokines

Jusqu'aux années 1980, le TA semblait se limiter à un réservoir énergétique protecteur. Le regard de la communauté scientifique a changé lorsque des molécules spécifiquement sécrétées par le TA ont été identifiées comme ayant un rôle systémique, les adipokines. Les adipokines participent à la régulation du métabolisme énergétique, lipidique et glucidique. Les principales adipokines sont la leptine (Zhang et al., 1994) et l'adiponectine (Scherer et al., 1995).

La leptine est l'hormone de la satiété. Son taux sanguin est proportionnel à la quantité de TA d'un individu. En effet, des souris déficientes en leptine (mutation

ob/ob) deviennent rapidement obèses après la naissance du fait d'une prise de nourriture incontrôlée. De plus, ces animaux ont un phénotype pré-diabétique avec une glycémie, une lipémie et une insulinoémie excessives, associées à une résistance à l'insuline. La leptine a donc un effet insulino-sensibilisateur. Au sein des adipocytes blancs, la leptine est également capable d'activer la lipolyse et d'inhiber la lipogénèse. Par ailleurs, ces souris présentent une température corporelle plus basse et une réponse au froid diminuée, ce qui indique que la leptine est capable d'activer la thermogénèse dans les adipocytes bruns (Lindström, 2007).

À l'inverse de la leptine, l'adiponectine est produite de manière inversement proportionnelle à la quantité de TA (paradoxe de l'adiponectine). Ses principales fonctions sont anti-inflammatoires, anti-athéromateuses et insulino-sensibilisantes (Ouchi and Walsh, 2007).

Utilisation du TA en reconstruction : la Greffe de Tissu Adipeux

Description de la technique

Le TA a été utilisé en chirurgie esthétique autologue dès la fin du 19^{ème} siècle, par fragment ou lambeaux et parfois dans le cadre de greffes dermo-graisseuses. Cependant, ces méthodes nécessitaient une excision chirurgicale du TA. L'utilisation de la lipoaspiration par canulation à la fin des années 1970 a permis d'envisager le TA prélevé comme un produit de remplissage, récupéré simplement et sans altération majeure de la zone aspirée. (Mojallal and Foyatier, 2004).

L'utilisation de TA autologue par réinjection a été modernisée par des travaux débutés par Coleman dès la fin des années 1980 et aboutissant à l'établissement de la technique de Greffe de Tissu Adipeux (GTA). Chaque étape du transfert autologue de TA (présenté dans la figure 10) est codifiée afin de traumatiser le moins possible le greffon (Coleman, 1995).

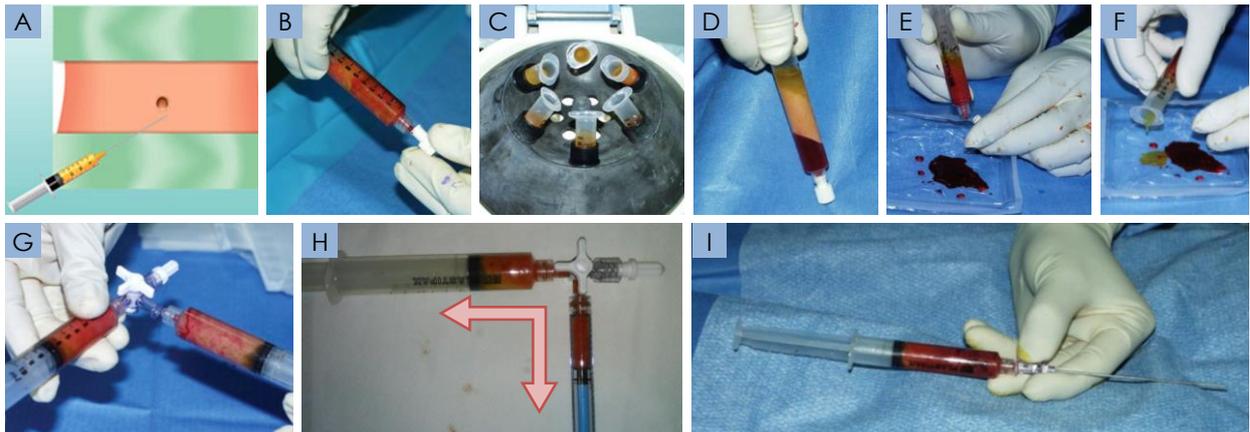


Figure 10 : Images montrant le traitement du TA destiné à une GTA.

Extraits de Covarrubias et al., 2013 (A) de Delay et al., 2009 (B à G et I); la photographie H a été prise au laboratoire.

Le prélèvement est effectué par lipoaspiration de TA sous-cutané au niveau du site donneur (figure 10A). La seringue contenant le TA (figure 10B) est centrifugée à 3000 rpm pendant 3 minutes (figure 10C) afin de séparer le TA des autres constituants du prélèvement (figure 10D). Le TA est alors isolé par enlèvement du sang de la fraction inférieure (figure 10E), puis des lipides de la fraction supérieure (figure 10F). La seringue contenant le TA est alors connectée par un robinet à trois voies à une autre seringue vide de 10 mL pour une réinjection directe (dans le cas d'une procédure au niveau des seins, figure 10G), ou de 1 mL si la réinjection doit être plus précise (dans le cas d'une procédure au niveau de la face, figure 10H). Le TA ainsi préparé est prêt à être réinjecté dans la zone à reconstruire (figure 10I).

De nombreuses techniques propres à chaque équipe chirurgicale sont décrites, surtout depuis l'apparition d'indications pour lesquelles des gros volumes de réinjection sont nécessaires. La préparation de la graisse peut être réalisée par centrifugation, filtration ou décantation. Le TA est prélevé du site donneur de la manière la moins traumatique possible à l'aide d'une fine canule d'aspiration et à travers une incision dissimulée dans les plis de la peau. La réinjection est effectuée sur un site à reconstruire bien repéré au préalable, à travers des micro-incisions d'1 mm, dans des plans et des directions différentes afin d'augmenter la surface de contact entre le TA greffé et les tissus du site receveur.

Le site de prélèvement est choisi par le chirurgien avec le patient, en fonction de ses zones d'excès de graisse. Le prélèvement est en effet réalisé par lipoaspiration des excédents graisseux et permet donc une amélioration appréciable du site donneur. Le choix de ces sites de prélèvement est également dépendant de la quantité de graisse jugée nécessaire au comblement des zones à réparer.

Une étude réalisée sur des greffons de TA injectés lors de reconstruction faciale a montré que les propriétés du greffon ne se limitaient pas à du simple comblement mais contribuaient également à améliorer la trophicité de la peau du site receveur (Mojallal et al., 2009). En effet, la vascularisation et la production de collagène étaient augmentées dans les zones ayant reçu l'injection de TA. Le GTA consiste donc en une véritable greffe de tissu vivant. Le greffon serait capable de promouvoir la vascularisation ainsi que la synthèse de collagène par la production d'adipokines et de facteurs de croissance. De plus, le TA apporté par GTA contribuerait directement à la synthèse de la matrice extracellulaire du site greffé grâce à l'apport d'adipocytes matures et de pré-adipocytes ainsi que de fibroblastes.

Applications et limites

La technique de GTA décrite par Coleman était initialement développée pour corriger des défauts esthétiques au niveau de la face pour le comblement de rides, complément à des liftings, ou la restauration des volumes du visage.

L'application du transfert de TA a rapidement été étendue à l'ensemble de la chirurgie plastique et reconstructrice, dans le cas de correction d'irrégularités tissulaires pouvant être causées par une lipoaspiration mal conduite ou de fontes graisseuses anormales qui peuvent survenir notamment après la trithérapie pratiquée chez des patients porteurs du virus de l'immunodéficience humaine. La GTA est également fréquemment utilisée à visée correctrice suite à une intervention chirurgicale.

La résection chirurgicale d'une tumeur peut laisser derrière elle des pertes de tissus mous et musculaires. Devant ces séquelles physiques causées par la tumeur et son traitement, les patients peuvent être demandeurs d'une réparation esthétique permettant de faciliter la prise en charge psychologique du traitement et aussi

d'améliorer leur qualité de vie. Dans ce contexte, la GTA est une technique simple tout-à-fait indiquée pour restaurer les défauts de volume tissulaire.

La plus fréquente application de la GTA concerne le traitement du cancer du sein. La technique peut être appliquée suite à une ablation totale de la glande mammaire par chirurgie radicale (mastectomie) pour corriger le volume du sein soit seule (GTA exclusive), soit en complément d'une autre technique de reconstruction mammaire (prothèse, lambeau autologue ; figure 11A). Elle peut être également utilisée après une chirurgie conservatrice (tumorectomie) afin de corriger les séquelles esthétiques causées par les traitements conservateurs (figure 11B).

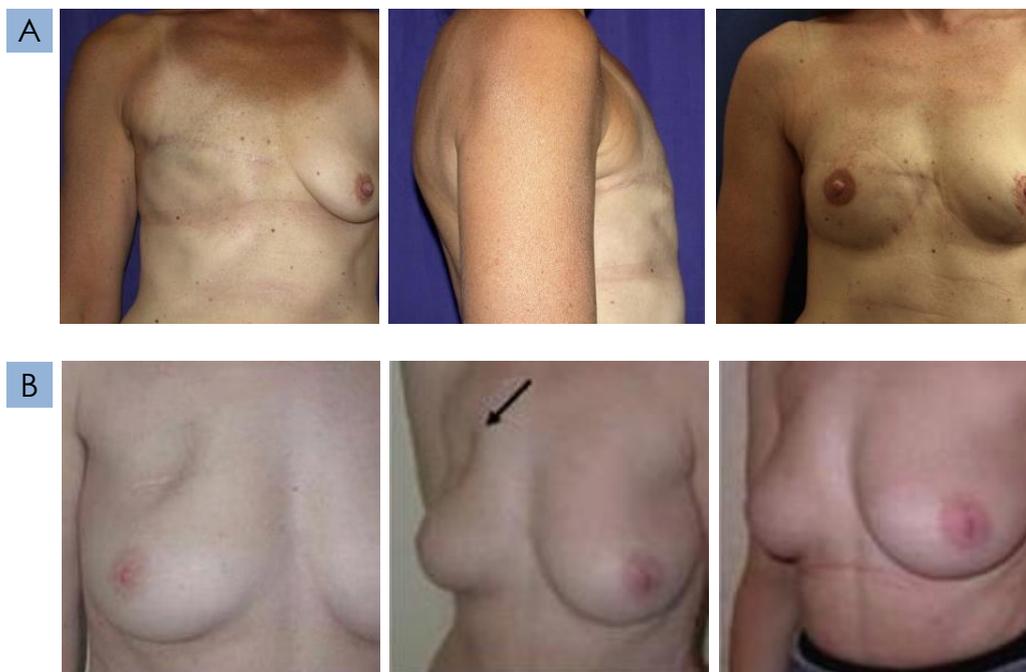


Figure 11 : Exemples de séquelles causées par le traitement d'un carcinome mammaire et résultat de la reconstruction comprenant une procédure de Greffe de Tissu Adipeux.

Images de seins avant et après reconstruction par GTA suite à un traitement par mastectomie (A ; extrait de Delaporte et al., 2009) ou après un traitement par chirurgie conservatrice (B ; extrait de Amar et al., 2008).

En 1987, une recommandation de la société américaine de chirurgie plastique et reconstructrice a incité les praticiens à ne pas utiliser de transfert de TA autologue en chirurgie mammaire. En effet, la GTA induirait l'apparition de micro-calcifications qui pourraient gêner la détection de cancer du sein par mammographie. Cette recommandation a engendré la mise en place d'études rétrospectives destinées à

vérifier l'innocuité du transfert autologue de TA. Coleman, qui avait établi la technique de GTA, a lui-même mené avec Saboeiro une étude rétrospective sur 17 patientes aux atteintes variables (atrophie, déformations causées par une procédure d'augmentation, ou par un traitement anti-tumoral). Ils ont montré que la GTA n'avait pas d'impact néfaste sur la lecture des mammographies et sur la détection de cancer du sein (Coleman and Saboeiro, 2007).

La technique de Greffe de Tissu Adipeux est utilisée quotidiennement et notamment en reconstruction post-tumorale, principalement après un cancer du sein. Il convient cependant de s'interroger sur l'impact qu'a le TA greffé sur le tissu reconstruit. En effet, les adipocytes sont capables d'interagir avec différents types cellulaires notamment par l'intermédiaire des adipokines qu'elles produisent, et pourraient donc avoir une influence sur des cellules tumorales, résiduelles ou quiescentes.

La question de cette interaction entre le greffon et la zone reconstruite s'est posée lors de l'observation d'un cas clinique rare par les services de chirurgie orthopédique et de chirurgie plastique du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nantes. Ce cas clinique est une récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome après plus de 10 ans de rémission et quelques mois après la reconstruction par GTA du site initial de la tumeur (Perrot et al., 2010). Ces observations sont décrites plus en détail dans la partie suivante.

OSTÉOSARCOME

Description de l'ostéosarcome

Définition et caractéristiques

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes, qui touche 100 à 150 nouvelles personnes en France chaque année, dont les $\frac{3}{4}$ sont des adolescents de 15 à 19 ans. Il se déclare le plus souvent aux extrémités des os longs et touche préférentiellement l'épaule et le genou (respectivement 15% et 50% des tumeurs ; source : infosarcomes.org).

L'ostéosarcome est composé de cellules d'origine et d'aspect mésenchymateux capables de produire de l'os ou une matrice osseuse non minéralisée (matrice ostéoïde ; figure 12A). En effet, il dériverait de la transformation maligne d'un précurseur de cellule formatrice d'os, l'ostéoblaste. En plus des zones ostéoblastiques détectées dans 50% des tumeurs, l'ostéosarcome peut présenter des zones d'aspect fibroblastique (figure 12B) ou chondrocytaire (figure 12C).

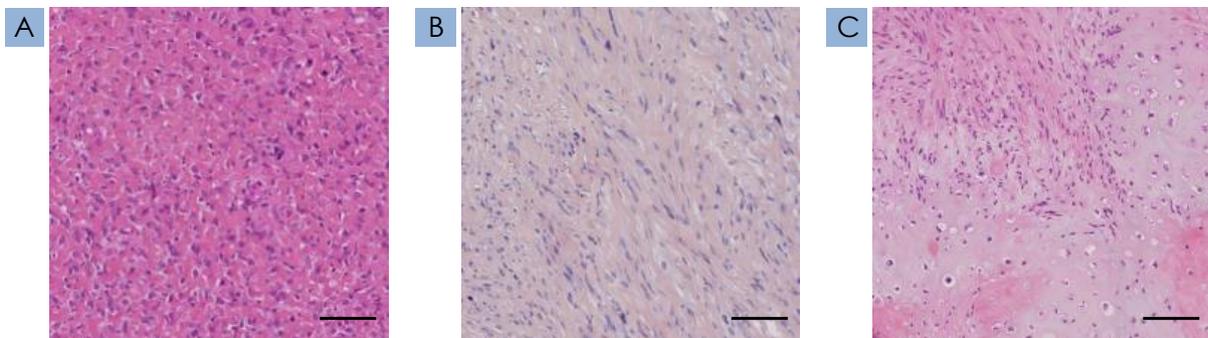


Figure 12 : Hétérogénéité des zones cellulaires dans l'ostéosarcome.

Images de coloration H&E sur des coupes d'ostéosarcome réalisées au laboratoire. Barre : 100 μm . A- zone ostéoblastique. B- zone fibroblastique. C- zone chondrocytaire.

Trois groupes sont distingués selon leur localisation sur la pièce osseuse :

- l'ostéosarcome intra-cortical est le plus rare (0,2%) des ostéosarcomes. La tumeur se développe dans l'os, incluse dans un épaissement cortical et formant une lacune ovoïde visible en radiographie (figure 13A, flèche). En histologie, les cellules sont polygonales au sein d'une matrice ostéoïde d'aspect trabéculaire (figure 13B, flèches).

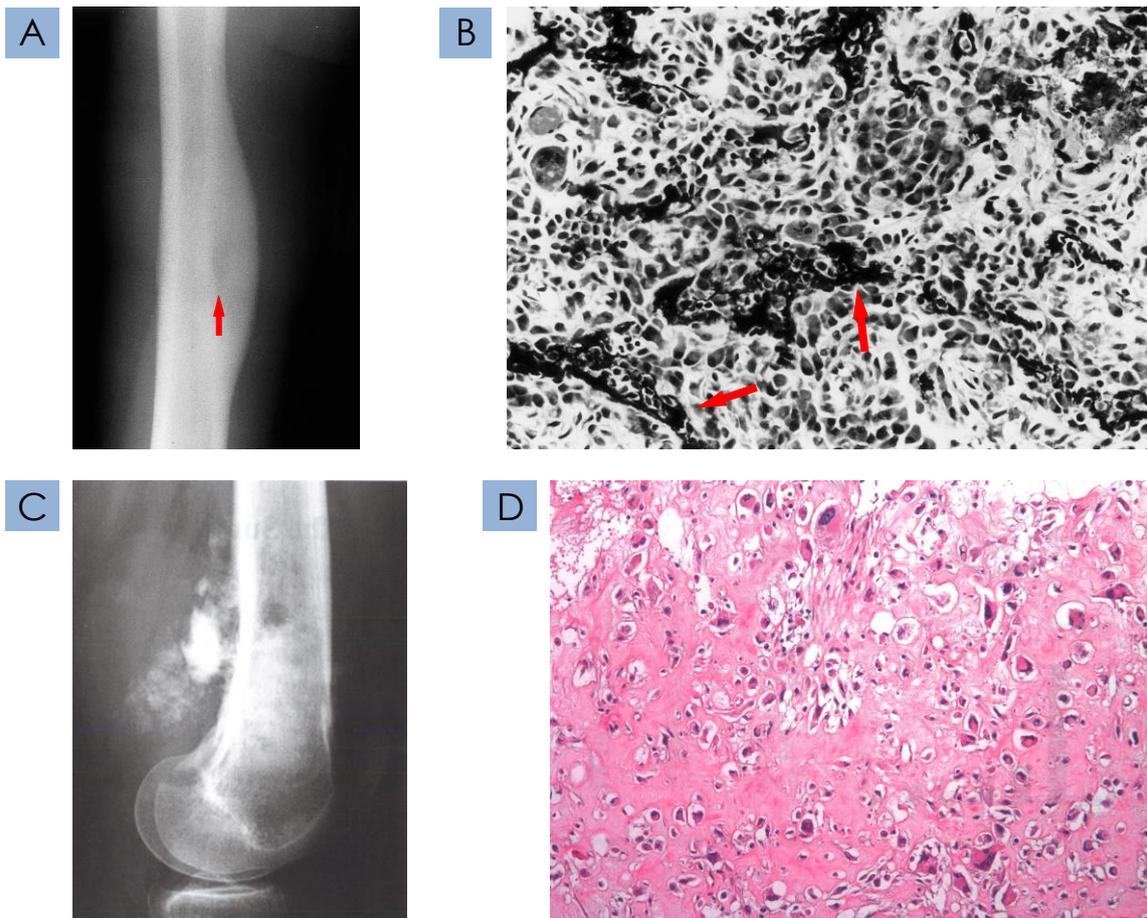


Figure 13 : Ostéosarcomes non centraux.

Ostéosarcome intra-cortical. A- Radiographie latérale de la diaphyse d'un fémur. B- Coloration H&E sur une coupe d'ostéosarcome intra-cortical. Extraits de Griffith et al., 1998.

Ostéosarcome de surface. C- Radiographie latérale de l'extrémité distale d'un fémur. D- Coloration H&E sur une coupe d'ostéosarcome surfacique de haut-grade. Extraits de Picci et al., 2014.

- l'ostéosarcome de surface (9 à 10%) qui se développe hors du périoste et qui est généralement de bon pronostic. Observée aux rayons X, la tumeur forme de l'os, principalement développé dans les tissus mous en partant du cortex fémoral partiellement lysé (figure 13C). En histologie, Les cellules sont principalement d'aspect ostéoblastique (figure 13D).

- l'ostéosarcome central, le plus fréquent, qui présente différentes variantes histologiques (zones d'aspect fibroblastique ou cartilagineux) et qui s'avère souvent de haute malignité (Picci et al., 2014).

Parmi les variantes d'ostéosarcomes centraux, sont distingués :

- l'ostéosarcome commun, le plus fréquent (75% des ostéosarcomes), principalement ostéoblastique, il présente souvent des formations ostéoïdes. Sur une radiographie, la masse tumorale est hétérogène, avec des zones de formation et de dégradation osseuse (figure 14A). En histologie (figure 14B), la tumeur présente des cellules sarcomateuses en prolifération (1) au sein d'une matrice ostéoïde totalement anarchique (2) et au contact de nombreux vaisseaux sanguins (3).

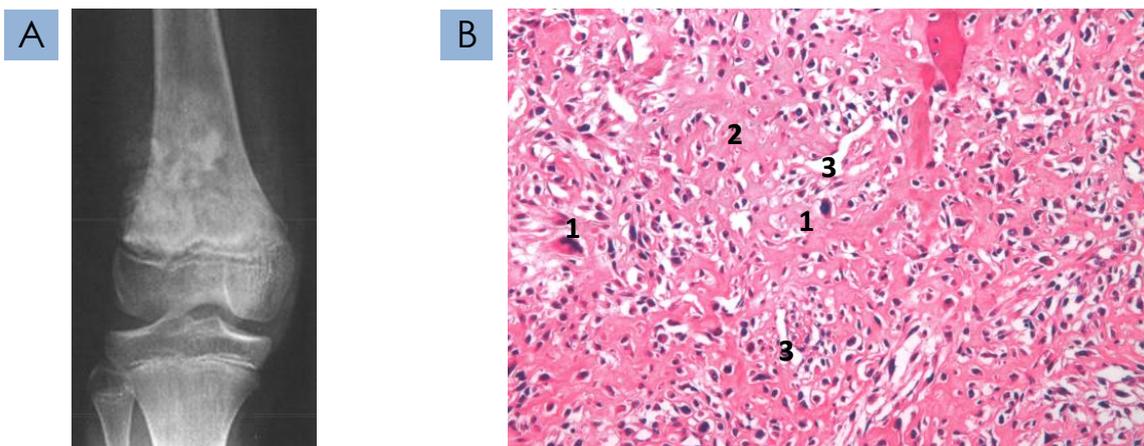


Figure 14 : Ostéosarcome commun.

A- Radiographie antérieure du genou. La tumeur est s'est développée sur la métaphyse fémorale. B- Coloration H&E d'un ostéosarcome commun. Extraits de Picci et al., 2014.

- l'ostéosarcome télangiectasique, moins fréquent (6% des ostéosarcomes), est caractérisé par des lacunes hémorragiques fréquemment associées à une expansion rapide et à des zones de dégradation osseuse (zones ostéolytiques) facilement observables aux rayons X (figure 15A). En histologie, les cellules en prolifération forment une fine matrice ostéoïde et bordent directement de larges cavités remplies de sang (figure 15B).

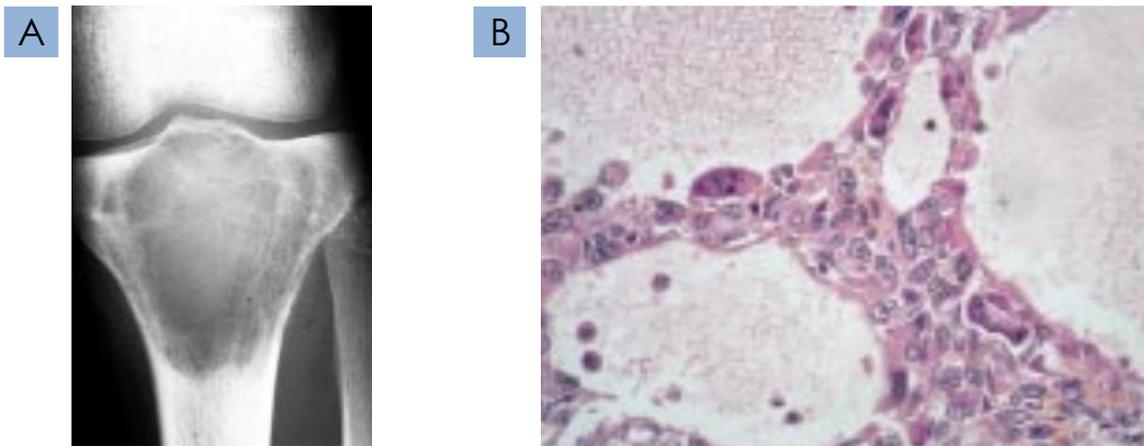


Figure 15 : Ostéosarcome télangiectasique.

A- Radiographie antérieure du genou mettant en évidence une lésion purement lytique de l'extrémité supérieure du tibia. B- Coloration HES de la tumeur. Extraits de Guinebretiere et al., 2001.

- encore moins fréquent, l'ostéosarcome à petites cellules représente 1 à 2% des ostéosarcomes. Il se compose de petites cellules semblables à celles retrouvées dans un sarcome d'Ewing, mais qui sont capables de produire une matrice osseuse.
- l'ostéosarcome intra-médullaire différencié est caractérisé par un aspect histologique bien différencié, présentant des zones de formation ostéoïdes distinctes. Peu agressif (bas-grade), il n'envahit pas -ou très rarement- les parties molles.

Dans 15 à 20 % des cas d'ostéosarcome, des métastases, au tropisme essentiellement pulmonaire, sont détectées au moment du diagnostic (Miller et al., 2013).

Caractérisation génétique des ostéosarcomes

Quatre-vingt-dix pour cent des ostéosarcomes sont dits de haut-grade. En effet, ces tumeurs plus agressives ont un caryotype anormal et instable, caractérisé par de nombreuses aberrations chromosomiques, comportant de nombreuses pertes et de nombreux gains de fragments d'ADN (figure 16A ; Man et al., 2004).

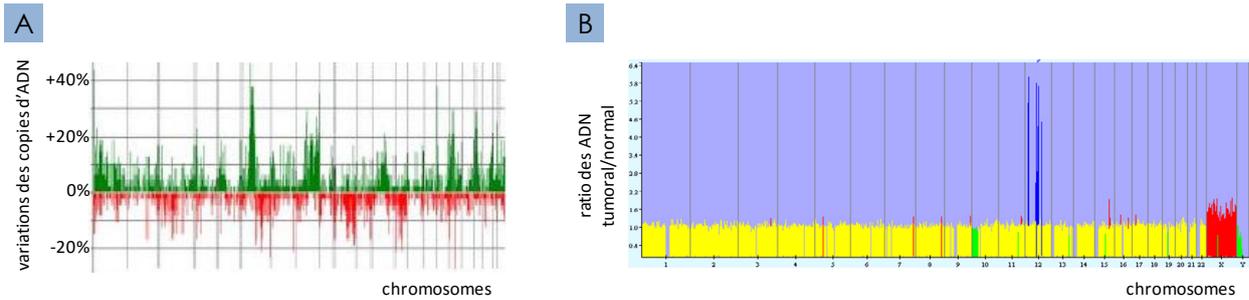


Figure 16 : Observation du génome des ostéosarcomes de haut et bas-grade.

Comparaisons génomiques par hybridation (Comparative Genomic Hybridization array ; aCGH) réalisés sur des ostéosarcomes de haut-grade (A) et de bas-grade (B). A- Comparaison du génome de 48 cas d'ostéosarcomes de haut-grade. Vert : régions amplifiées ; rouge : régions déplétées. Extrait de Man et al., 2004. B- Amplification du fragment q13–15 du chromosome 12 dans 42 cas d'ostéosarcomes de bas-grade. Ce fragment contient notamment les gènes codants pour les protéines cyclin-dépendent kinase 4 (CDK4) et murine double-minute type 2 (MDM2). Jaune : régions variables ; bleu : régions amplifiées ; rouge : régions déplétées. Extrait de Dujardin et al., 2011.

A l'inverse, les ostéosarcomes de bas-grade, qui sont plus rares (< 6% des ostéosarcomes), ont montré une amplification spécifique des gènes *MDM2* (murine double-minute type 2) et *CDK4* (cyclin-dépendent kinase 4) portés par le chromosome 12 (figure 16B ; Dujardin et al., 2011). Or, ces anomalies sont également retrouvées dans des liposarcomes différenciés et dédifférenciés (Yoshida et al., 2010). De manière intéressante, ces liposarcomes dédifférenciés comprenaient une zone ostéoïde occupant 5 à 50% du volume tumoral total et dont les cellules comportaient également l'altération génétique sur *MDM2* et *CDK4*. Ces observations indiquent que l'ostéosarcome de bas-grade et le liposarcome pourraient provenir d'un seul type de cellules progénitrices dont le niveau de différenciation vers le lignage ostéoblastique ou adipocytaire dépendrait du microenvironnement.

Traitement actuel

La prise en charge de l'ostéosarcome est basée sur la résection chirurgicale associée depuis les années 1970 à l'utilisation de la chimiothérapie. Initialement utilisée en postopératoire (adjuvante) dès 1971, la chimiothérapie a été appliquée avant la résection tumorale (néo-adjuvante) à partir de 1978. Cette combinaison de traitement permet d'éviter l'amputation du membre touché au profit d'une chirurgie conservatrice dans plus de 80% des cas (Allison et al., 2012).

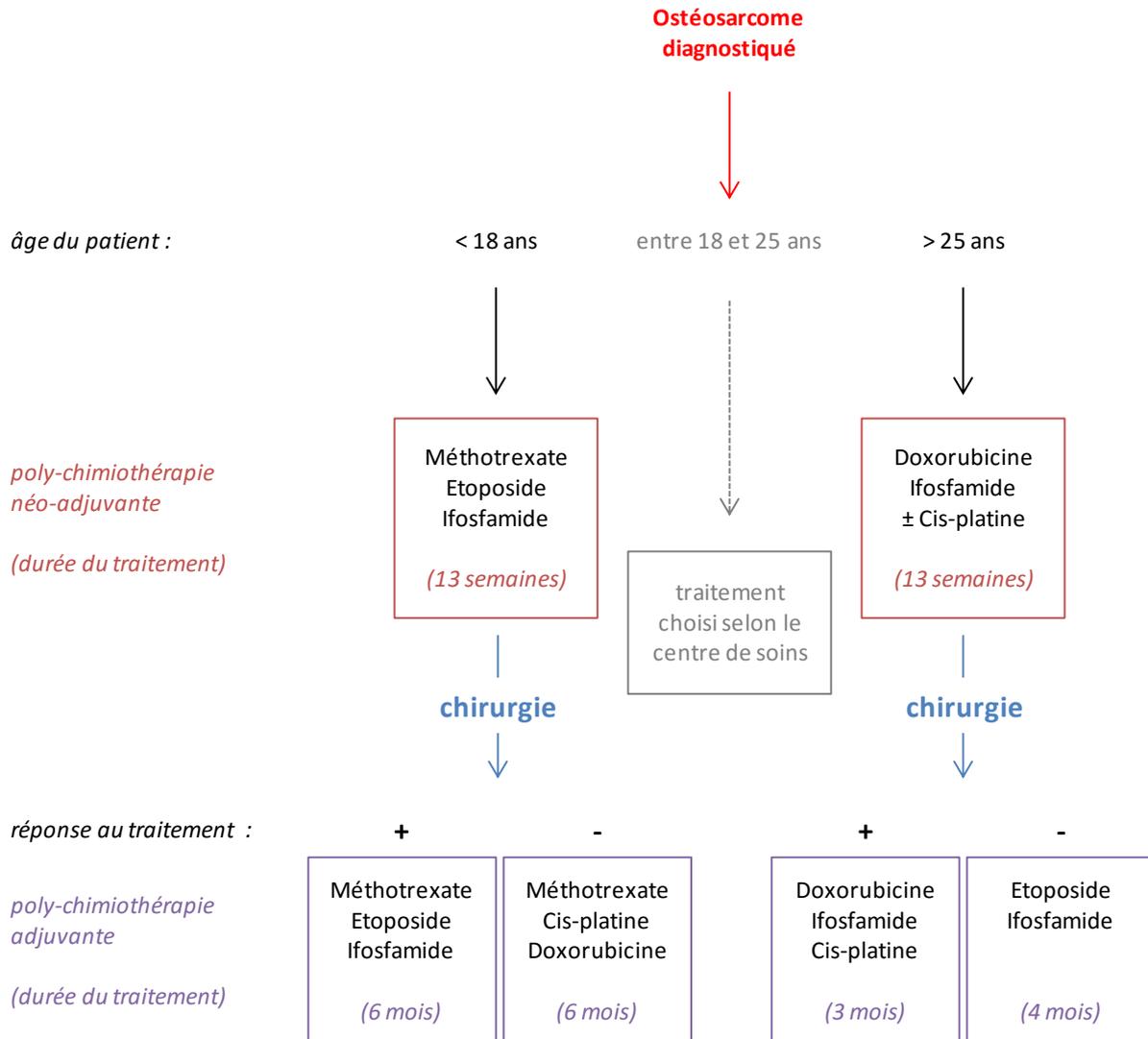


Figure 17 : Schéma de la prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome en France.

+ = bonne réponse au traitement : cellules tumorales résiduelles < 10% ; - = mauvaise réponse au traitement : cellules tumorales résiduelles > 10%, ou patient non opérable, ou métastases.

Une poly-chimiothérapie néo-adjuvante est appliquée dès le diagnostic de la tumeur pendant environ 3 mois jusqu'à la procédure de résection chirurgicale de la tumeur. Celle-ci est alors analysée par histologie pour évaluer son taux de nécrose et définir la stratégie de poly-chimiothérapie adjuvante qui sera appliquée pendant 4 à 6 mois. Une bonne réponse de la tumeur au traitement est évaluée à au moins 90% de cellules nécrotiques. Dans le cas d'une bonne réponse de la tumeur au premier traitement, la chimiothérapie adjuvante est souvent composée des mêmes molécules utilisées lors de la chimiothérapie néo-adjuvante. Si la tumeur est dans la catégorie des mauvaises répondeuses, le traitement sera adapté, modifié, renforcé ou rallongé (figure 17).

Actuellement, les molécules montrant le plus d'efficacité dans le traitement des tumeurs osseuses ciblent en particulier des cellules à haut taux de prolifération en bloquant notamment la phase de réplication de l'ADN indispensable à la progression du cycle cellulaire :

- le cisplatine, provoque un changement de la conformation locale de l'ADN double brin en se fixant sur les bases puriques (Adénine et Guanine). Il bloque ainsi la réplication et la transcription de l'ADN.
- la doxorubicine, agent intercalant capable de se lier à l'enzyme topo-isomérase II. Elle inhibe la synthèse d'ARN.
- l'étoposide inhibe de manière irréversible la protéine cdc2, responsable du passage en mitose, et la formation des microtubules qui réalisent le fuseau mitotique cellulaire.
- l'ifosfamide génère des ions éthylène-iminium capables de bloquer la synthèse d'ADN.
- le méthotrexate est un inhibiteur de l'enzyme dihydrofolate réductase. Il entraîne un blocage de la synthèse des bases puriques (Adénine et Guanine) et de la Thymine.

Lorsque la prise en charge de l'ostéosarcome se résumait à la chirurgie, le taux de survie à 5 ans des patients était inférieur à 15%. Grâce à la poly-chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante, ce taux de survie est passé à 60% voire 70% (Allison et al., 2012). Cependant, la détection de métastases lors du diagnostic est associée à un taux de survie à 5 ans inférieur à 30% en dépit des traitements de poly-chimiothérapie (Allison et al., 2012).

Le traitement associant poly-chimiothérapie et chirurgie conservatrice représente un réel progrès vis-à-vis de l'amputation systématique, puisque le taux de survie à 5 ans a été considérablement augmenté, mais aussi puisque le taux de récurrence locale (survenue d'un second ostéosarcome sur le site primaire) est de 5% chez les patients non amputés, contre 2 à 3% chez les sujets amputés (Picci et al., 2014). La bonne réponse au traitement combinant poly-chimiothérapie et chirurgie conservatrice constitue un bon facteur pronostique d'absence de récurrence locale dans

l'ostéosarcome de haut-grade (Bacci et al., 2000; Bielack et al., 2002). Ces récurrences se produisent le plus souvent dans les 4 ans après la fin du traitement, et moins de 5% des récurrences sont tardives (> 5ans ; Ferrari et al., 2006). Dans le cas de récurrences tardives, même une tumeur répondant mal au traitement ne constitue pas un mauvais pronostic (Ferrari et al., 2006; Kim et al., 2007).

Cas clinique : récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome suite à une GTA

Les événements relatés ci-après ont été rapportés par Pierre Perrot en 2010 (Perrot et al., 2010).

Une patiente de 17 ans a été admise en 1994 dans le service de chirurgie orthopédique et traumatologique du CHU de Nantes pour une tumeur osseuse de l'humérus proximal gauche. Une biopsie de la tumeur et des examens cliniques et radiologiques ont permis d'identifier la tumeur comme étant un ostéosarcome télangiectasique (figure 18A). Une série de 4 cures de poly-chimiothérapie néo-adjuvante a été appliquée ; le protocole thérapeutique français indiquait à l'époque l'utilisation d'ifosfamide associé à du cis-platine. La tumeur a ensuite été réséquée par chirurgie avec conservation de l'articulation gléno-humérale. Les analyses histologiques réalisées ont conclu à une résection tumorale complète (marges de l'exérèse saines) ainsi qu'à une bonne réponse de la tumeur au traitement (0% de cellules viables). La patiente a alors pu recevoir 2 nouvelles cures semblables de poly-chimiothérapie adjuvante et a été suivie par des examens réguliers pendant 10 ans (examens cliniques et IRM et radiographies du thorax tous les 6 mois les 5 premières années puis tous les ans) sans montrer de signe de récurrence.

En 2005, la patiente est prise en charge par le service de chirurgie plastique et reconstructrice du CHU de Nantes afin de corriger le défaut fissulaire laissé par le traitement de sa tumeur et des douleurs au niveau de sa cicatrice (figure 18B). La jeune femme a alors reçu des injections de tissu adipeux (TA) autologue en 3 temps (mars et juin 2005, puis janvier 2006). La Greffe de Tissu Adipeux (GTA) fut un succès

sur le plan fonctionnel et esthétique puisque l'épaule et le bras ont été regalbés et les douleurs au niveau de la cicatrice ont disparu.

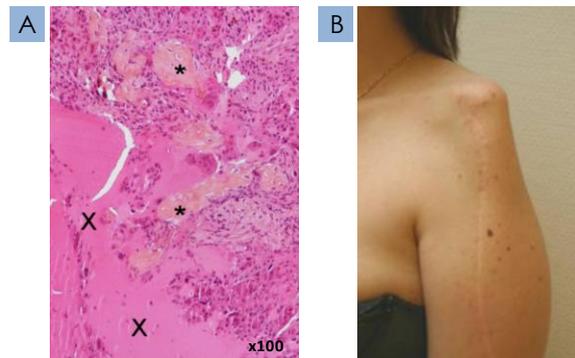


Figure 18 : Diagnostic et traitement d'un ostéosarcome télangiectasique.

A- Coloration HES sur une coupe de tumeur montrant des cellules tumorales au contact de de matrice ostéoïde (*) et d'espace télangiectasique contenant du sang (X). B- Aspect du bras gauche 10 ans après la fin du traitement. Extrait de Perrot et al., 2010.

En août 2007, la patiente a consulté son oncologue pour des douleurs au bras gauche associées à un gonflement et une inflammation du membre (figure 19A). L'imagerie par Résonance Magnétique a révélé une masse tumorale hétérogène extensive de 10 sur 12 cm sous-cutanée en regard de la zone ayant reçu la Greffe de Tissu Adipeux (GTA). Des analyses histologiques ont confirmé la présence d'un ostéosarcome contenant des cellules en prolifération parmi une substance ostéoïde (figure 19B).

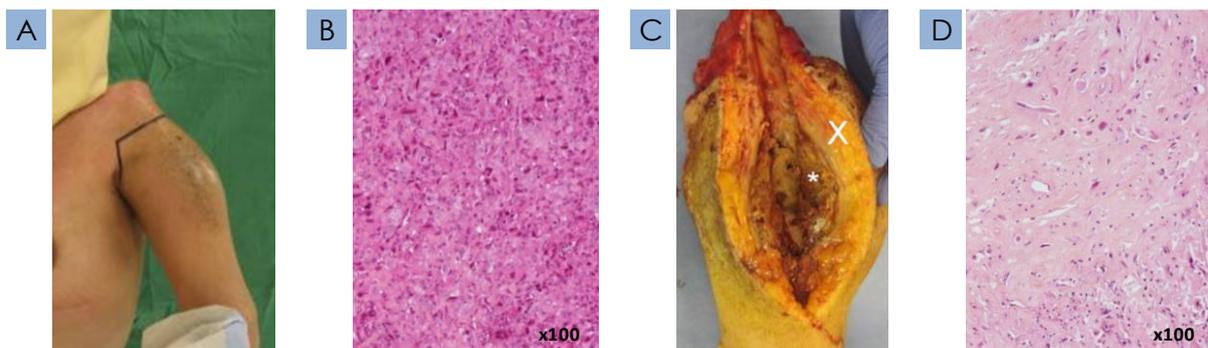


Figure 19 : Récidive tumorale sur le site de GTA.

A- Aspect du bras gauche avant amputation, après GTA et chimiothérapie. B- Coloration HES sur une coupe de biopsie tumorale montrant des cellules malignes associées à une fine matrice ostéoïde. C- Image de la pièce de résection ouverte montrant la masse tumorale (*) autour de l'humérus gauche et le greffon de TA en périphérie (X). D- Coloration HES sur une coupe de tumeur après résection montrant des cellules nécrosées associées à une zone hémorragique indiquant un ostéosarcome de type télangiectasique. Extrait de Perrot et al., 2010.

La patiente a alors reçu une nouvelle série de cures de poly-chimiothérapie néo-adjuvante (doxorubicine et ifosfamide) avant que la tumeur ne soit enlevée par désarticulation trans-scapulaire. L'analyse de la tumeur indiquait une bonne réponse au traitement avec une importante nécrose associée à la présence de zones hémorragiques permettant de diagnostiquer un ostéosarcome télangiectasique et suggérant la récurrence locale de l'ostéosarcome initial. Cependant, la chimiothérapie adjuvante ne sera pas appliquée devant l'insuffisance rénale sévère occasionnée par la précédente cure.

La patiente n'a depuis par présenté de signe de récurrence locale ou à distance.

La récurrence locale tardive d'un ostéosarcome était tout-à-fait inattendue. En effet, il s'agissait d'un ostéosarcome télangiectasique ayant bien répondu au traitement, ce qui était de bon pronostic. Une récurrence aussi tardive (plus de 10 ans) n'avait presque jamais été décrite jusqu'alors, à l'exception d'un cas rapporté en 2000 par une équipe italienne (Bacci et al., 2000). La survenue d'une récurrence d'ostéosarcome au niveau du site ayant reçu une GTA réalisée 18 mois plus tôt a soulevé la question du mécanisme de récurrence tumorale et de l'implication du TA dans cet événement.

Cellules Souches Cancéreuses

Modèles de développement tumoral et rôle des CSC

Pour expliquer l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur, deux modèles de développement tumoral ont été proposés successivement.

Le premier modèle à avoir été décrit repose sur un modèle stochastique d'accumulation de mutations sur les proto-oncogènes ou sur les gènes suppresseurs de tumeurs par les cellules tumorales. Ce modèle de développement est aussi dit clonal car il aboutit à l'établissement de plusieurs clones de cellules qui contribuent tous plus ou moins au volume de la tumeur et à son hétérogénéité. Parmi ces clones, certains plus agressifs et résistants peuvent apparaître et former majoritairement la masse tumorale (figure 20A).

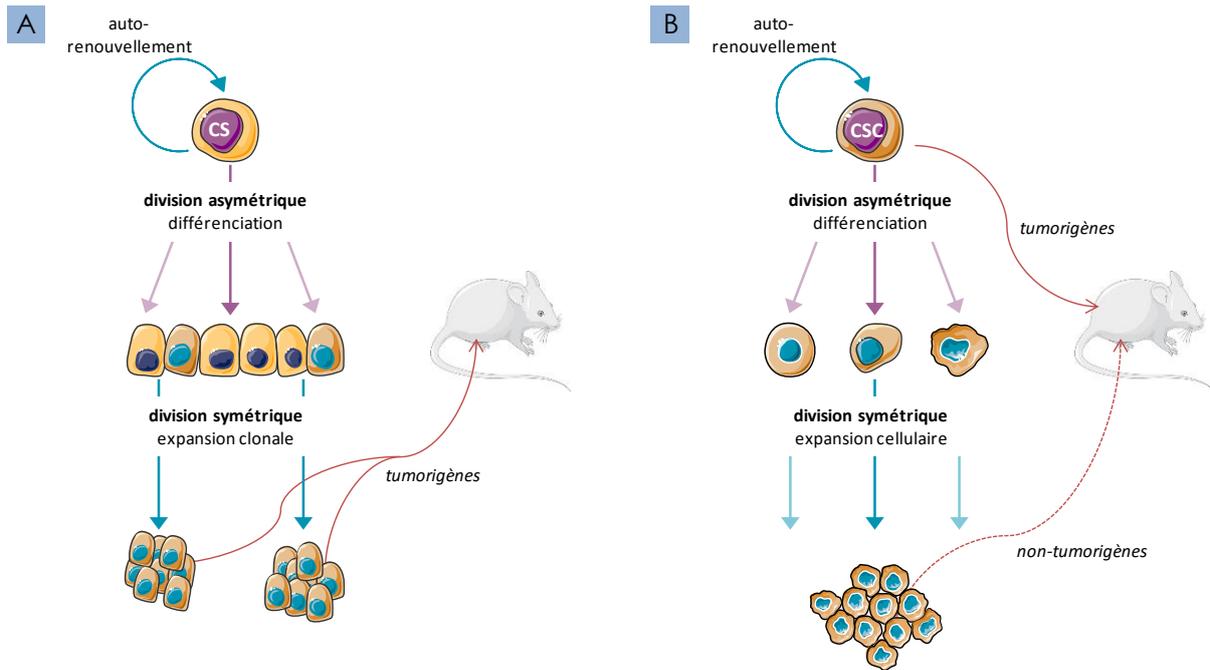


Figure 20 : Schémas des théories sur le développement tumoral.

A- Développement clonal. Les différents clones accumulent des mutations de manière stochastique et sont tous capables d'induire une nouvelle tumeur chez la souris. CS = Cellule Souche normale. B- Développement hiérarchique. Des populations de cellules malignes se développent à partir d'une CSC, cependant elles ne peuvent pas former une tumeur à elles seules chez la souris. Seules les CSC sont capables de reformer la tumeur initiale dans sa complexité tissulaire. Adaptés de Trichet, 2015.

Le second modèle développé pour expliquer l'hétérogénéité tumorale est proposé dès 1959 (Makino, 1959). Il décrit un développement tumoral hiérarchique reposant sur la présence de Cellules Souches Cancéreuses (CSC). Ces CSC seraient capables de réaliser une division cellulaire asymétrique afin de fournir des contingents de cellules tumorales différenciées. Seules des CSC pourraient donc générer une nouvelle tumeur aussi complexe que la tumeur initiale, tandis que les cellules malignes qui forment majoritairement la masse tumorale ne peuvent donner naissance à une nouvelle tumeur (figure 20B).

Ces 2 modèles de développement tumoral peuvent être compatibles selon le type de tumeur (Shackleton et al., 2009).

Les premières CSC ont été isolées en 1994 à partir d'une leucémie myéloïde aigüe (Lapidot et al., 1994), grâce à leurs marqueurs de surface. En effet, une rare sous-population de cellules tumorales ($CD34^+$, $CD38^-$) présentait des caractéristiques d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation similaires aux cellules

souches hématopoïétiques. De plus, un petit nombre de ces cellules CD34⁺/CD38⁻ induisaient l'apparition d'une nouvelle leucémie lorsqu'elles étaient transplantées chez la souris nude irradiée. À l'inverse, le même nombre de cellules CD38⁺ n'étaient pas capables de générer une nouvelle tumeur.

Le modèle de développement tumoral hiérarchique a été transposé aux tumeurs solides et des CSC ont pu être isolées à partir de différentes tumeurs solides, carcinomes et sarcomes.

Propriétés des CSC

Les CSC sont caractérisées selon quatre propriétés : l'auto-renouvellement, la multipotence, la résistance aux drogues et la tumorigénicité. Ces propriétés peuvent être à la base de techniques d'isolement des CSC.

Auto-renouvellement

Les CSC, comme les cellules souches non-tumorales, ont une capacité d'auto-renouvellement à long terme. Cette capacité peut être mise en évidence dans des tests de clonogénicité à partir de cellules seules cultivées en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance.

Maintien du potentiel multipotent

Les CSC présentent un phénotype indifférencié caractérisé par l'expression de gènes de cellules souches embryonnaires que sont notamment *POU5F1* (POU domain, class 5, transcription factor 1), *SOX2* (Sex determining region Y-box 2) et *NANOG* (nom tiré de la légende gaélique irlandaise Tír na nÓg, la Terre de l'éternelle jeunesse ; The University Of Edinburgh, 2009) qui codent pour des facteurs de transcription responsables du maintien du caractère souche. La surexpression de certains de ces gènes dans des cellules différenciées suffit à les dédifférencier en cellules souches pluripotentes induites (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC ; Takahashi and Yamanaka, 2006).

De plus, de part leur phénotype indifférencié, les CSC expriment des marqueurs de surface identifiés dans des cellules progénitrices, comme les clusters de différenciation (CD) CD34 caractéristique du lignage hématopoïétique) ou CD133 caractéristique des lignages hématopoïétique, endothélial ou neural (Ma and Allan, 2011). Par exemple, la protéine CD133 s'est révélée utile pour la détection en cytométrie en flux de CSC dans de nombreux types de cancers : colon (Huang et al., 2009; Lugli et al., 2010), prostate (Vander Griend et al., 2008; Miki et al., 2007), ovaire (Curley et al., 2009) ou encore poumon (Bertolini et al., 2009; Tirino et al., 2009).

Un phénotype indifférencié peut être corrélé à un potentiel de multipotence, comme par exemple pour des cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui sont capables de se différencier en culture *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. Ainsi, la différenciation de cellules tumorales par la culture en milieu inducteur spécifique est un moyen de vérifier le potentiel de différenciation de CSC isolées, et donc de vérifier leur multipotence.

Résistance aux drogues

Les CSC sont caractérisées par leur résistance aux drogues, notamment aux molécules employées en chimiothérapie. La résistance est corrélée à l'activité de pompes à efflux de molécules toxiques, qui peut être observée en cytométrie en flux, à l'aide de colorants de l'ADN qui sont excrétés uniquement par les CSC identifiant alors une sous-population de cellules non-marquées par le colorant (side-population). Les CSC expriment également l'enzyme Aldéhyde DéHydrogénase (ALDH ; Ma and Allan, 2011) ; elles peuvent alors être identifiées par cytométrie en flux grâce à l'Adléfluor, métabolisé par l'ALDH en substrat fluorescent (Hess et al., 2004).

Tumorigénicité

L'injection d'un petit nombre de CSC (100 à 1000) chez la souris immuno-déficiente permet la formation d'une masse tumorale, présentant les hétérogénéités d'une tumeur primaire. Cette technique est la référence pour confirmer l'identification de CSC, tandis que le test de la clonogénicité, le tri cellulaire sur la base de marqueurs

de surface et sur la capacité à exclure ou métaboliser une drogue sont utilisées pour isoler des potentielles CSC au sein d'une tumeur.

Cellules souche dans l'ostéosarcome

Origine des ostéosarcomes : rôle des CSM

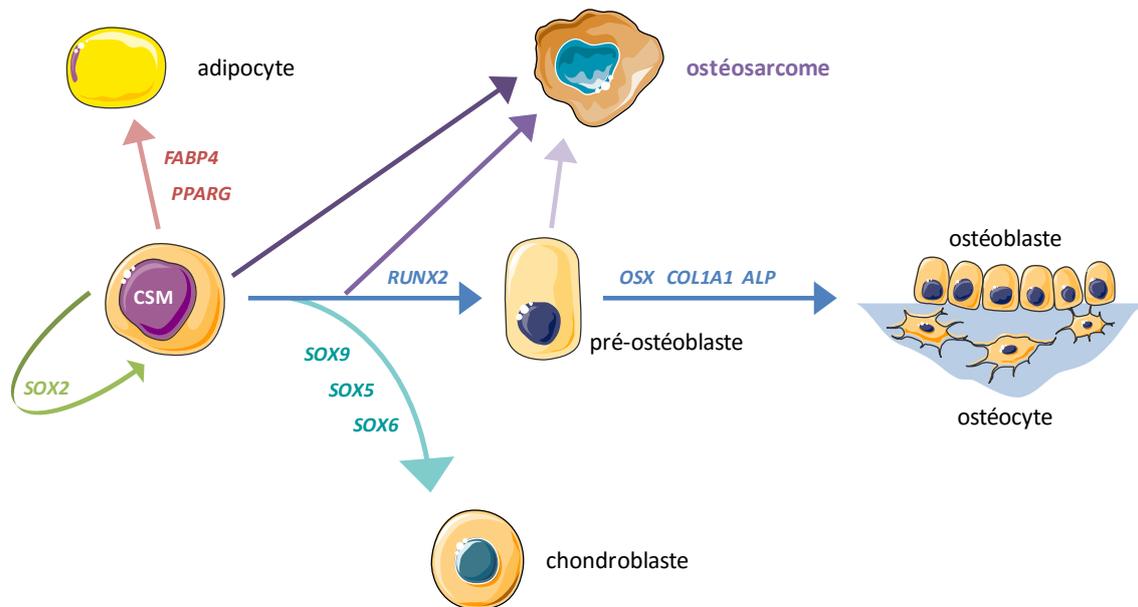


Figure 21 : Schéma de la différenciation des CSM.

Le gène *SOX2* figuré en vert est un marqueur de l'auto-renouvellement des CSM. Les gènes figurés en rouge, bleu et turquoise représentent des marqueurs de différenciation adipocytaire, ostéogénique et chondrocytaire, respectivement. L'ostéosarcome est probablement issu de CSM en voie de différenciation ostéoblastique. Adapté de Basu-Roy et al., 2013 et Xiao et al., 2013.

Les cellules tumorales d'un ostéosarcome sont d'origine mésenchymateuses et seraient issues de la transformation maligne d'une Cellule Souche Mésenchymateuse (CSM) lors de sa différenciation en ostéoblaste (figure 21). Cette origine expliquerait la capacité des cellules tumorales à former une matrice ostéoïde, mais également la présence de zones fibroblastiques ou même cartilagineuses au sein d'un seul ostéosarcome (figure 12).

Les CSM sont retrouvées principalement dans la moelle osseuse et dans le tissu adipeux, mais à des ratios différents allant de 0,001 à 0,01% des cellules totales de la moelle osseuse et de 1 à 2% des cellules totales du tissu adipeux (Strem et al., 2005).

La Société Internationale de Thérapie Cellulaire a proposé en 2006 un ensemble de critères minimaux de définition d'une CSM (Dominici et al., 2006).

Pour être qualifiées de CSM, les cellules doivent premièrement adhérer au plastique lorsqu'elles sont cultivées en conditions standards.

De plus, les CSM doivent être caractérisées par l'expression d'un ensemble de marqueurs membranaires, CD73 (enzyme extracellulaire convertissant l'AMP en Adénine), CD90 (également un marqueur de certaines cellules hématopoïétiques) et CD105 (protéine impliquée dans l'angiogenèse). A l'inverse, les CSM n'expriment pas d'autres protéines, principalement des marqueurs de cellules hématopoïétiques plus ou moins différenciées, notamment CD34 (marqueur de précocité des cellules médullaires) et CD45 (marqueur leucocytaire).

Enfin, les CSM doivent démontrer *in vitro* leur pouvoir de différenciation en adipocytes (figure 22A), en chondrocyte (figure 22B) et en ostéoblaste (figure 22C).

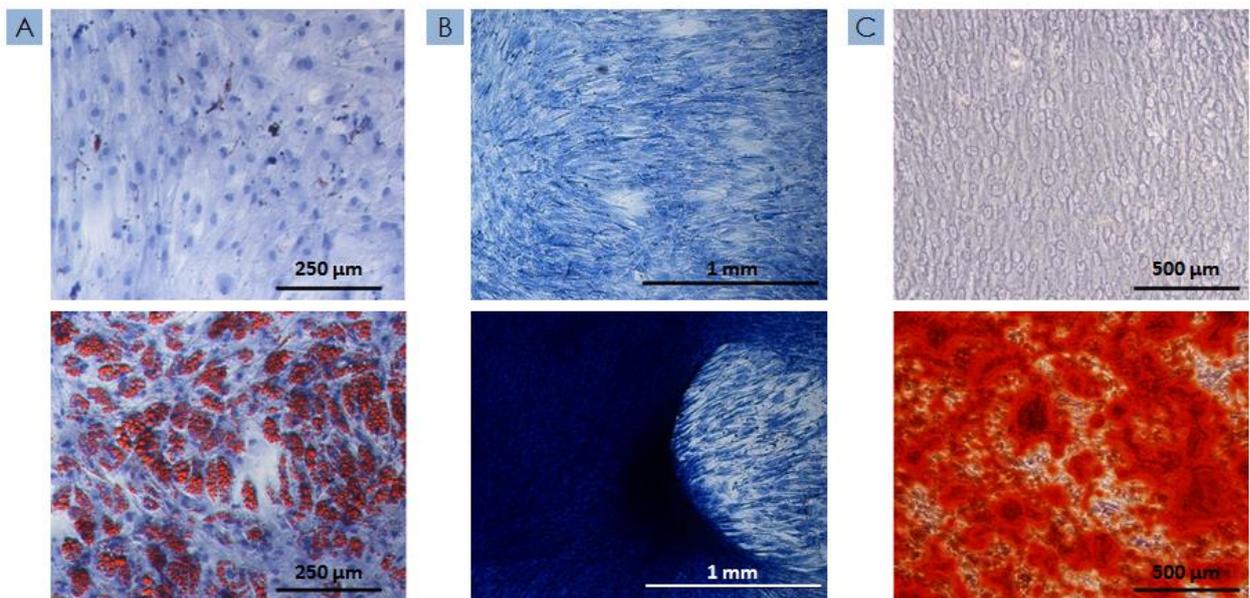


Figure 22 : Observation du potentiel de différenciation des CSM.

Images de confirmation de la différenciation cellulaire adipocytaire (A, coloration Oil Red O et contre-coloration hématoxyline), chondrocytaire (B, coloration bleu alcian) et ostéoblastique (C, coloration rouge alizarine). Les CSM ont préalablement été cultivées en milieu standard (haut) ou inducteur de la différenciation de chacun des trois lignages (bas). Extrait de Brennan et al., 2014.

CSC dans l'ostéosarcome

La recherche des CSC dans l'ostéosarcome s'est focalisée sur les tumeurs de haut-grade, caractérisées par leur hétérogénéité. En effet, la matrice ostéoïde d'origine tumorale peut être associée avec des zones d'aspect fibroblastique ou cartilagineux (figure 12). Dans les tissus sains, les ostéoblastes responsables de la formation osseuse, les chondrocytes et les fibroblastes dérivent tous des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Dans les ostéosarcomes, les cellules tumorales présentant un aspect ostéoblastique, chondrocytaire ou fibroblastique pourraient donc toutes dériver du même type de cellules. Les CSC à l'origine des ostéosarcomes partageraient des caractéristiques communes avec les CSM (Basu-Roy et al., 2013).

La première étude à identifier des CSC dans les tumeurs osseuses primitives a été publiée en 2005. Des CSC ont pu être isolées à partir de biopsies par leur propriété à former des sphères en conditions de perte de d'adhérence, créée par du milieu semi-solide sans facteurs de croissance et avec des plaques de culture ne permettant pas l'adhérence cellulaire (figure 23 ; Gibbs et al., 2005). Les CSC ainsi obtenues exprimaient fortement les gènes *POU5F1* et *NANOG* ainsi que des marqueurs membranaires de CSM : 30 à 50% des cellules étaient CD105⁺, 75 à 100% étaient CD44⁺, de plus, les CSC étaient capables de se différencier dans les voies adipocytaires et ostéoblastiques.

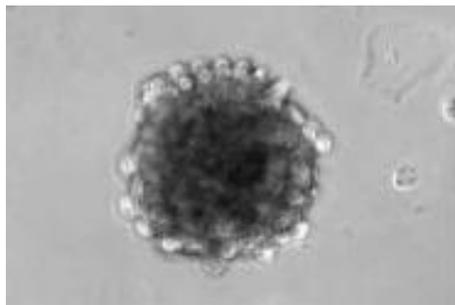


Figure 23 : Cellules d'ostéosarcome en sphères.

Image en microscopie optique de sphères formées par la culture de cellules d'ostéosarcome en conditions clonales et de perte d'adhérence. Extrait de Gibbs et al., 2005.

L'activité de l'enzyme ALDH augmentée des CSC a également permis d'identifier une sous-population de cellules, au sein d'une lignée d'ostéosarcome humain OS99-1, dérivée d'une biopsie. Ces cellules exprimaient fortement les gènes *POU5F1*,

NANOG et SOX2 (Wang et al., 2011). De plus, ces CSC formaient des clones à une plus forte fréquence que la population totale et 100 de ces cellules suffisaient à induire la formation d'une tumeur chez la souris quand le reste des cellules de la lignée n'était pas tumorigène (figure 24).

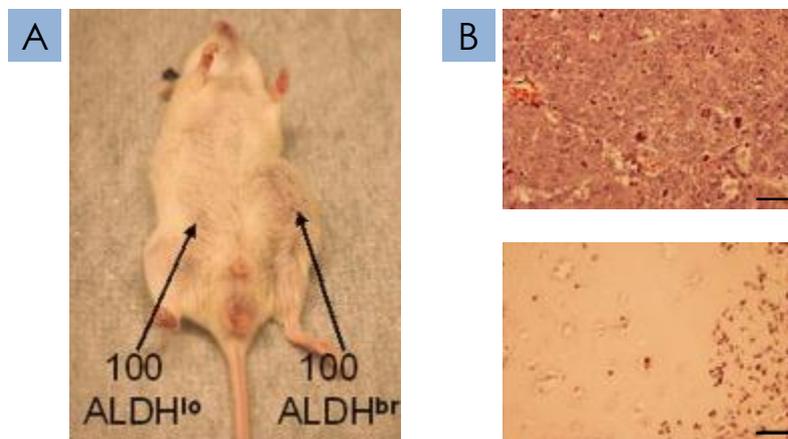


Figure 24 : Évaluation de la tumorigénicité des CSC d'ostéosarcome.

À partir de la lignée d'ostéosarcome humain OS99-1, le niveau d'expression de l'enzyme ALDH a permis de séparer les CSC (ALDH^{br}) des autres cellules tumorales (ALDH^{lo}). A- Souris NOD/SCID ayant reçu deux injections sous-cutanées contralatérales de 100 cellules ALDH^{lo} et ALDH^{br}. Les cellules ALDH^{lo} n'induisaient pas l'apparition d'une masse tumorale comparable aux cellules ALDH^{br}. B- Coloration H&E des tissus au niveau des sites d'injection. La tumeur formée par les cellules ALDH^{br} présente de nombreuses cellules malignes (haut) alors que le site d'injection des cellules ALDH^{lo} ne contient que quelques cellules apoptotiques résiduelles (bas). Échelle : 50 µm. Extrait de Wang et al., 2011.

L'équipe de Tirino a mis en évidence que la sous-population positive pour la détection de la protéine CD133 au sein de 3 lignées humaines d'ostéosarcome (MG-63, Saos-2 et U-2 OS) montrait des caractéristiques de CSC : profil membranaire CD34⁺, CD44⁺, CD90⁺; clonogénicité (Tirino et al., 2008). Plus récemment, à partir de 2 biopsies d'ostéosarcomes humains, Tirino a isolé une sous-population CD133⁺ (< 8% ; Tirino et al., 2011). Cultivées sans adhérence, ces cellules pouvaient former des sphères qui exprimaient de hauts niveaux des gènes *POU5F1*, *NANOG* et *SOX2* par rapport aux mêmes cellules cultivées en conditions d'adhérence. De plus, elles ont démontré leur capacité à se différencier dans les lignages adipocytaire et ostéoblastique. Malgré l'ensemble de ces caractéristiques de CSC, ces cellules CD133⁺ ne formaient pas de tumeurs lorsqu'elles étaient injectées chez la souris immuno-déficiente.

Les études portant sur l'identification de CSC dans l'ostéosarcome ont montré l'existence d'une sous-population de cellules présentant une tumorigénicité et un

auto-renouvellement augmentés par rapport à la population cellulaire totale. Bien que ces observations soient en faveur d'un développement hiérarchique de l'ostéosarcome, aucun marqueur précis commun aux CSC n'a encore été clairement identifié. En revanche, la formation de sphères en culture sans adhérence semble être la propriété la plus fréquente de CSC identifiées jusqu'à présent. Ce mode de culture favoriserait l'acquisition de marqueurs de CSC même au sein de lignées cellulaires établies.

**PARTIE I : EFFET DES FACTEURS
SOLUBLES DU TISSU ADIPEUX SUR LES
CELLULES D'OSTÉOSARCOME**

INTRODUCTION

Greffes de Tissu Adipeux et récurrence tumorale : cas clinique

La Greffe de Tissu Adipeux -GTA- est une technique de chirurgie plastique initialement destinée à la reconstruction de défauts de la face (Coleman, 1995). Cette procédure est considérée comme sans risque puisqu'il s'agit d'un tissu adipeux (TA) autologue (débarassé de ses composantes huileuse et sanguine par filtration ou sédimentation) qui n'est pas mis en culture avant d'être injecté sur le site à reconstruire. La GTA présente cependant des limites, principalement dans l'impossibilité de prévoir le taux de résorption du tissu adipeux greffé (Gir et al., 2012).

Le traitement de l'ostéosarcome nécessite des cures de chimiothérapie combinées à la résection de la tumeur par chirurgie. À l'issue de ce traitement, une rémission complète n'est envisagée qu'après une période sans rechute d'au moins 10 ans. Les progrès de la prise en charge des tumeurs osseuses ont permis aux patients d'éviter l'amputation complète du membre touché. Cependant, la résection chirurgicale de la tumeur laisse des séquelles physiques et esthétiques. Pour ces patients en rémission, des solutions de reconstruction peuvent être proposées afin d'améliorer leur qualité de vie.

En 2010, les services d'orthopédie et de chirurgie plastique du centre Hospitalo-Universitaire de Nantes ont rapporté un cas clinique de récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome (Perrot et al., 2010). Cette récurrence est survenue plus de 10 ans après la fin du traitement anti-tumoral et 18 mois après que la patiente ait reçu une série d'injection de tissu adipeux autologue à visée reconstructrice.

L'incidence de l'ostéosarcome en France demeure faible (110 nouveaux cas par an) et ainsi ne permet pas d'envisager une étude rétrospective comparant les taux de récurrence tumorale d'un groupe de patients ayant reçu une GTA au taux de récurrence de patients n'en ayant pas reçue. Le laboratoire LPRO a alors proposé de mettre en place des études précliniques pour tester l'interaction possible entre TA et ostéosarcome.

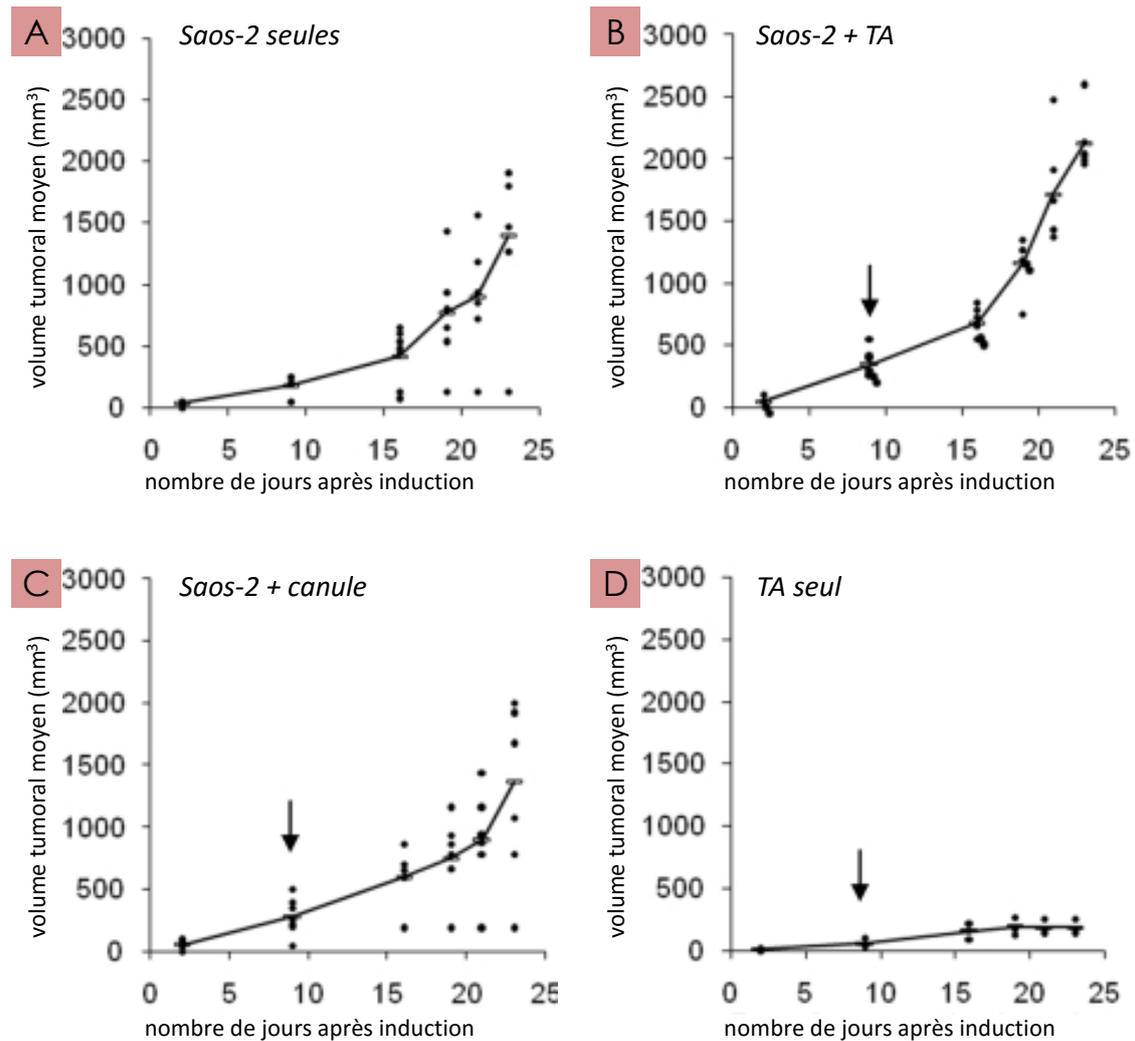


Figure 25 : Suivi temporel du développement d'ostéosarcome induit chez la souris nude.

Les tumeurs ont été induites par transplantation para-tibiale de fragments de tumeurs initialement générées par injection de cellules Saos-2 dans le coussinet d'autres souris. A- Développement de tumeurs non injectées (groupe contrôle). B- Développement de tumeurs ayant reçu une injection de TA. C- Développement de tumeurs après reproduction du geste d'injection avec une canule. D-) Évolution du volume de TA injecté dans des souris sans tumeur. Le temps des injections est indiqué par une flèche. Le volume tumoral moyen est indiqué par une ligne continue, tandis que les mesures individuelles sont identifiées par des points. Extrait de Perrot et al., 2010.

Dans un modèle d'ostéosarcome humain induit par transplantation à partir de cellules tumorales Saos-2 chez la souris immuno-déficiente nude (figure 25A), une seule injection de TA accélérerait le développement tumoral (figure 25B) alors le geste chirurgical d'injection n'influencerait pas la croissance tumorale (figure 25C). De plus le TA injecté seul n'induisait pas la formation d'une masse tumorale (figure 25D). Ces observations ont confirmé que l'effet pro-tumoral du TA sur l'ostéosarcome n'était pas dû à l'inflammation induite par le geste chirurgical et que le TA injecté soutenait la croissance de l'ostéosarcome sans contribuer au volume de la tumeur.

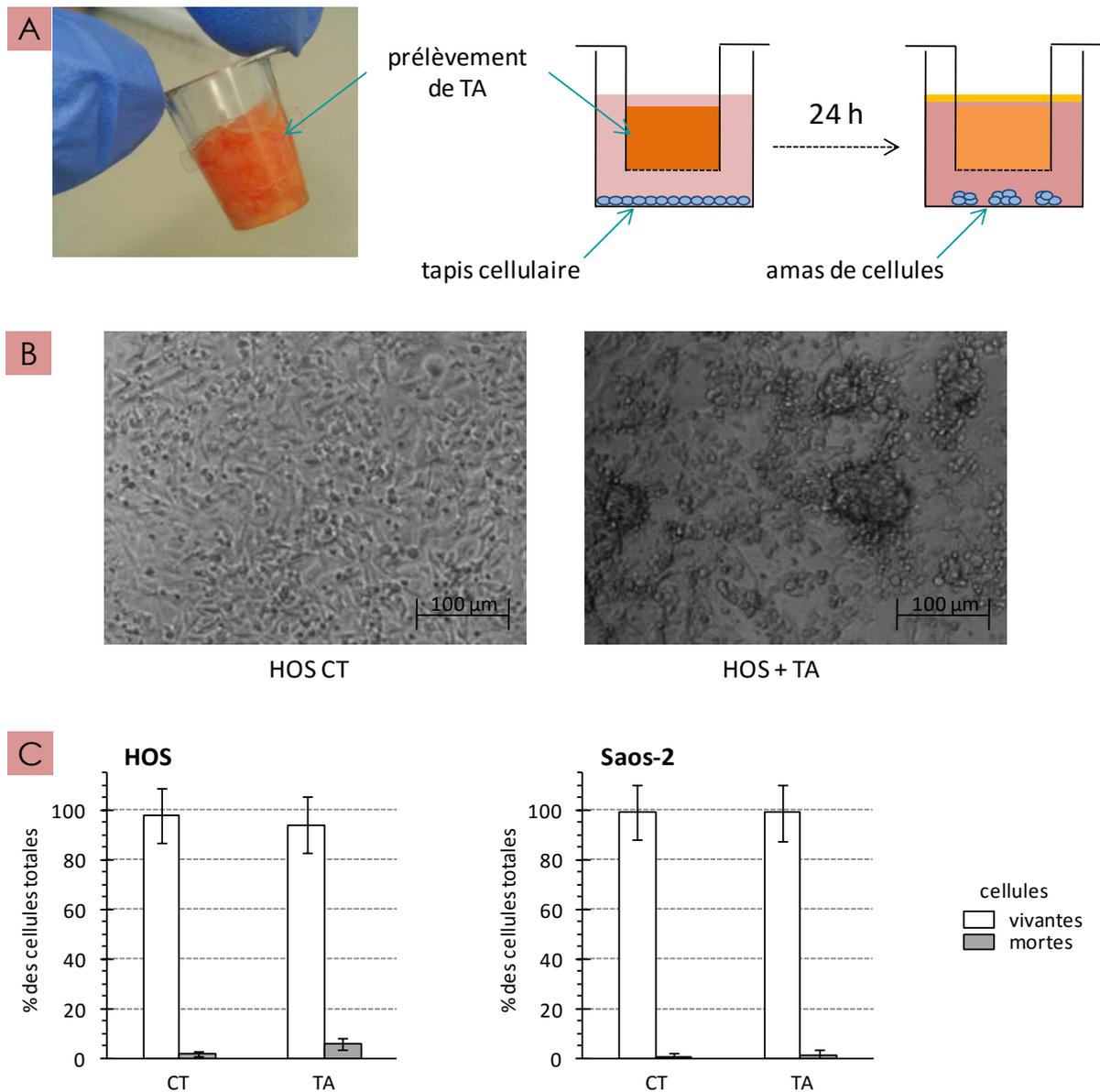


Figure 26 : Culture de cellules d'ostéosarcome en présence d'un prélèvement de TA.

A- Surplus d'un prélèvement de TA destiné à une GTA placé dans des inserts de culture à pores de 3 µm. Schéma du positionnement de l'insert au-dessus de cellules d'ostéosarcome cultivées en conditions d'adhérence. B- Photographies de cellules HOS après 24 h de culture en milieu standard (CT) ou en présence de TA. C- Graphiques représentant la proportion de cellules d'ostéosarcome vivantes et mortes après 24 h de culture en milieu standard (CT) ou en présence de TA. Les cellules HOS et Saos-2 ont été comptées au bleu Trypan sur une cellule de Malassez. Les résultats présentent la moyenne du comptage de 3 puits et sont exprimés en % du nombre total de cellules. Les barres représentent les écart-types.

Pour observer l'effet du TA sur la prolifération de cellules d'ostéosarcome *in vitro*, des expériences de co-culture ont été mises en place par Pierre Perrot lors de ses travaux de thèse, mais elles n'ont pas montré d'effet pro-prolifératif du TA. En effet la présence de TA induisait un regroupement en amas des cellules tumorales cultivées sans facteurs de croissance (figures 26A et 26B). Après comptage au bleu Trypan sur

lame de Malassez (figure 26C), il apparaissait que les cellules tumorales n'étaient pas mortes mais qu'elles avaient stoppé leur développement ; en effet il y avait autant de cellules cultivées en condition CT qu'en présence de TA. Les lipides contenus dans le TA ont pu bloquer les échanges gazeux des cellules et ainsi provoquer cet arrêt de la prolifération des cellules de lignées d'ostéosarcome. C'est pourquoi nous avons cherché à étudier les effets des facteurs solubles produits par le TA et sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome, sans la phase lipidique qui semblait modifier les échanges gazeux *in vitro*.

Facteurs solubles du TA et croissance tumorale

Le TA sécrète de nombreuses cytokines dont certaines ont montré une action sur la prolifération de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*.

La leptine est la principale cytokine spécifiquement sécrétée par la TA. Elle a présenté un effet pro-prolifératif *in vitro* lorsqu'elle était ajoutée à des cellules de lignées humaines de carcinome mammaire (Dieudonne et al., 2002; Saxena et al., 2007) ou de cancer de la prostate (Somasundar et al., 2004). Dans le cas du cancer du colon, l'ajout de leptine à des cellules de lignées tumorales humaines avait pour effet de stimuler la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Hardwick et al., 2001). Dans le cas de l'ostéosarcome, la leptine augmentait la prolifération *in vitro* de cellules humaines Saos-2 (Burguera et al., 2006) et pourrait donc être impliquée dans la croissance de l'ostéosarcome soutenue par l'apport de TA.

Parmi les cytokines produites par le TA, l'interleukine (IL) 6 exerce un rôle variable sur le développement tumoral. Cette cytokine pro-inflammatoire est depuis longtemps décrite comme un facteur de croissance pour les cellules de lymphome (Shimizu et al., 1988; Yee et al., 1989), de myélome multiple (Kawano et al., 1988), de carcinome rénal (Miki et al., 1989), ou encore pour les cellules dérivées de sarcome de Kaposi (Miles et al., 1990). Cependant, une étude plus récente décrit un effet modulateur de la prolifération de cellules de carcinome mammaire par l'IL-6 via la production d'œstrogènes (Honma et al., 2002). Dans l'ostéosarcome, l'IL-6 serait impliquée dans l'effet pro-prolifératif exercé *in vitro* par des Cellules Souches Mésoenchymateuses dérivées de Moelle Osseuse (CSMMO) sur les cellules humaines d'ostéosarcome (figure 27A ; Bian et al., 2010). Cet effet pro-tumoral exercé par les CSMMO sur

l'ostéosarcome *in vitro* et *in vivo* a pu être bloqué *in vitro* par l'ajout d'un anticorps bloquant la signalisation de l'IL-6 (figure 27B ; Tu et al., 2012).

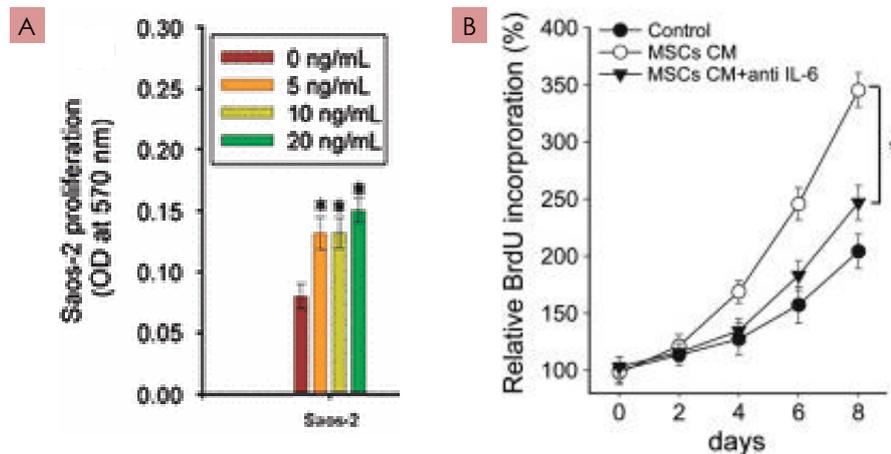


Figure 27 : Effet pro-prolifératif de l'IL-6 sur les cellules d'ostéosarcome Saos-2.

A- Graphique montrant la prolifération de cellules d'ostéosarcome Saos-2 (évaluée par test MTT) cultivées dans du milieu supplémenté en concentrations croissantes d'IL-6. Extrait de Bian et al., 2010. B- Graphique montrant l'évolution temporelle de cellules d'ostéosarcome Saos-2 (évaluée par incorporation de BrdU) cultivées pendant 8 jours dans du milieu sans facteur de croissance (Control), en présence de MC- CSMmo standard (MSCs CM) ou sans IL-6 (MSCs CM + anti IL-6). Extrait de Tu et al., 2012. * : $p < 0,05$.

Les cytokines de la famille Fibroblast Growth Factor (FGF) ont des implications dans l'angiogenèse, la survie, la migration et la prolifération des cellules tumorales dans de nombreux cancers (Turner and Grose, 2010). Au sein de cette famille de cytokines, le FGF basique (FGF2) semblait activer la prolifération et la migration des cellules d'ostéosarcome, réduit leur sensibilité aux traitements de chimiothérapie et inhiber leur différenciation dans la voie ostéoblastique (Shimizu et al., 2012).

Outre l'action de protéines et cytokines produites par les cellules du TA, d'autres molécules peuvent avoir une action sur les cellules tumorales, comme des composés de nature lipidique. Par exemple, des acides gras polyinsaturés produits par ont été retrouvés dans du milieu conditionné par des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM ; Roodhart et al., 2011). Isolés dans la fraction de bas poids moléculaire (< 3 kDa) parmi les molécules solubles produites par les CSM, ces acides gras étaient capables d'induire une résistance tumorale aux molécules de chimiothérapie dans des modèles précliniques de cancer du côlon, du poumon et du sein. Ces observations nous ont incités à prendre en considération l'implication éventuelle de médiateurs lipidiques dans l'effet du tissu adipeux sur l'ostéosarcome.

L'Acide LysoPhosphatidique (LPA) est un facteur lipidique produit notamment par les adipocytes (Valet et al., 1998) et pouvant être dosé dans le sérum ou d'autres fluides biologiques (Saulnier-Blache et al., 2000). Le LPA est impliqué notamment dans la prolifération, le chimiotactisme et la migration cellulaire (Moolenaar et al., 1997). L'action d'activation du LPA sur la maturation ostéoblastique est potentialisée par son association avec l'albumine (Mansell et al., 2011). Dans le cas du cancer du sein, le LPA est capable de favoriser la dissémination métastatique des cellules de carcinome mammaire vers un site osseux et d'accélérer la croissance des métastases (Boucharaba et al., 2004; David et al., 2010). En revanche, dans le cancer de la prostate, le LPA activerait la maturation épithéliale des cellules tumorales et inhiberait leur capacité d'invasion (Härmä et al., 2012). Dans l'ostéosarcome, des enzymes impliquées dans la signalisation du LPA seraient capables d'accélérer la croissance tumorale et la prolifération cellulaire (Rastegar et al., 2010).

Le rôle de ces différents médiateurs solubles est loin d'être établi dans le développement de l'ostéosarcome.

CSC dans l'ostéosarcome

Dans le cas clinique de récurrence suite à un transfert autologue de tissu adipeux (TA) plus de 10 ans après la fin du traitement, le site de développement et du type de la seconde tumeur coïncidaient avec la première tumeur (ostéosarcome télangiectasique de l'humérus proximal gauche). Cette concordance après un temps de rémission supérieur à 5 ans a amené à l'hypothèse selon laquelle des Cellules Souches Cancéreuses (CSC) auraient été sorties de leur état de quiescence par l'apport de TA. Puisque les CSC ne sont pas prolifératives et réalisent peu de réplication d'ADN, elles ne sont pas ciblées par les agents de chimiothérapie. Leur présence sur le site tumoral après le traitement n'est pas incompatible avec la bonne réponse de la patiente à la chimiothérapie, qui avait été observée lors de l'analyse de la pièce de résection tumorale.

Dans le cas de l'ostéosarcome, pour isoler des CSC à partir de biopsies, Gibbs et son équipe ont mis en place un système de culture en conditions de perte d'adhérence et dans un milieu de culture adapté, supplémenté en méthylcellulose pour le rendre

semi-solide et dépourvu de facteurs de croissance (Gibbs et al., 2005). Ces conditions de culture qui favorisent la formation d'oncosphères induisent l'acquisition d'un phénotype de CSC par des cellules de lignées d'ostéosarcome (Wilson et al., 2008).

Ces CSC d'ostéosarcome montrent un fort niveau d'expression des gènes marqueurs de cellules souches embryonnaires : *POU5F1*, *SOX2* ou encore *NANOG* (Fujii et al., 2009; Tirino et al., 2008). La variation de l'expression de gènes de cellules souches embryonnaires est inversement corrélée à celle de gènes précoces de différenciation dans le lignage chondrocytaire et ostéoblastique (respectivement *SOX9* et *RUNX2*).

L'hypothèse de CSC impliquées dans la récurrence de l'ostéosarcome semble soutenue par ces différentes études. Aucune donnée concernant l'interaction des CSC avec le TA n'est cependant disponible actuellement.

Objectifs : évaluer les interactions des facteurs solubles du TA avec les cellules d'ostéosarcome en prolifération ou en quiescence

Des études mises en place par Pierre Perrot lors de ses travaux de thèse visaient à évaluer l'impact d'une injection de TA sur le développement de l'ostéosarcome dans un second modèle préclinique. Ce modèle était induit par l'injection paratibiale de cellules HOS. Dans ce modèle, une seule injection de TA induisait une accélération de la croissance tumorale alors que l'injection de PBS réalisée pour reproduire le geste chirurgical ne modifiait pas le développement de l'ostéosarcome (figure 28A). De plus, du TA injecté seul ne provoquait pas d'apparition de masse au cours du temps et n'était donc pas tumorigène par lui-même. Par ailleurs, l'injection de TA ne modifiait pas l'incidence métastatique (évaluée macroscopiquement lors de l'euthanasie) ni l'atteinte osseuse provoquée par la tumeur (figure 28B).

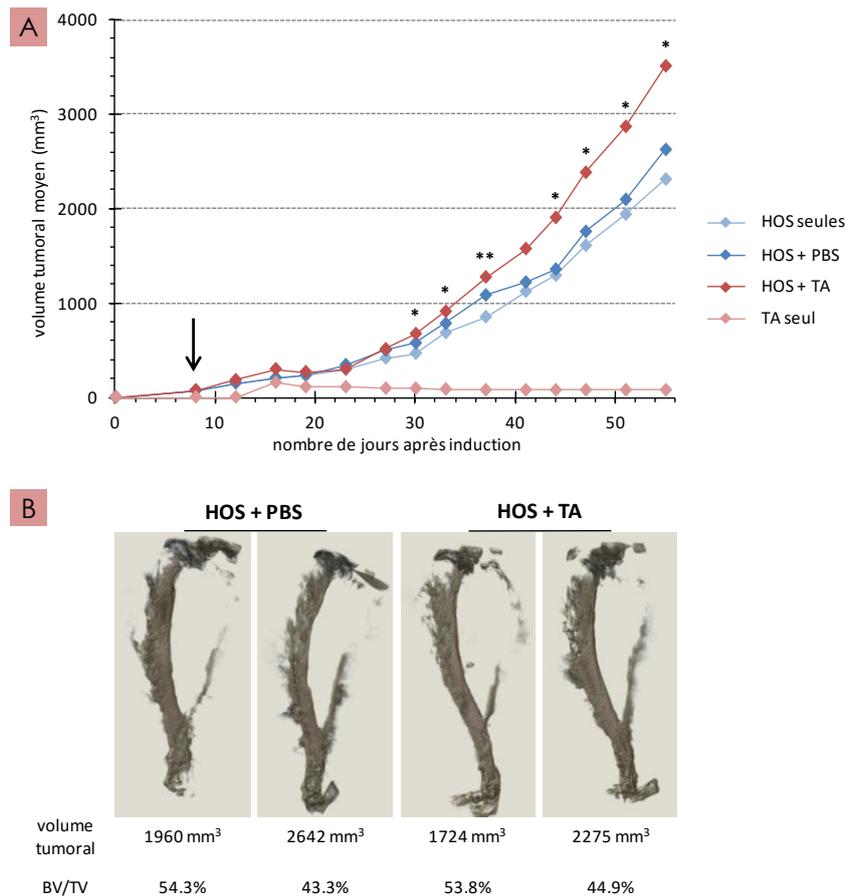


Figure 28 : Impact de l'injection de TA sur le développement de l'ostéosarcome.

Les tumeurs ont été induites par injection para-tibiale de cellules HOS. Un groupe de souris n'a pas reçu d'injection (HOS seules), un groupe a reçu une injection de PBS ou de TA (groupes HOS + PBS et HOS + TA respectivement), un dernier groupe sans tumeur a reçu une injection de TA (groupe TA seul). A- Graphique représentant l'évolution du volume tumoral au cours du temps. La flèche représente le jour de l'injection de TA ou de PBS. B- Images de scanner réalisés sur des tibias portant les tumeurs issues de souris des groupes HOS + PBS et HOS + TA. Le volume de la tumeur présentée est indiqué, ainsi que le volume osseux spécifique (Bone Volume / Total Volume, BV/TV ; exprimé en %). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ ($n = 8$).

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'effet pro-tumoral du TA sur l'ostéosarcome en développement, des analyses complémentaires (expression génique, indice de prolifération) ont été effectuées dans le cadre de ce second modèle préclinique.

Par contre, l'utilisation de TA complet n'a pas semblé être un bon modèle pour étudier son impact sur la croissance des cellules d'ostéosarcome *in vitro*. Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps au rôle seul des facteurs solubles du TA sur les cellules d'ostéosarcome en culture, en excluant la composante lipidique, non soluble, et la composante cellulaire de notre analyse.

Dans le cas clinique rapporté par notre équipe, l'hypothèse posée serait que la série d'injections de TA aurait provoqué une reprise de la croissance de la tumeur initiale, à partir de CSC. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à établir un modèle d'acquisition de caractéristiques de CSC par des cellules de lignées d'ostéosarcome *in vitro* pour observer l'éventuel impact des facteurs solubles du TA sur une sortie de quiescence des cellules d'ostéosarcome.

Enfin, des facteurs solubles connus pour être produits par le TA ont été décrits comme ayant un potentiel effet pro-tumoral. Nous avons cherché à les détecter parmi les facteurs solubles que nous récupérons à partir de TA et nous avons observé si ces molécules pouvaient avoir un impact sur la croissance *in vitro* des cellules d'ostéosarcome.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cellules et conditions de culture

Cellules d'ostéosarcome

MNNG-HOS est une lignée de cellules humaines issues d'un ostéosarcome survenu sur l'extrémité fémorale distale d'une jeune fille de 13 ans, et établie en 1971 (McAllister et al., 1971). Les cellules utilisées dans ces travaux sont dérivées de la lignée initiale HOS, référencée par l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro CRL-1543, transformée par un traitement au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) pour obtenir une lignée plus cancérogène (Rhim et al., 1975). Les MNNG-HOS sont référencées par l'ATCC sous le numéro CRL-1547 et seront appelées HOS dans le reste de ce document.

Les cellules de la lignée MG-63 (numéro ATCC : CRL-1427) sont dérivées de l'ostéosarcome d'un jeune garçon de 14 ans (Billiau et al., 1977).

La lignée Saos-2 (numéro ATCC : HTB-85) est dérivée de l'ostéosarcome d'une jeune fille de 11 ans (Fogh et al., 1977).

Les cellules de ces 3 lignées étaient cultivées à 37°C dans un incubateur à atmosphère humide et avec 5% de CO₂, dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec du Sérum de Veau Foetal SVF, 10%) pour apporter les facteurs de croissance nécessaires à l'expansion des cellules. Les manipulations étaient effectuées sous un poste de sécurité microbiologique muni d'une hotte à flux laminaire vertical.

Lorsque le tapis cellulaire atteignait 80 à 90% de confluence, les cellules étaient repiquées. Le tapis cellulaire était alors rincé au PBS et les cellules étaient décollées de leur support plastique et séparées les unes des autres grâce à l'ajout d'un mélange de trypsine + EDTA (30 µL/cm²) pendant 5 minutes à 37°C. L'action de la trypsine était ensuite stoppée par l'ajout de milieu de culture supplémenté avec 10% de SVF.

Pour induire la formation d'oncosphères, les cellules HOS étaient ensemencées dans des plastiques de culture ne permettant pas l'adhérence (matériel Ultra Low Attachment, Corning). Les cellules étaient cultivées dans du milieu de culture α MEM supplémenté en méthylcellulose (1,25%) et en SVF (1%). Pour limiter le dessèchement des puits de culture, du PBS était ajouté dans tous les puits vides adjacents ainsi que dans les interstices entre les puits.

Obtention des milieux conditionnés

Milieu conditionné de tissu adipeux

Les extraits de Tissu Adipeux (TA) sous-cutané issu de la paroi abdominale ou des flancs étaient récupérés lors d'interventions chirurgicales comprenant une procédure de lipoaspiration réalisée selon la méthode Coleman. Le consentement oral du patient était demandé avant l'opération ; un consentement écrit n'était pas requis car le prélèvement était uniquement réalisé à but de recherche et demeurait anonyme (Art. L. 1245-2 du Code de la Santé Publique, Loi 2004-800 du 6 août 2004, *Journal Officiel* du 7 août 2004).

Le TA était réparti à la seringue dans des inserts de culture à pores de 3 μ m montés sur les puits d'une plaque contenant du milieu α MEM sans SVF et incubé à 37°C dans une atmosphère humide (5% CO₂/95% air). Après 24 heures d'incubation, le milieu était récupéré et correspond à du Milieu Conditionné de TA (MCTA).

Fractionnement des MCTA

Une fois récupérés, les facteurs solubles contenus dans le MCTA pouvaient être fractionnés selon leur poids moléculaire par ultrafiltration. Brièvement, le MCTA à fractionner était placé sur une première colonne de filtration (Amicon Ultra 15, Millipore) présentant un critère de sélection moléculaire de 50 kDa. La colonne était mise à centrifuger 15 minutes à 5500 rpm. A l'issue de la centrifugation les facteurs solubles de plus de 50 kDa étaient restés dans la partie supérieure et les plus petits avaient traversé la colonne (figure 29). Les 2 fractions étaient diluées dans du α MEM pour atteindre l'équivalent du volume déposé sur la colonne et retrouver leur concentration initiale. La fraction de moins de 50 kDa était ensuite placée sur une seconde colonne de filtration avec un critère de sélection moléculaire de 3 kDa et

centrifugée à 5500 rpm pendant 30 minutes. Après la centrifugation, les 2 fractions (de 3 à 50 kDa et moins de 3 kDa) étaient à nouveau complétées avec du aMEM standard pour atteindre le volume initialement déposé de MCTA.

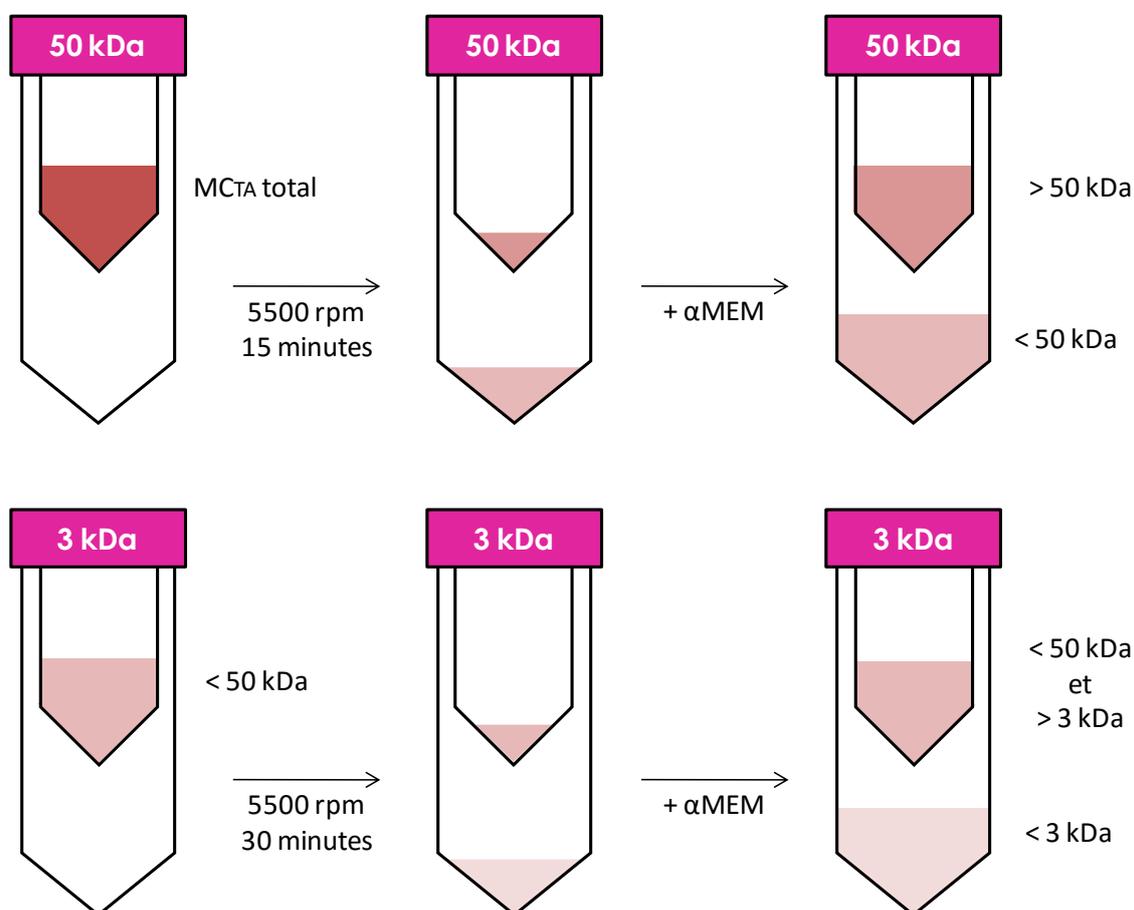


Figure 29 : Fractionnement des composants du MCTA en fonction de leur poids moléculaire. Représentation schématique de la démarche adoptée pour séparer les différentes fractions de poids moléculaire des MCTA tout en conservant leur concentration initiale.

Milieu conditionné de cellules en culture

Les cellules étaient cultivées pour atteindre 80-90% de confluence. Le milieu de culture était alors enlevé et le tapis cellulaire était rincé 3 fois avec du PBS. Les cellules étaient ensuite cultivées avec du milieu aMEM non supplémenté en SVF. Au bout de 24 heures, le milieu était récupéré et filtré à travers un filtre-seringue de 0,22 μm pour enlever tous les éventuels débris cellulaires. Le milieu ainsi obtenu correspondait à du Milieu Conditionné (MC).

Dosage de cytokines

Les cytokines contenues dans les MC obtenus à partir de TA et de cellules d'ostéosarcome ont été dosées à l'aide de la technologie multiplex (Bio-Plex Multiplex System, Bio-Rad). Cette technologie permettait la détection simultanée de plusieurs molécules (jusqu'à 100) dans un volume réduit d'échantillon sur le principe d'un test ELISA mais où les Anticorps spécifiques étaient couplés à des billes magnétiques. Ceci permettait la reconnaissance simultanée de plusieurs signaux de couleurs et d'intensités différentes grâce à un lecteur de plaques adapté, l'intensité du signal détecté étant directement corrélée à une concentration des molécules d'intérêt dans le milieu testé.

Le kit 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.

Évaluation de la croissance cellulaire in vitro

Activité mitochondriale

La viabilité cellulaire était déterminée par un test colorimétrique utilisant le sel de tétrazolium WST-1 (Roche). Trois mille cellules étaientensemencées dans les puits d'une plaque 96 puits et cultivées jusqu'à atteindre 50% de confluence. Les puits étaient alors rincés au PBS et les cellules cultivées une nuit dans du milieu aMEM seul, sans sérum, pour synchroniser leur cycle de prolifération. Les cellules étaient ensuite traitées pendant 24 h puis du réactif WST-1 dilué au 1/10^{ème} dans du milieu aMEM seul était ajouté dans chaque puits pendant 1 à 3 heures. La DO à 490 nm était ensuite lue au spectromètre Victor (Perkin-Elmer) et témoignait de l'activité mitochondriale des cellules.

Cycle cellulaire

Les cellules HOS étaient cultivées pour atteindre 50% de confluence, elles sont alors rincées avec du PBS et cultivées une nuit dans du milieu aMEM seul, sans sérum, pour les synchroniser et stopper leur progression en phase G₁ du cycle cellulaire. Les cellules sont ensuite traitées pendant 24 h puis récupérées à l'aide d'un mélange trypsine-EDTA avant d'être fixées pendant 30 min dans de l'éthanol 70% à 4°C. Entre chaque étape, les cellules sont centrifugées à 2500 rotations par minute (rpm) pendant 3 min à 4°C puis rincées avec du PBS et centrifugées à nouveau. Les cellules sont incubées dans un tampon phospho-citrate durant 30 min à 4°C ; puis les ARN sont dégradés par l'action de la RNase A diluée à 70 µg/mL dans du PBS pendant 30 min à 37°C. L'ADN est finalement marqué à l'iodure de propidium (50 µg/mL) pendant 20 min à 4°C et à l'obscurité. Entre l'étape de dégradation des ARN et le marquage de l'ADN, il est possible de détecter la protéine Ki-67 par l'ajout d'un anticorps spécifique couplé au FITC pendant 20 min à 4°C et à l'obscurité. Les contrôles sont établis en utilisant un anticorps isotypique également couplé au FITC ainsi que des cellules uniquement marquées par l'IP ou par l'anticorps anti-Ki-67. La distribution du cycle cellulaire est observée par cytométrie en flux et analysée à l'aide des logiciels CXP Analysis et MutiCycle AV.

Analyse de l'expression génique

Extraction des ARN

Les ARN des cellules cultivées en conditions d'adhérence et en oncosphères ont été extraits grâce aux kits d'extraction sur colonne Nucleospin RNA et RNA XS respectivement (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. Après traitement, les cellules rincées par du PBS froid et placées sur glace étaient détruites par l'ajout d'un tampon de lyse supplémenté en β-mercaptoéthanol (1%). Le tapis cellulaires était gratté et le lysat récupéré.

Les ARN issus de tumeurs induites chez la souris nude ont été obtenus par lyse des tissus dans 10 volumes de Trizol (Tiangen) sur glace et à l'aide d'un broyeur (Turrax), puis extraits grâce au kit d'extraction Nucleospin RNA.

Une filtration du lysat était réalisée avant que les acides nucléiques ne soient fixés sur une colonne pour être purifiés. L'ADN était dégradé par l'action d'une RNase A pendant 15 minutes à température ambiante, puis la colonne était rincée. Les ARN étaient enfin élués dans de l'eau pure. La quantité d'ARN était déterminée par dosage réalisé sur un spectromètre Nanodrop. La Densité Optique (DO) était lue à différentes longueurs d'onde (230, 260 & 280 nm) et le ratio entre ces différentes mesures permettait de déterminer la concentration et la pureté en ARN par rapport à l'ADN et aux composés protéiques et phénoliques pouvant contaminer l'échantillon. Les ARN pouvaient ensuite être directement étudiés ou conservés à -20°C.

Rétrotranscription

Avant de pouvoir étudier le niveau d'expression de chaque gène d'intérêt à partir des ARN extraits, ceux-ci devaient préalablement être convertis en ADN complémentaires (ADNc). Cette étape de rétrotranscription était réalisée par l'action de l'enzyme rétrotranscriptase Maxima H Minus (ADN polymérase ARN-dépendante) selon le kit de synthèse des ADNc (Thermo). Pour ce faire, 1 µg d'ARN était incubé 5 minutes à 65°C avec des amorces oligo-dT se fixant à la queue poly-A des ARN messagers et en présence saturante de dNTP, qui constituaient le substrat de l'enzyme pour synthétiser de l'ADN. Cette enzyme était ensuite ajoutée au mélange pour agir 30 minutes à 50°C. Un choc thermique en 2 étapes (5 minutes à 85°C puis à 4°C) permettait de dénaturer les complexes d'ARNm/ADNc et d'inactiver la rétrotranscriptase.

PCR en temps réel

La réaction en chaîne d'une ADN polymérase (Polymerase Chain Reaction) permettait d'amplifier spécifiquement un ADNc précis correspondant au fragment de la séquence d'un gène d'intérêt. L'enzyme *Thermus aquaticus* (Taq) ADN polymérase ADN-dépendante utilisée permettait la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à l'ADNc à partir d'un couple d'amorces spécifiques du gène d'intérêt (Eurogentec) dans des conditions de température élevée. Au cours des cycles d'amplification, une molécule fluorescente (SYBR Green) s'intercale dans les

petits sillons de l'ADN double brin néo-synthétisé de manière régulière et permet de quantifier le nombre de transcrits amplifiés par la réaction de PCR.

Le mélange réactionnel contenant l'enzyme, les amorces (dont les séquences sont référencées en annexes), le fluorochrome et 20 ng d'ADNc était placé dans un thermocycleur CXF96 (Bio-Rad) avec le programme d'amplification suivant : 30 secondes à 98°C (initiation) ; puis 15 secondes à 95°C (dénaturation) et 30 secondes à 60°C (hybridation et élongation) 39 cycles durant.

Au terme de ce programme et à l'aide du logiciel CFX Manager (Bio-Rad) est réalisée une courbe de fusion afin de vérifier la qualité des ADN amplifiés.

Dans le cas d'expériences réalisées *in vitro*, l'expression des gènes cibles était normalisée par rapport au gène contrôle endogène codant pour l'enzyme Hypoxanthine Phospho-RibosylTransférase 1 (*HPRT1*), les niveaux relatifs d'expression géniques dans la condition de culture « X » étaient évalués grâce à la formule :

$$2^{-[(Ct \text{ gène} - Ct \text{ HPRT1})_{condition X} - (Ct \text{ gène} - Ct \text{ HPRT1})_{condition \text{ contrôle}}]} ; \text{ OU } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Pour l'analyse de l'expression génique réalisée sur des prélèvements tumoraux, l'expression des gènes cibles était normalisée par rapport à l'expression moyenne de deux gènes contrôles endogènes codant pour l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) et l'actine- β (*ACTB*) grâce à la formule :

$$2^{-(Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ moyen GAPDH/ACTB})} ; \text{ OU } 2^{-\Delta Ct}$$

Étude de l'expression protéique

Extraction et dosage des protéines

Les cellules étaient rincées avec du PBS froid rapidement après le traitement, puis lysées par l'action d'un tampon d'extraction (composition en annexes). Après grattage du tapis cellulaire, le lysat était récupéré et conservé pour être dosé.

Le dosage des protéines du lysat nécessitait la réalisation d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin, BSA). Les protéines sont ensuite mélangées à une solution de sulfate de cuivre et d'acide bicinchoninique responsable d'une réaction colorimétrique. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la

DO à 570 nm lue au spectromètre permettait d'obtenir la concentration protéique des échantillons.

Western Blot

Cette technique permettait de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon et d'évaluer son niveau de production, sans pour autant être quantitative.

Les extraits protéiques étaient mélangés à du tampon de Laemmli (25%) permettant de colorer, conserver et alourdir les échantillons. Les protéines étaient dénaturées par une ébullition d 5 minutes ç 95°C puis conservées sur glace. Les mélanges étaient ensuite chargés dans un gel d'acrylamide (10%) pour être séparées selon leur taille lors d'une migration par électrophorèse à ampérage constant et en conditions dénaturantes. Les protéines étaient ensuite transférées du gel vers une membrane de Poly-Fluorure de Vinylidène (PVDF) dans un montage soumis à ampérage constant.

Après transfert, la membrane portant les protéines était lavée dans du tampon de rinçage PBS supplémenté en agent mouillant Tween-20 (0,05%), puis incubée 1 heure dans une solution de rinçage supplémentée avec 3% de BSA. Cette étape de saturation permettait de réduire les hybridations non-spécifiques. Les membranes étaient ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire, spécifique de la protéine d'intérêt et dilué dans une solution de rinçage supplémentée avec 3% de BSA pendant une nuit à 4°C. Les membranes étaient à nouveau rincées puis incubées 1 heure en présence de l'anticorps secondaire spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire et directement couplé à une peroxydase, dilué dans une solution de rinçage supplémentée avec 5% de lait. Les membranes étaient rincées une dernière fois avant l'étape de révélation par ajout du substrat de la peroxydase associé à du luminol pour augmenter l'émission de lumière, qui pouvait alors être détectée par spectro-imagerie. Les images obtenues dans la chambre noire GBOX (SynGene) étaient traitées avec le logiciel GeneSnap (SynGene), la durée de l'acquisition était adaptée selon à la sensibilité du marquage afin d'obtenir le résultat le plus contrasté possible.

Analyses histologiques

Selon le type de marquage histologique à réaliser, le traitement des prélèvements (membre, tumeur ou cellules) variait pour permettre la conservation du composant d'intérêt.

Une fois le montage de l'échantillon entre lame et lamelle réalisé, les colorations étaient observées au scanner de lames Nanozoomer (Hamamatsu) et la fluorescence était observée au microscope inversé à fluorescence.

La congélation des prélèvements sans déshydratation par bains d'alcool permettait la conservation des lipides ainsi que des molécules fluorescentes. Les échantillons étaient incubés dans des solutions de sucrose dilué en concentrations croissantes dans du PBS (6 à 30%, bains de 48 h). Les échantillons étaient ensuite recouverts de gel d'inclusion NEG.50 puis plongés dans un bain d'isopentane refroidi à -50°C , faisant durcir le gel d'inclusion pour obtenir un bloc pouvant être conservé à -80°C . Des coupes de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur du prélèvement congelé étaient alors réalisées dans une atmosphère maintenue à -20°C à l'aide d'un cryostat et déposées sur une lame de verre (Superfrost, Menzel).

Les autres analyses histologiques ont été réalisées sur des prélèvements inclus en paraffine après fixation dans un bain de PBS + PFA à 4% à 4°C (bain de 48 h pour les prélèvements de tumeur et de 15 minutes pour des cellules cultivées en oncosphères). Après la fixation, les échantillons étaient déshydratés par incubation dans des bains d'éthanol en concentration croissante (de 70° à 100°) puis dans un bain de but-2-ol avant d'être inclus dans un bain de paraffine à 56°C . Les échantillons étaient alors moulés en bloc dans de la paraffine liquide et refroidis ensuite sur une plaque réfrigérante.

Les blocs pouvaient alors être découpés sur un microtome. Les coupes de $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur étaient ensuite placées sur une lame de verre et laissées à l'air libre pour sécher pendant 24 h. Une fois séchées, les lames étaient débarrassées de leur paraffine par des bains successifs d'éthanol en concentration décroissante (de 100° à 80°) puis maintenues dans de l'eau distillée.

Détection des lipides : coloration Oil Red O

Les prélèvements de tumeurs induites chez la souris nude étaient directement inclus pour être congelés sans fixation préalable puis découpés au cryostat. Les coupes étaient ensuite fixées par un bain de 30 secondes de paraformaldéhyde (PFA) dilué à 10% dans du PBS. Les lames étaient rincées pendant 45 secondes à l'eau distillée puis les lipides étaient alors directement colorés par immersion de la lame dans un bain d'Oil Red O dilués à 3 g/L pendant 10 minutes. Les lames étaient à nouveau rincées pendant 45 secondes, d'abord à l'eau distillée, puis à l'isopropranol (dilué à 60% dans de l'eau distillée). La coloration des noyaux était réalisée par un bain de 5 minutes dans de l'hématoxyline. Les coupes étaient finalement rincées à l'eau distillée pendant 45 secondes avant d'être montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux pour pouvoir être analysées.

Identification des cellules en prolifération par marquage de la protéine Ki-67

Les échantillons inclus en paraffine et découpés sur lame de verre étaient incubés dans une solution de citrate tamponnée à pH 6 pendant 20 min à 97°C. Les lames refroidies étaient ensuite rincées à l'eau distillée.

Chacune des étapes suivantes était précédée d'une série de 3 rinçages de 5 minutes par du TBStween. Les peroxydases endogènes aux échantillons étaient inactivées par l'ajout d'H₂O₂ à 3% pendant 15 minutes. Les lames étaient incubées en solution de saturation (TBStween + 2% de sérum de chèvre + 1% d'albumine de sérum bovin) pendant 25 minutes à température ambiante. L'anticorps dirigé contre la protéine Ki-67 humaine (Dako), produit chez la souris et dilué au 100^{ème} en solution de blocage était ajouté à la coupe pendant une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire biotinylé (Dako) dirigé contre l'isotype de souris, produit chez la chèvre et dilué au 400^{ème} dans une solution de saturation était ajouté aux échantillons pendant 30 minutes à 37°C. Une peroxydase produite par le raifort (Horse-Raddish Peroxydase, HRP ; Dako), couplée à la streptavidine et diluée au 800^{ème} dans du TBStween était ajoutée aux échantillons pendant 30 min à 37°C.

L'ajout pendant quelques secondes et à l'obscurité, d'un mélange d'H₂O₂ et de diamminobenzidine (DAB ; Dako) se colorant en brun par oxydation permettait en

suite la détection de la protéine Ki-67. Les échantillons étaient ensuite rincés à l'eau distillée (2 fois 5 minutes) avant d'être contre-colorés à l'hématoxyline et déshydratés par bains successifs d'éthanol en concentration croissantes (de 80° à 100°) puis conservés dans du xylène (OTTIX-Plus) pour être montés entre lame et lamelle dans un milieu hydrophobe (Pertex).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Excel (Microsoft) par des tests non paramétriques d'analyse de variance (ANOVA). Une variable de probabilité p inférieure à 5% permettait de conclure à une différence significative des variances testées deux à deux.

RÉSULTATS

Effet pro-tumoral du TA sur le développement de l'ostéosarcome

Les tumeurs induites par l'injection de cellules HOS dans des souris nudes et ayant reçu une injection de TA développées par Pierre Perrot (figure 28) ont été analysées par RT-PCR et par histologie.

L'expression génique des tumeurs ayant reçu une injection de PBS et de TA a été comparée par RT-PCR (figure 30), mais seulement à un temps tardif de développement de la tumeur (47 jours post-induction tumorale). Parmi les 3 gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire (*PPARG*, *LPL*, *FABP4*) et les 8 gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique-chondrocytaire (*OPG*, *DKK1*, *COL1A1*, *SOX9*, *RUNX2*, *ALP*, *IBSP* et *RANKL*), seule l'expression de *FABP4* était semblait différente entre les 2 groupes de tumeurs montrant une expression 9 fois plus faible dans les tumeurs injectées par du TA que dans celles injectées par du PBS. L'expression des gènes *RUNX2* et *OPG* était seulement légèrement modifiées dans les tumeurs injectées par du TA (x 0,5 et x 2,4 respectivement). Ces résultats n'ont pas montré que l'injection de TA induisait des changements majeurs du niveau de différenciation dans les cellules HOS de la tumeur, même si la croissance locale des tumeurs HOS injectées en TA était supérieure à celle des tumeurs injectées avec du PBS.

L'expression de gènes impliqués dans la promotion de la tumorigenèse (*MYC*, *MMP2*, *MMP13*, *VEGFA*, *CXCL12* et *POU5F1*) était similaire entre les tumeurs des 2 groupes, à l'exception des gènes *MMP13* et *CXCL12* dont l'expression était faiblement modifiée dans les tumeurs injectées par du TA par rapport aux tumeurs injectées par du PBS (x 1,84 et x 0,16 respectivement). Ces résultats concordaient avec les observations réalisées préalablement sur l'incidence métastatique et les paramètres de remodelage osseux qui n'étaient pas modifiés entre les 2 groupes de tumeurs.

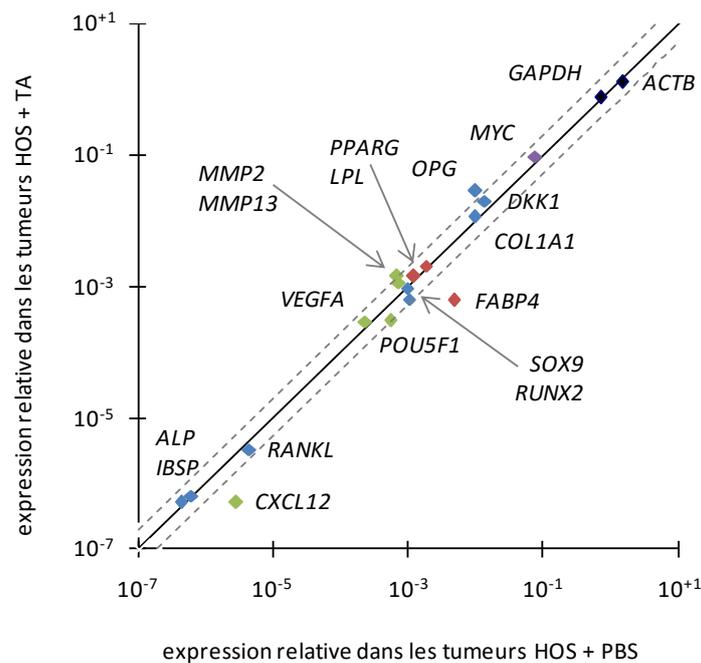


Figure 30 : Analyse du phénotype de tumeurs injectées avec du PBS ou du TA.

Graphique montrant le rapport de l'expression génique relative entre des tumeurs HOS injectées avec du PBS et des tumeurs HOS injectées avec du TA. Les ARN des tumeurs de 3 souris de chaque groupe ont été rassemblés et l'expérience a été renouvelée 3 fois. L'expression des gènes d'intérêt est relative à celle de gènes références (GAPDH et ACTB) et est observée par PCR en temps réel.

Des colorations Oil Red O réalisées précédemment avaient permis la détection de vacuoles lipidiques au sein des tumeurs injectées avec du TA pouvant s'agir d'adipocytes humains résiduels (figure 31A). Des marquages immuno-histochimiques ciblant la protéine humaine Ki-67 exprimée uniquement par des cellules en prolifération ont été réalisés sur des coupes de tumeurs HOS qui ont été récupérées soit à des temps précoces soit à des temps tardifs après avoir reçu une injection de PBS ou de TA (10 et 47 jours respectivement).

Les marquages réalisés 10 jours après injection de TA montraient environ 40% de cellules positives pour la détection de Ki-67 (Ki-67⁺) dans le groupe injectée par du PBS (figure 31B). Dans le groupe injecté par du TA, dans le stroma tumoral, 37% des cellules étaient Ki-67⁺, tandis qu'à proximité des vacuoles lipidiques, la part de cellules Ki-67⁺ s'élevait à 45%. Lorsque les marquages étaient réalisés sur des coupes de tumeurs 47 jours après l'injection, la part de cellules Ki-67⁺ dans les tumeurs injectées par du PBS était légèrement diminué (37%).

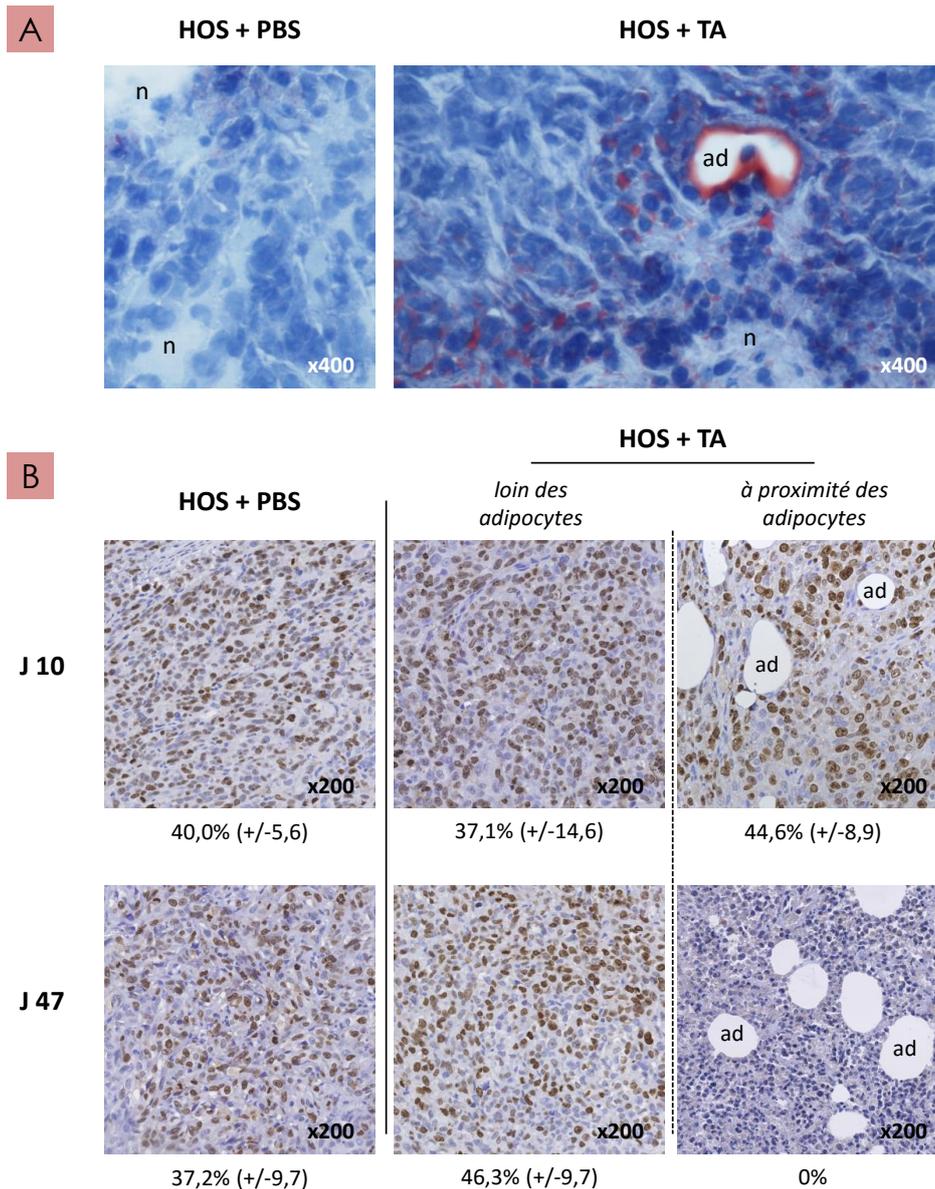


Figure 31 : Détection *in vivo* de composants du TA injecté et influence sur la prolifération de cellules tumorales.

Des analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes de tumeurs HOS ayant reçu une injection de PBS (HOS + PBS) ou de TA (HOS + TA). A- Images de coloration des lipides par Oil Red O. Les lipides apparaissent en rouge et les noyaux cellulaires sont colorés en bleu. Certaines zones de la tumeur étaient dépourvues de noyaux, correspondant à des plages de nécroses (n). Des vacuoles de dimensions variables sont observables, les plus grosses au contact de noyaux permettant l'identification d'adipocytes (ad). B- Images de marquage immunohistochimique de la protéine Ki-67 humaine sur des tumeurs 10 et 47 jours après qu'elles aient reçu leur injection (J 10 et J 47 respectivement). Le comptage des noyaux positifs pour la détection de la protéine a été réalisé sur 6 plages pour chaque condition et est exprimé en % du nombre total de noyaux. Les images présentées sont représentatives de la valeur moyenne.

Dans le groupe ayant reçu une injection de TA, le stroma tumoral comptait une part de cellules Ki-67⁺ en hausse (46%), tandis que les vacuoles lipidiques étaient situées dans des zones de nécrose (0% de cellules Ki-67⁺) ne comprenant plus que des

noyaux cellulaires pycnotiques, sombres et compacts. Le TA aurait accéléré la croissance des cellules tumorales jusqu'à se retrouver dans des zones nécrotiques de la tumeur. L'impact des composants du TA aurait donc eu lieu rapidement suite à son injection.

Prolifération de cellules d'ostéosarcome accélérée par les facteurs solubles du tissu adipeux

Pour évaluer l'impact des facteurs solubles produits par le Tissu Adipeux (TA) sur la croissance des cellules d'ostéosarcome, des prélèvements de TA (figure 32A) ont été placés dans des inserts de culture à pores de 3 μm au-dessus de puits contenant du milieu αMEM standard sans facteur de croissance (figure 32B). Après 24 h, le milieu ainsi récupéré est appelé Milieu Conditionné de TA (MCTA) et peut être ajouté à des cellules en culture.

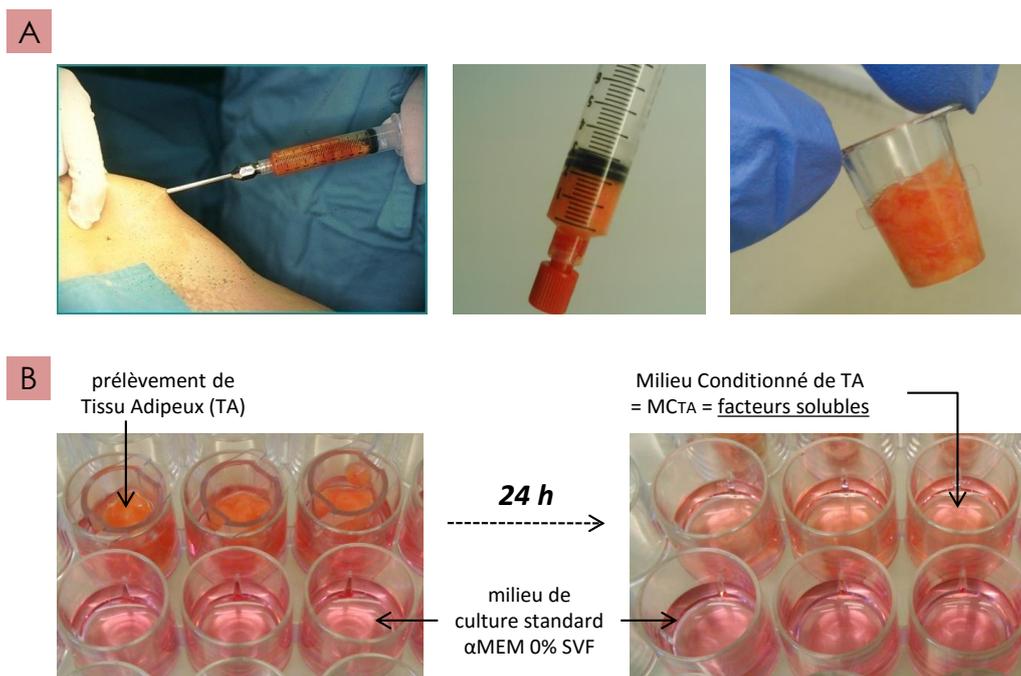


Figure 32 : Obtention des MCTA.

A- Le TA sous-cutané destiné à une greffe est prélevé par lipoaspiration au sein du département de chirurgie plastique du CHU de Nantes. Le prélèvement est débarrassé de sa phase huileuse et de sa fraction sanguine puis est réparti dans des inserts de culture à pores de 3 μm . B- Les inserts sont placés dans des puits de culture contenant du milieu αMEM standard, sans facteurs de croissance. Après 24 h d'incubation, les inserts sont enlevés, et le milieu est récupéré, constituant le Milieu Conditionné.

La prolifération des cellules d'ostéosarcome a été observée lorsqu'elles étaient cultivées en présence de MCTA et après qu'elles aient été cultivées sans facteur de croissance pendant 12 heures. Des comptages ont été réalisés indiquant que la part de cellules mortes ne variait pas en présence de MCTA mais que le nombre de cellules vivantes augmentait fortement suite à l'ajout de MCTA par rapport à des cellules cultivées sans MCTA. Pour évaluer plus précisément la croissance des cellules, des tests mesurant l'activité mitochondriale -et témoignant donc de la prolifération cellulaire- ont été employés.

Étude de l'activité mitochondriale

Des tests de prolifération ont donc été réalisés sur des cellules de lignées humaines d'ostéosarcome HOS, MG-63 et Saos-2 (figure 33). Du milieu standard supplémenté en SVF était utilisé en guise de contrôle positif pour l'activation de la prolifération et induisait une hausse de la prolifération de 40 à 70% (respectivement pour les cellules HOS et MG-63) par rapport à du milieu standard (condition CT, sans facteurs de croissance).

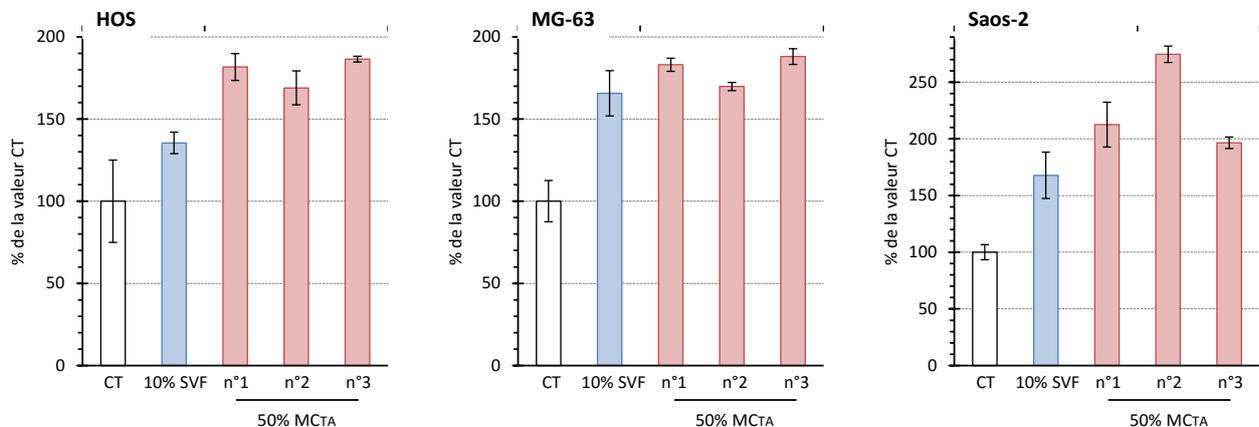


Figure 33 : Prolifération de cellules d'ostéosarcome en présence de MCTA.

Graphiques représentant la prolifération des cellules de 3 lignées humaines d'ostéosarcome (HOS, MG-63 et Saos2). La prolifération est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou milieux conditionnés de TA n°1 à 3 provenant de 3 donneurs) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) et après avoir été cultivées une nuit dans du milieu sans facteurs de croissance. Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 30 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Des MC de TA provenant de différents donneurs ont été ajoutés aux cellules en culture, 3 sont présentés dans la figure 19 mais 21 donneurs différents ont été testés

sur les cellules d'ostéosarcome et ont présenté des résultats similaires. Dans les 3 lignées en présence de MCTA dilué au 1/2 dans du milieu standard, la prolifération cellulaire était augmentée d'au moins 70% par rapport à la valeur contrôle. Les facteurs solubles du tissu adipeux avaient donc un effet pro-prolifératif marqué sur les cellules d'ostéosarcome qui était similaire voire supérieur à l'effet pro-prolifératif des facteurs de croissance de SVF.

Observation du cycle cellulaire

Afin de mieux caractériser cet effet pro-prolifératif des MCTA, des expériences d'analyse de la répartition des cellules HOS dans les différentes phases du cycle cellulaire ont été réalisées (figure 34). La quantité d'ADN dans les cellules HOS était visualisée grâce au marquage de l'ADN par un intercalant fluorescent : l'iodure de propidium et pouvait témoigner de la phase du cycle cellulaire dans laquelle chaque cellule était engagée.

En condition contrôle, c'est-à-dire en absence de SVF (CT, figure 34A), les cellules HOS étaient majoritairement en phase G_0/G_1 (51%) et en phase S de réplication de l'ADN (41%) et seulement 8% des cellules étaient en phase de préparation à la mitose G_2/M . L'ajout de SVF (figure 34B) provoquait une augmentation de la part de cellules en phase de préparation à la mitose G_2/M (+ 21%), un maintien du nombre de cellules en phase de réplication S et une diminution du nombre de cellules en phase G_0/G_1 (- 19%). La présence de MCTA (figure 34C) avait pour effet un maintien du nombre de cellules en phase G_0/G_1 par rapport à la condition CT, une hausse de la part de cellules en phase G_2/M (+ 20%) accompagnée d'une baisse de la part de cellules en phase de réplication (- 22%). Ces résultats pourraient indiquer que le MCTA permettait une progression plus rapide du cycle cellulaire que le SVF, avec des cellules HOS qui reviendraient progressivement en phase d'initiation G_0/G_1 .

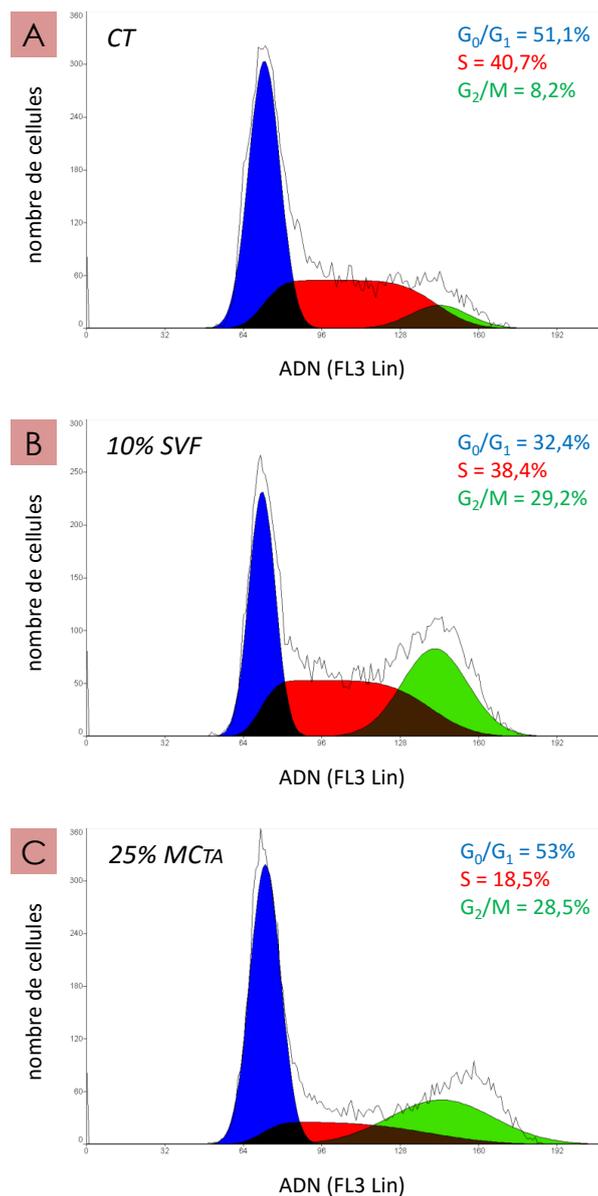


Figure 34 : Cycle cellulaire de cellules HOS en présence de MCTA.

Graphiques représentant la quantité d'ADN par cellule, observée par cytométrie en flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF, B ; ou MCTA, C) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT, A). Les % indiquent la part de cellules dans chacune des différentes phases du cycle cellulaire. Ces résultats sont représentatifs de 12 expériences

Analyse des protéines de régulation du cycle cellulaire

Pour observer l'impact des facteurs solubles du TA sur les protéines régulatrices du cycle cellulaire, le niveau d'expression et de phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire a été observé par Western Blot (figure 35).

Parmi les régulateurs du cycle cellulaire, la protéine Rb bloque l'entrée en phase de réplication S et son action est bloquée par phosphorylation notamment sur les Sérines 795 (S795 ; Connell-Crowley et al., 1997) et 807/811 (S807/811 ; Knudsen and Wang, 1996). Dans les cellules HOS, les formes totale et phosphorylée sur S807/811 de la protéine Rb n'étaient pas modifiées par la présence de SVF ni de MCTA par rapport à des cellules HOS cultivées sans facteurs de croissance (CT). En revanche, l'ajout de MCTA avait pour effet de réduire la phosphorylation de la protéine Rb sur le résidu sérine 795, indiquant un blocage du passage en phase S, ce qui pourrait expliquer la part importante de cellules HOS en phase G₀/G₁ en présence de MCTA..

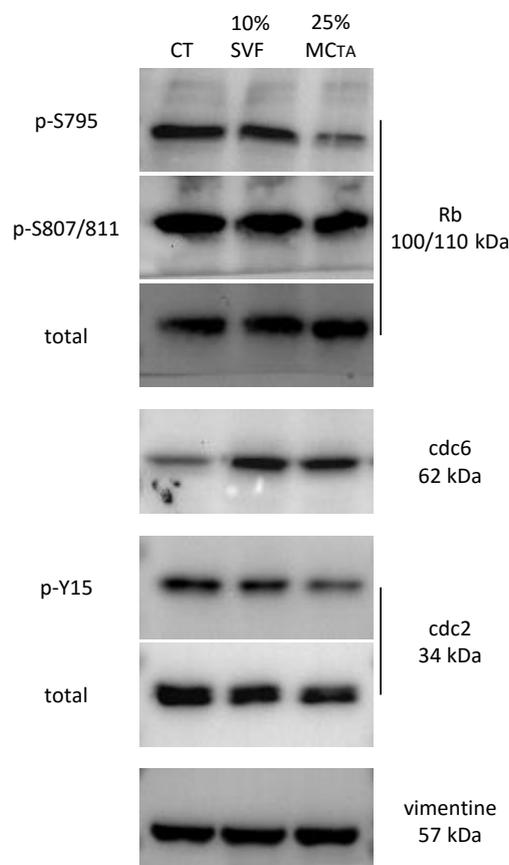


Figure 35 : Impact du MCTA sur les protéines du cycle cellulaire des cellules HOS.

Images de détection par Western Blot de formes totales et phosphorylées de protéines régulatrices du cycle cellulaire. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). La détection de la vimentine permet de vérifier le chargement d'une quantité homogène de protéines entre les différents puits.

La protéine cdc2 est impliquée dans le contrôle de l'entrée en mitose et l'inhibition de son activité par phosphorylation sur Tyrosine 15 (Y15) témoigne d'un blocage des cellules en phase G₂ (Wells et al., 1999). Dans les cellules HOS le niveau de phosphorylation de cdc2 sur Y15 en conditions CT n'était pas réduit par l'ajout de

SVF. En revanche, la culture en présence de MCTA avait pour effet de baisser le niveau de phosphorylation en Y15 de la protéine cdc2, ce qui pourrait accélérer le passage des cellules en G₂/M expliquant la part moins importante de cellules HOS en phase S et plus importante en G₂/M en présence de MCTA.

Enfin, la culture des cellules HOS en présence de SVF ou de MCTA favorisait la hausse de l'expression de la protéine cdc6 impliquée directement dans l'initiation de la réplication (Borlado and Méndez, 2008).

Les facteurs solubles du tissu adipeux auraient donc un effet facilitateur de l'initiation de la réplication (par l'expression de cdc6) ainsi que de l'entrée en mitose (par baisse de la phosphorylation de cdc2) dans les cellules HOS. En revanche le MCTA semblait avoir pour effet de bloquer les cellules HOS en phase G₁ en activant la protéine Rb.

Modélisation de la quiescence *in vitro* et impact du MCTA

La récurrence d'un ostéosarcome observée dans le cas clinique rapporté par notre laboratoire (Perrot et al., 2010) pouvait s'expliquer par la sortie de quiescence et la réactivation du cycle de prolifération de cellules tumorales résiduelles présentant des propriétés de Cellules Souches Cancéreuses (CSC). Ces cellules auraient résisté aux molécules de chimiothérapie successivement utilisées, elles seraient restées quiescentes durant la longue période qui a suivi le traitement et seraient sorties de leur quiescence suite au transfert autologue de tissu adipeux. Les CSC en se divisant de façon asymétrique auraient alors pu donner naissance à des cellules tumorales différenciées constituant le stroma d'une nouvelle tumeur et présentant les mêmes caractéristiques que la première tumeur (ostéosarcome télangiectasique).

Pour observer les interactions des facteurs solubles produits par le TA avec des cellules d'ostéosarcome en quiescence, un modèle de quiescence cellulaire *in vitro* a d'abord dû être mis en place.

Caractérisation des cellules HOS cultivées en oncosphères

Les cellules HOS ensemencées en milieu supplémenté en méthylcellulose et en conditions de perte d'adhérence restaient isolées en suspension (figure 36). À partir de 3 jours de culture, des sphères de plusieurs cellules étaient nettement identifiables, leur diamètre augmentant progressivement jusqu'au 10^{ème} jour. Au 12^{ème} jour de culture, les sphères se dissociaient et le milieu présentait de nombreux débris cellulaires.

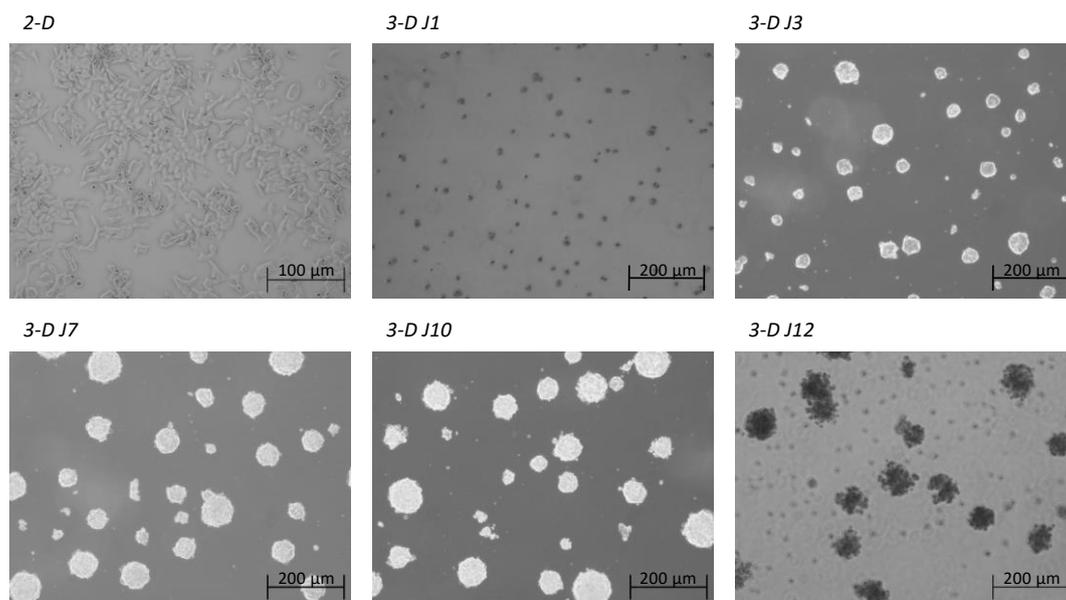


Figure 36 : Photographies de cellules HOS cultivées en conditions d'adhérence ou en oncosphères.

Les cellules HOS ont été photographiées en conditions normales d'adhérence au plastique (2-D) ou cultivées en conditions de perte d'adhérence (3-D) après 1 à 12 jours de culture (J1 à J12).

Le niveau d'expression de gènes marqueurs des CSC dans les cellules HOS cultivées 3 jours en oncosphères (3-D) a été comparé à celle de cellules HOS cultivées en conditions d'adhérence (2-D) par RT-PCR en temps réel (figure 37). La culture en oncosphères provoquait une hausse de l'expression de gènes marqueurs de cellules souches *POU5F1*, *SOX2* et *NANOG* par rapport à des cellules HOS cultivées en 2-D (x 320, x 56 et x10 respectivement). Cette hausse de marqueurs de cellules souches était inversement corrélée avec une baisse de l'expression de marqueurs de la différenciation précoce dans la voie ostéoblastique (*RUNX2* ; x 0,2) et chondrocytaire (*SOX9* ; x 0,4). L'expression de marqueurs précoces de la différenciation adipocytaire, *PPARG* et *FABP4*, était augmentée par la culture en oncosphères (x 1,7 et x 2,4 respectivement). Enfin l'expression du gène *MYC*,

marqueur de la prolifération, était diminuée dans les cellules HOS cultivées en oncosphères (x 0,1). La culture en oncosphères favorisait l'expression par les cellules HOS de marqueurs de CSC, tout en réduisant l'expression de marqueurs de différenciation et de la prolifération.

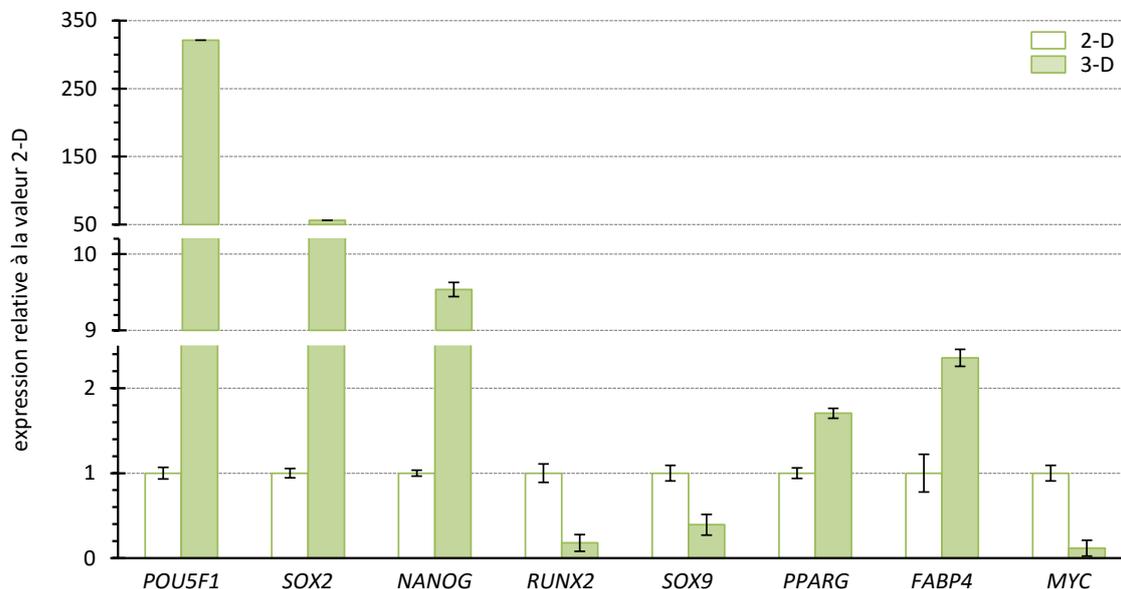


Figure 37 : Influence de la culture en oncosphères sur l'expression génique de cellules HOS. Graphique représentant l'expression génique des cellules HOS cultivées en oncosphères (3-D) relative à celle de cellules cultivées en conditions d'adhérence (2-D). Les résultats exprimés sont des moyennes de 3 valeurs et représentent 13 expériences. Les barres représentent les écart-types.

Effet du MCTA sur le phénotype des cellules HOS en oncosphères

Du Milieu Conditionné par le Tissu Adipeux (MCTA) a été ajouté aux cellules HOS après 3 jours de culture en oncosphères. Dans ces conditions, l'expression des gènes marqueurs de CSC *POU5F1*, *SOX2* et *NANOG* était diminuée par l'ajout de MCTA (x 0,2, 0,3 et x 0,5 respectivement ; figure 38). Le niveau d'expression des gènes *RUNX2* et *SOX9*, marqueurs précoces de différenciation ostéoblastique-chondrocytaire était augmenté (x 3,6 et x 2,3 respectivement) tandis que l'expression des marqueurs de la différenciation adipocytaire *PPARG* et *FABP4* était réduite (x 0,9 et x 0,4 respectivement). En revanche, l'expression du gène *MYC* n'était pas modifiée par l'ajout de MCTA. Les facteurs solubles du TA semblaient donc modifier le phénotype des cellules HOS cultivées en oncosphères en réduisant leurs caractéristiques de CSC (réduction de l'expression de marqueurs souches et hausse de l'expression de marqueurs de différenciation) sans pour autant restaurer l'expression de marqueurs de prolifération.

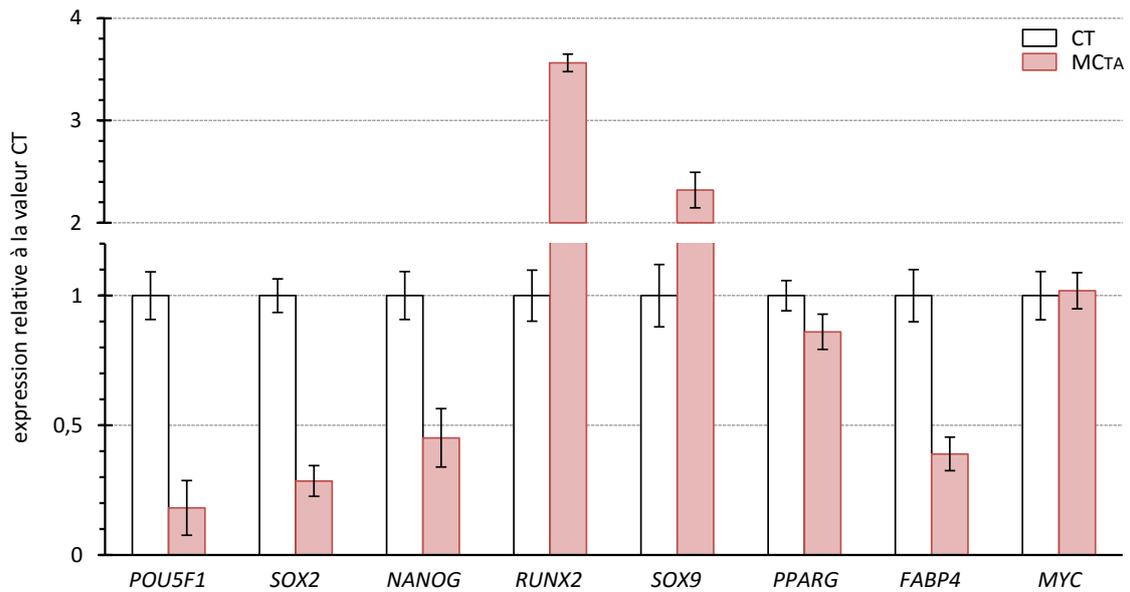


Figure 38 : Influence du MCTA sur l'expression génique de cellules HOS en oncosphères.

Graphique représentant l'expression génique des cellules HOS cultivées en oncosphères en présence de MCTA (MCTA) relative à celle de cellules cultivées en oncosphères sans facteurs de croissance (CT). Les résultats exprimés sont des moyennes de 3 valeurs et représentent 9 expériences. Les barres représentent les écart-types.

Du MCTA a été ajouté à des cellules HOS lors de leur ensemencement en conditions de perte d'adhérence pour observer si la présence des facteurs solubles pouvait favoriser la formation de sphères. Les sphères de plus de 50 μm de diamètre étaient dénombrées sur 3 champs de culture et la valeur de comptage était rapportée au nombre de sphères par cm^2 (figure 39).

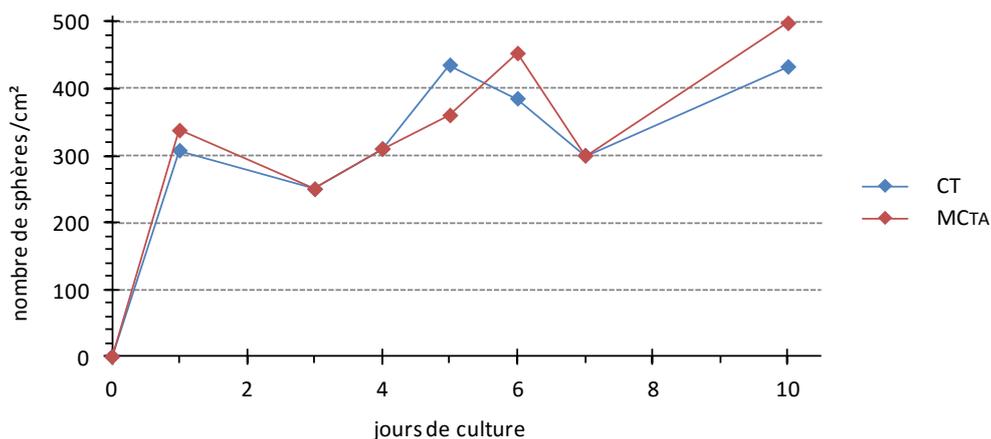


Figure 39 : Influence du MCTA sur la formation d'oncosphères par les cellules HOS.

Graphique représentant l'évolution du nombre de sphères formées par des cellules HOS ensemencées en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance (CT) ou en présence de MCTA et cultivées pendant 10 jours. Les sphères de plus de 50 μm de diamètre ont été comptées sur 7 champs de 40 mm^2 et la valeur de comptage a été rapportée au nombre de sphères par cm^2 .

Les comptages ont montré une augmentation progressive du nombre de sphères d'au moins 50 μm (de 300 à 400 sphères/ cm^2 en 9 jours) lorsque les cellules HOS étaient cultivées sans facteurs de croissance (CT). L'évolution du nombre de sphères HOS en présence de MCTA n'était pas différente de celle observée dans la condition CT.

Évaluation de la quiescence et impact du MCTA

La protéine Ki-67 n'étant présente qu'au sein de cellules en cycle de prolifération, des cellules négatives pour la détection de la protéine Ki-67 (Ki-67⁻) pouvaient donc être considérées comme quiescentes car hors du cycle cellulaire (G_0). La protéine Ki-67 a été détectée dans les cellules HOS par un anticorps spécifique couplé à du FITC. En parallèle, l'ADN a été marqué par de l'iodure de propidium pour distinguer les cellules en cours de réplication (phase S) ou de préparation à la mitose (G_2/M) parmi celles positives pour la détection de la protéine Ki-67 (Ki-67⁺).

Des expériences de cytométrie en flux sur des cellules HOS cultivées en conditions d'adhérence (2-D ; figure 40A) montraient une faible proportion de cellules Ki-67⁻ (4%). Parmi les cellules en prolifération, 28% étaient engagées dans les phases S/ G_2/M du cycle cellulaire. Lorsque les cellules étaient cultivées en oncosphères (3-D ; figure 40B), la part de cellules quiescentes (Ki-67⁻) augmentait fortement (+ 26%) par rapport aux cellules en 2-D. De plus les cellules étaient moins engagées dans les phases du cycle S/ G_2/M (-15%).

Lorsque les cellules HOS en 3-D étaient cultivées en présence de SVF (figure 40C), la part de cellules quiescentes était diminuée (- 11%) par rapport à des cellules en 3-D cultivées sans facteurs de croissance (condition CT). En revanche, l'ajout de MCTA (figure 40D) ne réduisait pas la part de cellules HOS quiescentes (+ 8%). Dans ces 2 conditions de culture, la proportion de cellules HOS dans les phases S/ G_2/M n'était pas modifiée par rapport à des cellules HOS cultivées en conditions CT (environ 13% dans les 3 conditions).

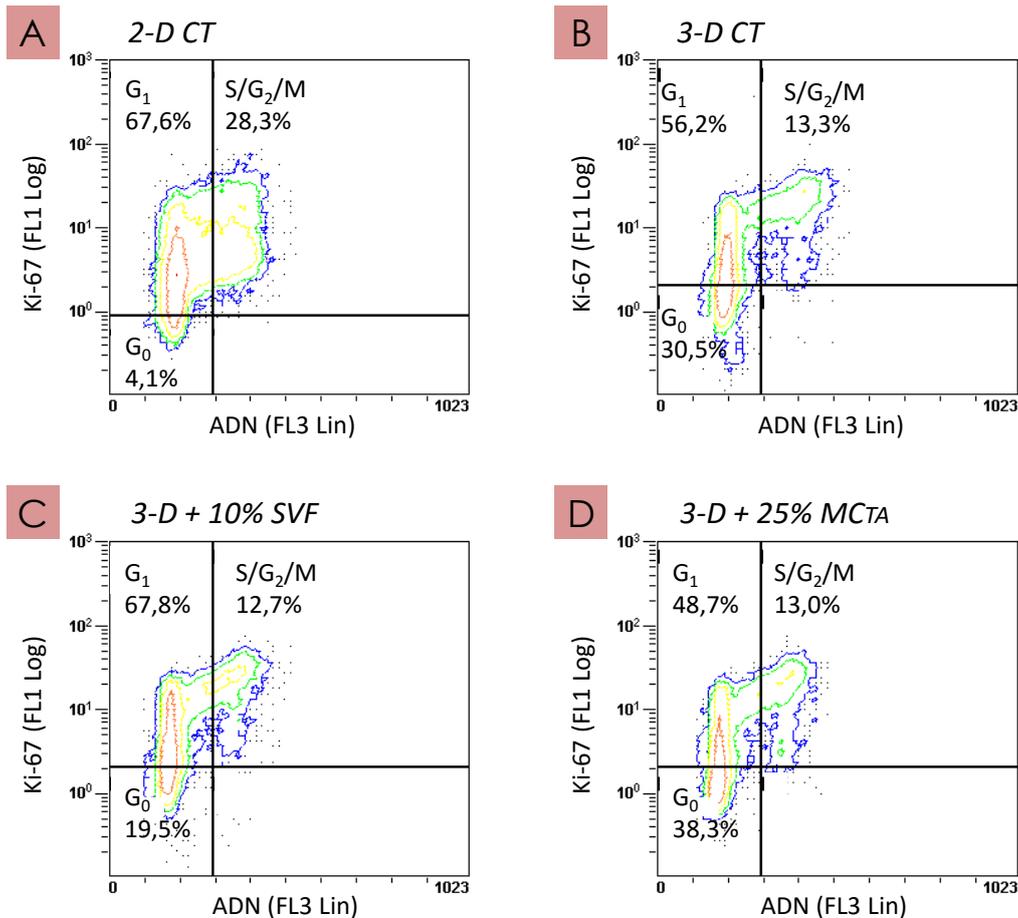


Figure 40 : Observation de la quiescence de cellules HOS en sphères et effet de l'ajout de MCTA.

Graphiques représentant la répartition des cellules HOS en fonction de leur niveau d'expression de la protéine Ki-67 et de leur quantité d'ADN. A- Les cellules HOS étaient cultivées en conditions d'adhérence (2-D). B- Les cellules HOS étaient cultivées pendant 3 jours en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance (3-D) pour induire la formation d'oncosphères. Une fois en oncosphères, les cellules HOS étaient traitées pendant 48 h avec du SVF (C) ou du MCTA (D) dilués dans du milieu sans facteurs de croissance. Les graphiques sont représentatifs de 9 expériences.

La culture en oncosphères des cellules HOS favorisait donc bien leur entrée en quiescence (près de 30% des cellules Ki-67⁻). Cependant, dans ces conditions de culture, les facteurs solubles du TA ne semblaient pas favoriser la sortie de quiescence des cellules HOS.

Des mesures du diamètre des oncosphères n'ont pas montré d'influence du MCTA sur la taille moyenne des sphères formées par les cellules HOS en conditions de perte d'adhérence (figure 41C). Des expériences de marquages de la protéine Ki-67 par immuno-histochimie ont été réalisées sur des cellules HOS cultivées en oncosphères

(figures 41A et 41B). Le marquage de la protéine Ki-67 indiquait que la part de cellules HOS en prolifération dans les oncosphères était similaire (36 à 38% de cellules Ki-67⁺) entre des cellules cultivées en présence de MCTA ou sans facteurs de croissance (condition CT ; figure 41D). Ces résultats confirmaient l'absence d'effet des facteurs solubles du Tissu Adipeux sur la sortie de quiescence des cellules d'ostéosarcome HOS.

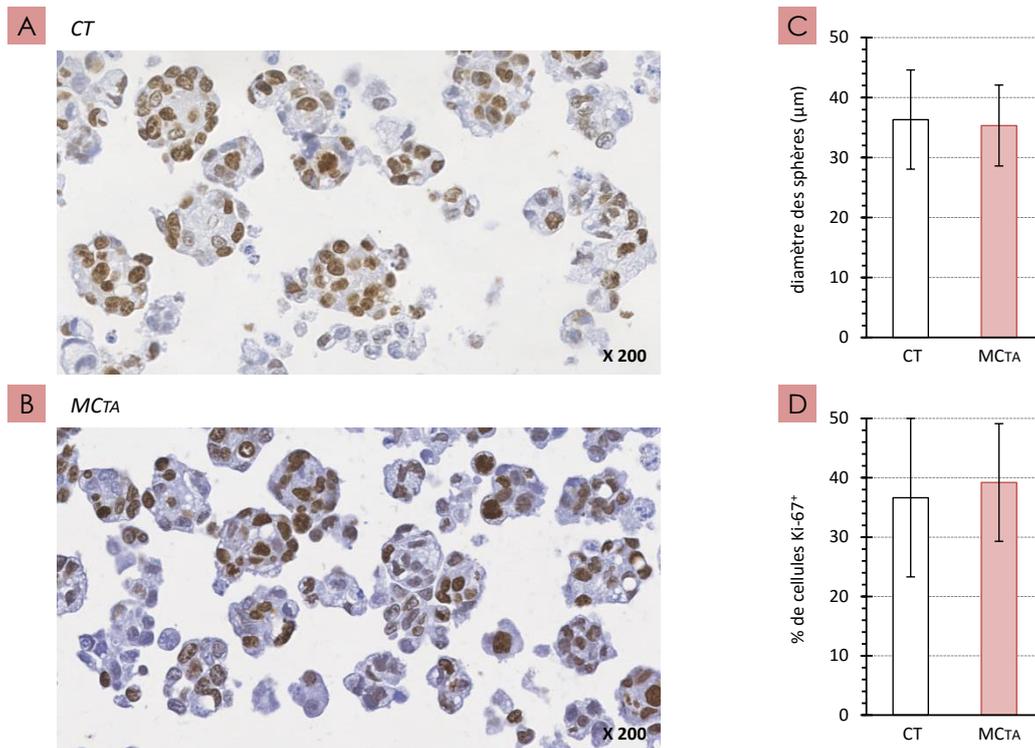


Figure 41 : Observation de la prolifération de cellules HOS cultivées en oncosphères.

Les cellules HOS ont été cultivées en conditions de perte d'adhérence pendant 3 jours sans facteurs de croissance, puis ont été maintenues pendant 48 h dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) ou traitées pendant 48 h avec du MCTA (MCTA). A- Images d'un marquage immuno-histo chimique de la protéine Ki-67 sur des cellules HOS en conditions CT ou MCTA. B- Graphique représentant le % de cellules HOS positives pour la détection de la protéine Ki-67. Les résultats sont une moyenne de 6 comptages sur plus de 2500 cellules chacun. Les barres représentent les écart-types. C- Graphique représentant le diamètre moyen des sphères formées par les cellules HOS en conditions CT et MCTA. La moyenne est établie sur 90 mesures pour chaque condition. Les barres représentent les écart-types.

Impact de la culture en oncosphères sur la reprise de la prolifération

Des cellules HOS cultivées en oncosphères (3-D) ont été remises en culture dans des conditions d'adhérence. Au bout de 24 heures, les sphères s'étaient dissociées et les cellules adhéraient au plastique (figure 42A).

Des tests de prolifération (figure 42B) ont été réalisés sur ces cellules issues de culture en oncosphères sans facteurs de croissance (3-D CT) ou en présence de facteurs

solubles du TA (3-D + MCTA) en comparaison avec des cellules HOS cultivées uniquement dans des conditions d'adhérence (2-D CT). Les cellules cultivées uniquement en 2-D montraient une prolifération augmentée de 30% en présence de SVF et de 20% en présence de MCTA. Lorsque les cellules avaient été cultivées en oncosphères (condition 3-D CT), le SVF augmentait leur prolifération de 80% et le MCTA de 30%. Dans le cas de cellules HOS cultivées en oncosphères et en présence de MCTA (conditions 3-D + MCTA), le SVF augmentait la prolifération de 35% et le MCTA de 55%.

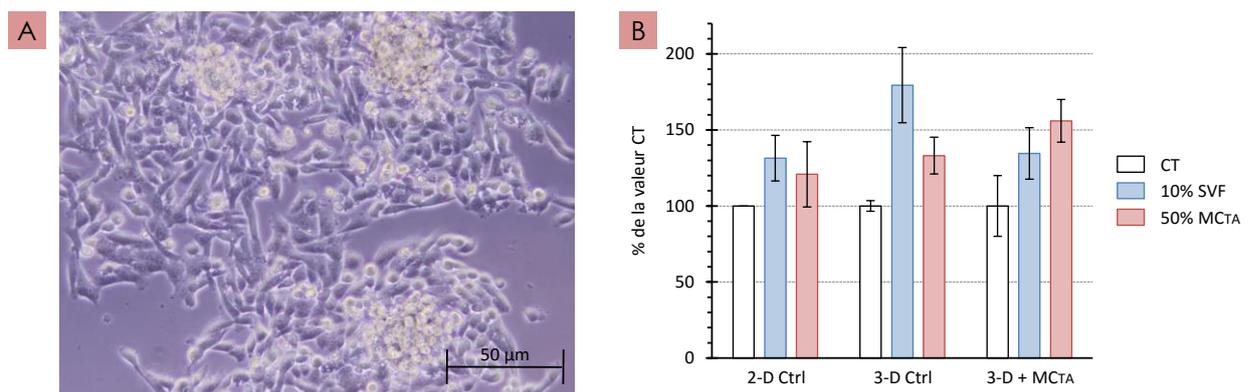


Figure 42 : Prolifération de cellules HOS après une période de quiescence.

Les cellules HOS ont été cultivées en conditions de perte d'adhérence pendant 3 jours sans facteurs de croissance (3-D Ctrl) ou en présence de MCTA (3-D + MCTA). Les oncosphères ont été récupérées pour être remises en culture en conditions d'adhérence et en milieu supplémenté en SVF. A- Image des cellules HOS 24 h après la remise en conditions d'adhérence. B- Graphique représentant la prolifération des cellules HOS standard (2-D Ctrl) ou remises en conditions d'adhérence après avoir été cultivées en oncosphères (3-D Ctrl et 3-D + MCTA). La prolifération est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Ces observations semblaient indiquer que les facteurs solubles du Tissu Adipeux avaient un effet plus fort sur la prolifération de cellules d'ostéosarcome lorsque celles-ci étaient sorties d'une phase de quiescence.

Identification des facteurs solubles responsables de l'effet pro-prolifératif du MCTA

Dosage des Milieux Conditionnés par le TA et les cellules HOS

L'effet observé du Milieu Conditionné de Tissu Adipeux (MCTA) sur la croissance des cellules d'ostéosarcome pouvait représenter l'action paracrine exercée par le TA sur les cellules de la tumeur en développement. Nous avons donc cherché à identifier une molécule soluble présente dans le MCTA et impliquée dans cet effet paracrine (facteur de croissance ou cytokine).

Pour écarter l'implication de molécules pouvant être responsables d'un effet autocrine des cellules d'ostéosarcome sur leur propre prolifération, le Milieu Conditionné de cellules HOS (MC-HOS) était récupéré sur des cellules à 80% de confluence après 24 h de culture dans un milieu standard sans facteur de croissance.

Le dosage du MC-HOS et du MCTA a été réalisé en utilisant la technologie multiplex afin de cibler la concentration en 31 cytokines (figure 43). Les cytokines retrouvées en fortes concentrations dans le MCTA mais pas dans le surnageant des cellules d'ostéosarcome ont plus particulièrement été recherchées afin d'écarter des molécules pouvant être impliquées dans un effet autocrine des HOS. Seules la leptine et l'interleukine-6 (IL-6) remplissaient ces conditions. La leptine n'était pas détectée dans le MC des cellules d'ostéosarcome alors que présente à près de 800 pg/mL dans le MCTA. De fortes concentrations en IL-6 ont été dosées dans le MCTA (500 pg/mL) alors que l'IL-6 était retrouvée en faibles concentrations dans le MC-HOS (5 pg/mL). Un effet pro-tumoral de l'IL-6 et de la leptine sur des cellules d'ostéosarcome en culture avait été suggéré par 2 autres études préalables (Bian et al., 2010; Burguera et al., 2006) et nous a donc incités à étudier l'implication de ces deux cytokines dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules d'ostéosarcome.

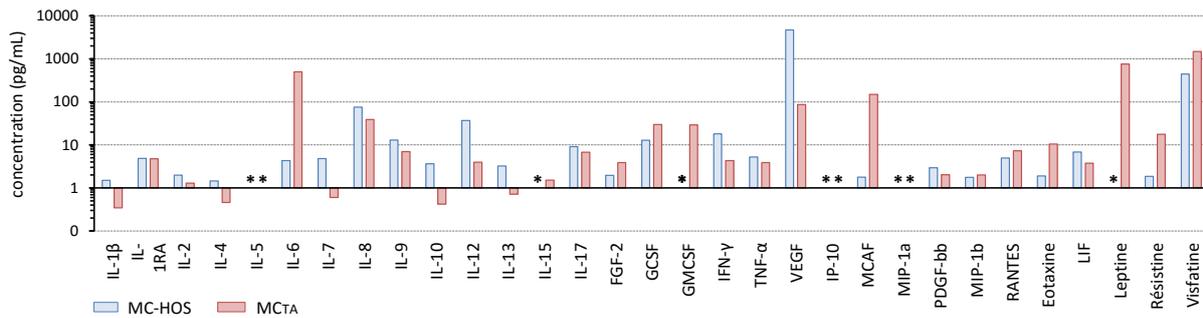


Figure 43 : Dosage multiplex du MCTA.

Graphique représentant la concentration en 31 cytokines dosée dans le MCTA et dans le MC-HOS. Les résultats sont une moyenne de MC de TA provenant de 3 donneurs différents. * : non détecté..

Cytokines et voies de signalisation impliquées dans l'effet pro-prolifératif du MCTA

Pour évaluer si cet effet était véhiculé par l'IL-6, un anticorps dirigé contre la sous-unité gp130 commune à tous les récepteurs de la famille de l'IL-6 a été utilisé. Ces conditions de blocage de la signalisation de l'IL-6 avait été validées précédemment dans notre unité (David et al., 2012). Un test de prolifération a montré que le blocage de la signalisation de l'IL-6 n'avait pas d'impact sur l'effet pro-prolifératif des facteurs solubles produits par le tissu adipeux sur les cellules HOS (figure 44A).

Un Western Blot effectué sur des cellules HOS a montré que la leptine pouvait activer la phosphorylation des facteurs de transduction STAT3 et 5 (respectivement sur les tyrosines 705 et 694 ; figure 44B), ce qui indiquait que les cellules HOS exprimaient un récepteur à la leptine fonctionnel. De la leptine recombinante a ensuite été ajoutée à des cellules HOS dans un test d'activité mitochondriale, mais aucune des deux doses testées (50 et 100 ng/mL) n'induisait de hausse de la prolifération (figure 44C). Du MCTA avait été utilisé comme contrôle de l'activation de la prolifération. Ces expériences ont montré que la leptine n'était pas impliquée dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.

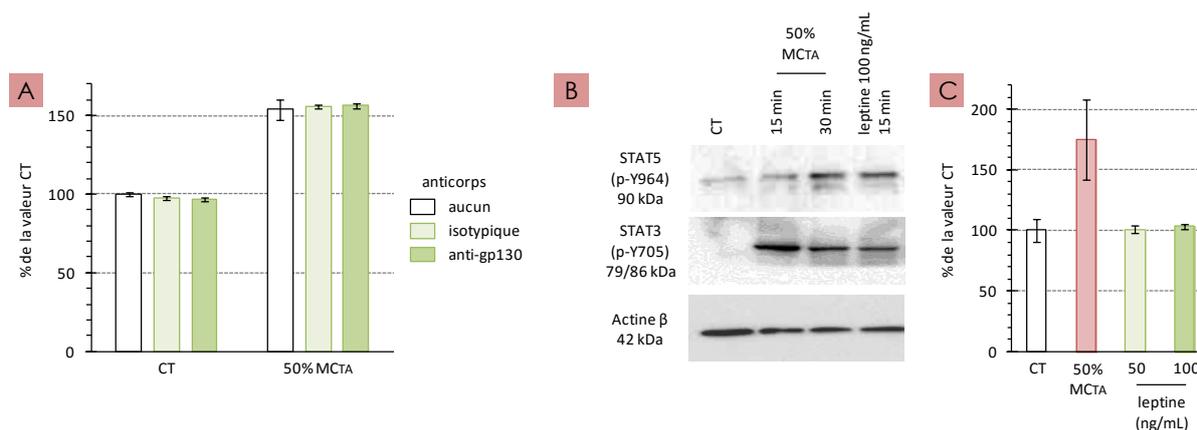


Figure 44 : Implication de l'IL-6 et de la leptine dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.

Les cellules HOS ont été cultivées en présence du traitement indiqué (SVF, leptine ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). A- Graphique représentant la prolifération de cellules HOS cultivées 24 h en milieu CT ou avec du MCTA et supplémentées en anticorps anti-isotype de XX ou anti-gp130 (concentration de XX). B- Images de détection par Western Blot des formes phosphorylées des protéines STAT3 et STAT5. La détection de l'actine-β permet de vérifier le chargement d'une quantité homogène de protéines entre les différents puits. C- Graphique représentant la prolifération de cellules HOS cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (MCTA ou leptine). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations (A, C). Les barres représentent les écart-types.

Voies de signalisation impliquées dans l'effet du MCTA

Les résultats précédents nous ont amenés à s'intéresser aux voies de signalisation impliquées dans l'effet du MCTA sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Ainsi, un Western Blot a permis d'observer que le MCTA pouvait activer la phosphorylation des protéines STAT3 et 5, dès 15 minutes pour STAT3 et après 30 minutes pour STAT5 (figure 44B). Pour tester si l'effet du MCTA sur la prolifération des cellules HOS faisait intervenir les protéines STAT, un inhibiteur chimique (l'AG490) a été ajouté aux cellules cultivées en présence de MCTA ou de SVF. Le test de prolifération a montré que le blocage de la voie des STAT ne bloquait pas l'effet du MCTA sur la prolifération (figure 45).

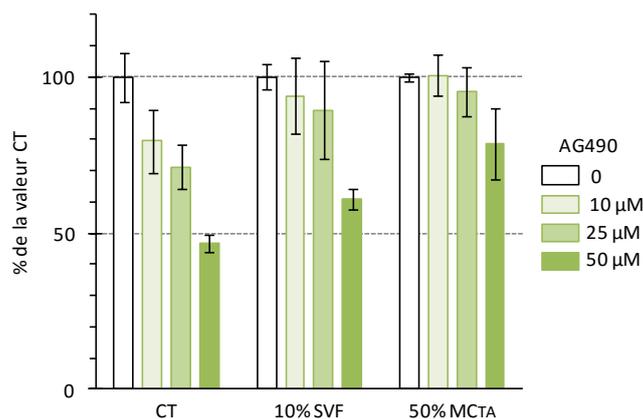


Figure 45 : Implication de la voie de signalisation STAT dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.

Graphique représentant la prolifération de cellules HOS cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) et supplémenté en AG490. Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 13 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Un Western Blot s'intéressant à la cinétique de phosphorylation de deux MAPK (P38 et ERK1/2) dans les cellules HOS (figure 46A) a montré que le MCTA activait faiblement et transitoirement la phosphorylation de P38 (sur thréonine 180 et tyrosine 182, seulement à 10 minutes de traitement) à l'inverse du SVF (phosphorylation soutenue dès 10 minutes de traitement). Dans le cas de la protéine ERK1/2, le niveau de phosphorylation atteint par l'ajout de MCTA à 10 minutes, puis à 60 et 120 minutes de traitement dépassait celui atteint par l'ajout de SVF aux mêmes temps.

Lorsqu'un inhibiteur chimique de la phosphorylation de ERK1/2, l'UO126, était ajouté aux cellules HOS cultivées en présence ou non de SVF ou de MCTA, la prolifération diminuait de manière dose-dépendante (figure 46B). Cependant, à 5 μM d'UO126, la baisse de la prolifération induite par le MCTA atteignait -20%, contre -10% en condition contrôle (CT), et avec 10 μM d'inhibiteur cette baisse atteignait -50% en présence de MCTA contre -30% en condition CT. Ces résultats indiquaient que l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS faisait -au moins en partie- intervenir la voie de signalisation de ERK1/2.

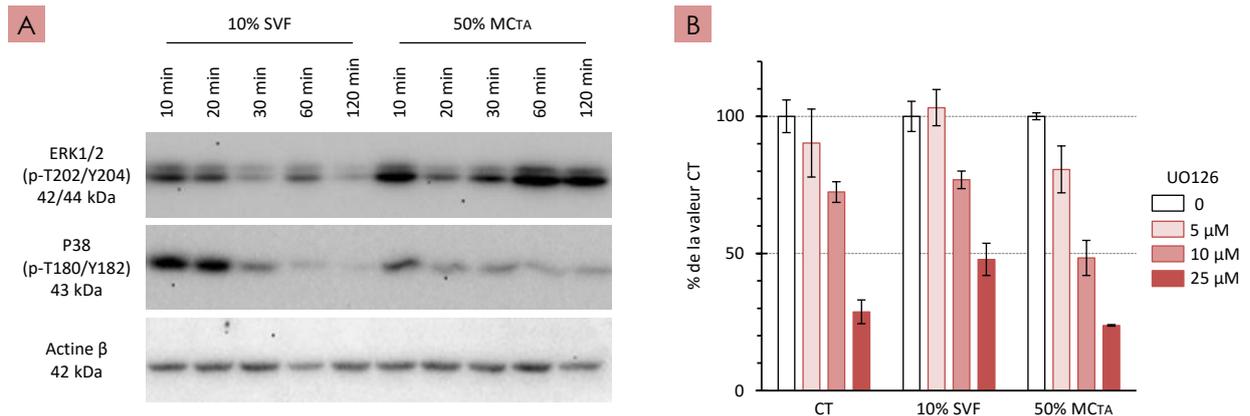


Figure 46 : Implication des MAPK dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.

Les cellules HOS ont été cultivées en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). A- Images de détection par Western Blot des formes phosphorylées des protéines ERK1/2 et P38. La détection de l'actine-β permet de vérifier le chargement d'une quantité homogène de protéines entre les différents puits. B- Graphique représentant la prolifération de cellules HOS cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) et supplémenté en UO126. Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 13 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Implication de petits médiateurs lipidiques solubles : fractionnement du MCTA

Des molécules lipidiques produites par le TA, notamment les adipocytes, peuvent être retrouvées solubilisées dans le MCTA. Parmi ces molécules, l'acide lysophosphatidique (LPA). Avant le début de ces travaux et en collaboration avec Jean-Sébastien Saulnier-Blache de l'Unité INSERM U1048 à Toulouse, un dosage du LPA avait été réalisé dans les MCTA ainsi que dans les MC-HOS. Les quantités faibles mais non-négligeables de LPA retrouvées dans tous les milieux dosés indiquaient que les cellules HOS et le TA en produisaient.

Dans un premier temps, du LPA seul ou associé à de l'albumine sans acides gras (Fatty Acid-Free Albumin, FAFA), a été ajouté à des cellules HOS en culture dans un test de prolifération (figure 47A). Pour les 2 concentrations testées (5 et 20 μM), le LPA seul était capable d'augmenter la prolifération des cellules HOS d'environ 25%. L'ajout de FAFA au milieu de culture sans facteurs de croissance (CT) provoquait une augmentation de la prolifération des HOS de plus 50%. L'ajout de LPA au FAFA n'induisait pas d'augmentation supplémentaire de la prolifération des HOS.

L'implication du LPA dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les HOS a donc été envisagée dans un test de prolifération par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur au LPA : le Ki16425 (figure 47B). L'ajout du Ki16425 n'avait pas d'impact sur

la prolifération induite par le SVF (environ 130% de la valeur CT). Parmi les 3 MCTA testés, le blocage du récepteur au LPA ne baissait la prolifération que pour l'un d'entre eux (MCTA n°3 : de 145% à 114%). Ces résultats semblaient indiquer un effet variable du LPA sur la prolifération des cellules HOS. Cependant, cet effet pro-prolifératif n'a pas pu être rapproché de la concentration en LPA.

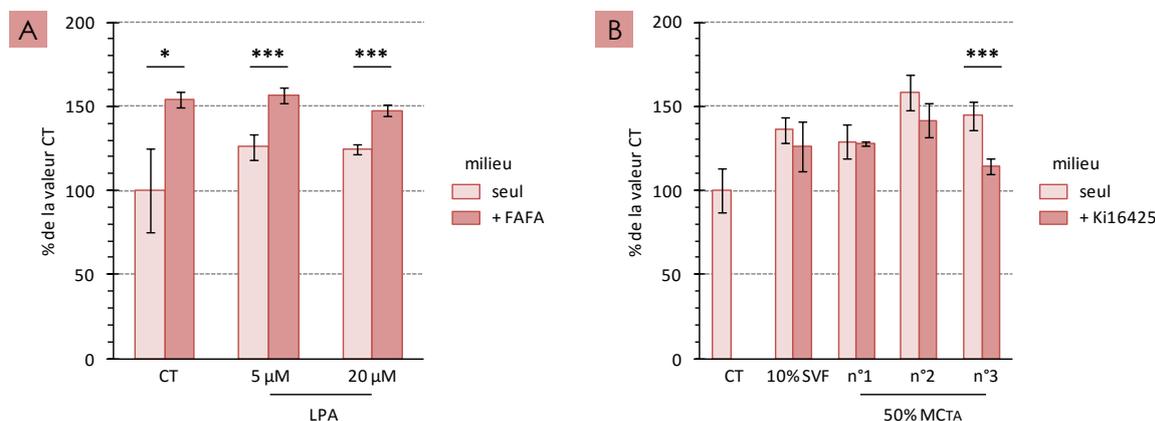


Figure 47 : Implication du LPA dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules HOS.

Graphiques représentant la prolifération des cellules HOS cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (LPA, SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Le milieu de culture est seul ou supplémenté par (A) 250 µg/mL d'Albumine sans acides gras (Fatty Acid-Free Albumin, FFAA) (A) ou par (B) 20 µM de Ki16425, inhibiteur des récepteurs au LPA. La prolifération des cellules HOS est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 (A) et 4 (B) manipulations. Les barres représentent les écart-types. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$.

L'implication d'acides gras libres dans un effet pro-tumoral induit par des CSM sur des cellules tumorales (Roodhart et al., 2011) nous a incités à nous intéresser aux composants de faible poids moléculaire du MCTA, pouvant contenir de tels médiateurs lipidiques solubles. Du MCTA a donc été séparé en 3 fractions selon le poids moléculaire de ses constituants : moins de 3 kDa, de 3 à 50 kDa et plus de 50 kDa. Chacune de ces fractions a été ajoutée à des cellules de 3 lignées humaines d'ostéosarcome (HOS, MG-63 et Saos-2), et l'effet sur la prolifération cellulaire, observé par mesure de l'activité mitochondriale, a été comparé à l'effet du MCTA complet (figure 48).

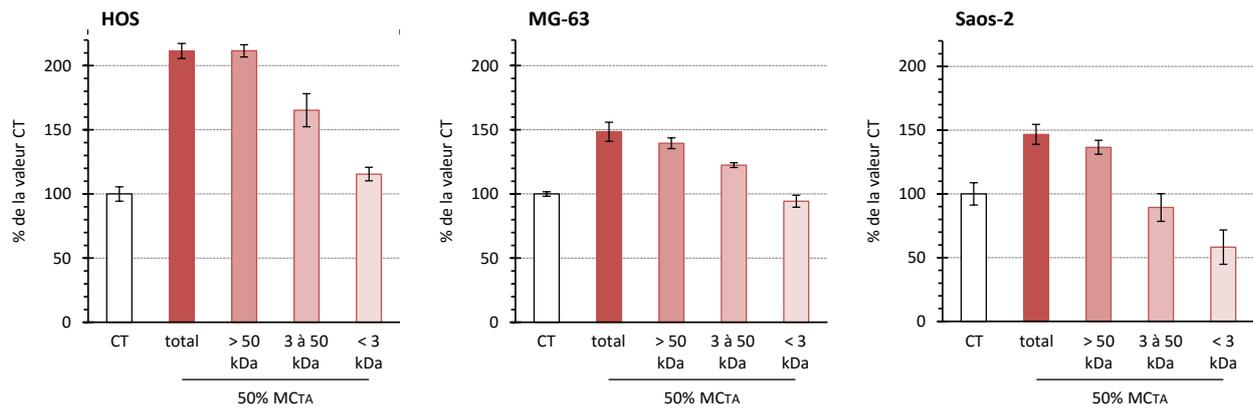


Figure 48 : Effet du MCTA fractionné en fonction du poids moléculaire sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

Graphiques représentant la prolifération des cellules c'ostéosarcome en présence de MCTA fractionné.

Du MCTA a été fractionné en 3 parties en fonction du poids moléculaire de ses composants. Les cellules HOS, MG-63 et Saos-2 ont été cultivées 24 h en présence du MCTA total et de ses différentes fractions, dilués dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 11 manipulations. Les barres représentent les écart-types

Le MCTA total induisait une hausse de la prolifération marquée, bien que variable d'une lignée à l'autre de (145% à 215% la valeur CT). La fraction de MCTA supérieure à 50 kDa avait elle aussi un impact sur la prolifération cellulaire (de 136 à 212%), alors que la fraction de poids moléculaire intermédiaire (de 3 à 50 kDa) avait un effet modéré sur les cellules (165% la valeur CT pour les HOS, mais 122% pour les MG-63 et 90% pour les Saos-2). Enfin, la fraction du MCTA de bas poids moléculaire (moins de 3 kDa) avait un faible effet sur la prolifération cellulaire (116% pour les HOS, 94% pour les MG-63 et 58% pour les Saos-2). De manière surprenante, dans les 3 lignées testées, une seule fraction reproduisait l'effet pro-prolifératif du MCTA complet. Ces résultats semblaient indiquer que l'effet des facteurs solubles du TA serait véhiculé par des molécules de haut poids moléculaire (> 50 kDa), excluant les médiateurs lipidiques tels que l'Acide LysoPhosphatidique (LPA) ou la Sphingosine-1-Phosphate (S1P).

CONCLUSION

L'effet pro-tumoral du tissu Adipeux (TA) observé *in vivo* sur l'ostéosarcome a été caractérisé *in vitro*. Devant la complexité d'utiliser du TA complet directement sur les cellules d'ostéosarcome, les facteurs solubles produits par le TA ont été récupérés en Milieu Conditionné de TA (MCTA).

Le MCTA avait un effet activateur de la prolifération des cellules d'ostéosarcome HOS, MG-63 et Saos-2. Plus particulièrement, le MCTA augmentait la part de cellules HOS en phases G₂/M et G₁ du cycle cellulaire.

L'accumulation de cellules en phase G₂/M n'était pas liée à un blocage du cycle cellulaire puisque le MCTA réduisait la phosphorylation de la protéine cdc2 (sur tyrosine 15). En revanche, le MCTA favorisait la phosphorylation de la protéine Rb (sur sérine 795), pouvant indiquer un blocage du passage en phase S, ce qui concorderait avec l'augmentation du nombre de cellules en phase G₁ en présence de MCTA.

Le ou les facteurs solubles responsables de l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules d'ostéosarcome n'ont pas pu être identifiés malgré des dosages des cytokines et l'utilisation d'inhibiteurs et de protéines recombinantes. En revanche, il a été observé que l'effet pro-prolifératif du MCTA était véhiculé par des molécules de haut poids moléculaire (> 50 kDa) et qu'il faisait intervenir la voie de signalisation ERK1/2.

Pour se rapprocher des conditions de récurrence tumorale, un modèle de culture a été mis en place permettant l'acquisition de caractéristiques de Cellules Souches Cancéreuses (CSC) par les cellules d'ostéosarcome. Ce modèle de culture induisant la formation de sphères favorisait la quiescence et l'expression génique de marqueurs de CSC.

Dans ces conditions de culture, l'ajout de MCTA avait pour effet d'atténuer l'expression des marqueurs de CSC mais n'induisaient pas de sortie de quiescence des cellules d'ostéosarcome.

Ces résultats indiquent que le TA via ses facteurs solubles, exerce un fort effet activateur de la prolifération des cellules d'ostéosarcome en croissance. Néanmoins, dans le cas de cellules d'ostéosarcome en quiescence potentiellement responsables de récurrence tumorale, aucun effet du MCTA sur une reprise de la prolifération cellulaire n'a pu être identifié.

Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans la revue de chirurgie plastique américaine *Plastic and Reconstructive Surgery* (Article 1 en Annexes).

L'effet du TA entier, et particulièrement de ses facteurs solubles, sur le développement de l'ostéosarcome a été observé dans cette partie. Or, la promotion de la croissance tumorale par l'apport de TA peut être due à l'interaction des cellules d'ostéosarcome avec un type cellulaire : les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM).

PARTIE II : IMPLICATION DES CELLULES SOUCHES DU TISSU ADIPEUX DANS LE DÉVELOPPEMENT DES OSTÉOSARCOMES

INTRODUCTION

Greffes de Tissu Adipeux enrichies en Cellules Souches Mésoenchymateuses

La technique de Greffe de Tissu Adipeux (GTA) utilisée en reconstruction des tissus mous est parfois rendue peu efficace par une atrophie du tissu adipeux (Longaker et al., 2014) Une survie variable du TA greffé pourrait dépendre de différents paramètres tels que l'âge du donneur ou le site de prélèvement. Dans leur étude de 2014, Geissler *et al.* ont montré une meilleure viabilité des adipocytes pour des patients plus jeunes (< 45 ans ; Geissler et al., 2014. En revanche, ils n'ont pas mis en évidence de différence de viabilité entre des adipocytes de TA prélevé dans l'abdomen ou les flancs.

Une meilleure survie du greffon au cours du temps a été obtenue par l'enrichissement du TA injecté avec une fraction stromale vasculaire. La technique chirurgicale de greffe utilisant du TA enrichi en fraction stromale vasculaire est appelée Cell-Assisted Lipotransfer (CAL, figure 49).

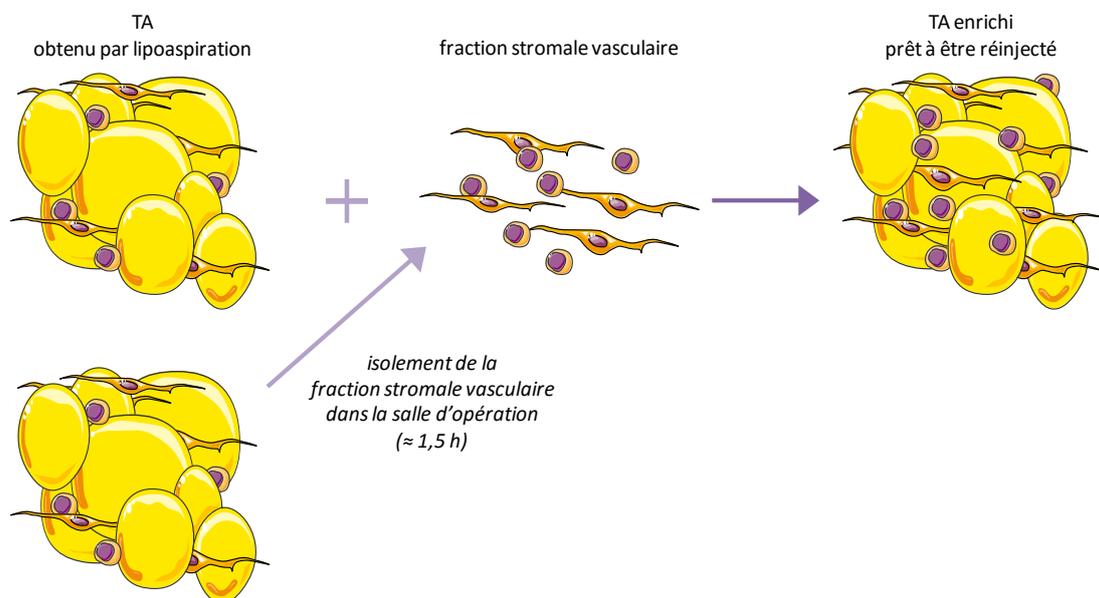


Figure 49 : Schéma du principe de l'enrichissement en fraction stromale vasculaire du TA injecté lors d'une greffe.

Adapté de Yoshimura *et al.*, 2007.

Dans le cas d'une augmentation mammaire, une étude sur 40 patientes montre que la technique CAL induit moins d'atrophie postopératoire et une meilleure préservation du volume de TA injecté qu'une greffe standard en plus d'une satisfaction supérieure des patientes (Yoshimura et al., 2008) .

La fraction stromale vasculaire SV est isolée à partir d'une lipoaspiration après digestion enzymatique du tissu adipeux (Rodbell, 1964). Elle est caractérisée par une plus forte concentration en Cellules Souches Mésenchymateuses dérivées du Tissu Adipeux (CSMTA). En effet, une étude de 2006 a caractérisé les marqueurs membranaires (Classe de Différenciation, CD) des cellules stromales de cette fraction, montrant que ces cellules étaient positives pour les marqueurs CD90 et CD105 (après mise en culture) comme des cellules souches. Cependant elles étaient négatives pour les marqueurs CD31 et CD146 de cellules endothéliales et négatives pour le marqueur CD45 hématopoïétique. Les cellules de la fraction stromale vasculaire ont donc été identifiées comme des CSMTA.

Dans le cas d'une chirurgie conservatrice suite à un cancer du sein, un essai clinique en cours portant sur 71 patientes vise à montrer les intérêts de la technique de Greffe de Tissu Adipeux (GTA) associant la fraction stromale vasculaire (Pérez-Cano et al., 2012). Les premiers résultats sont satisfaisants, d'une part d'un point de vue esthétique pour les patientes et les chirurgiens et d'autre part parce qu'aucun cas de récurrence locale n'a été rapporté.

Dans une étude préclinique de 2009, des CSM isolées à partir de prélèvement de TA humain et cultivées sur plastique ont été co-transplantées avec du TA humain chez la souris nude en sous-cutané. La présence des CSMTA a permis la survie du TA à 60% de son volume initial au lieu de 30% sans CSMTA (Lu et al., 2009). L'étude a également montré que la survie du greffon et sa vascularisation étaient renforcées lorsque les CSMTA co-transplantées exprimaient par transduction la protéine pro-angiogénique VEGF.

En reconstruction faciale, une étude datant de 2010 montre que 7 des 10 patients qui ont reçu une injection de TA seul nécessitent une seconde injection pour obtenir une reconstruction complète (Sterodimas et al., 2011). Dix autres patients, qui ont reçu une injection de TA enrichi en CSMTA, n'ont pas besoin d'une seconde injection, même si 18 mois après la fin des interventions, le résultat de la reconstruction est identique entre les 2 groupes de patients.

Actuellement, un ensemble d'études convergent et montrent l'intérêt qu'auraient les CSMTA dans les greffes de TA pour améliorer la reconstruction tissulaire (Trojahn Kølle et al., 2012).

Greffes de moelle osseuse et de Cellules Stromales Mésoenchymateuses dans la reconstruction osseuse

Plus de 2 millions de greffes osseuse sont réalisées chaque année dans le monde pour réparer un défaut osseux (Giannoudis and Pountos, 2005). En chirurgie orthopédique, la greffe d'os autologue reste privilégiée bien que limitée par le volume du stock osseux du patient (Pollock et al., 2008). La greffe d'os allogénique ou l'utilisation de substitut osseux permet de contourner le problème de quantité de matériel. La jonction du greffon avec l'os reconstruit et la vascularisation du site peuvent être renforcées par l'apport de CSM contenues dans la moelle osseuse (Hernigou et al., 2014).

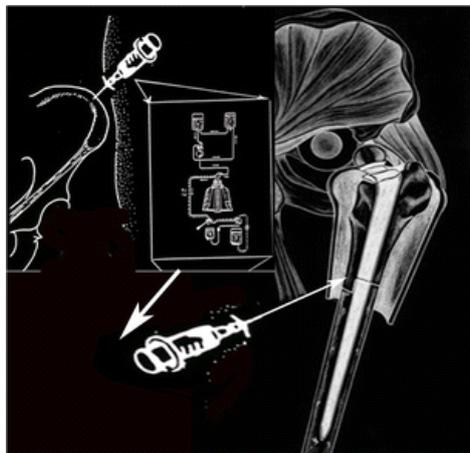


Figure 50 : Schéma du principe de l'injection de MO concentrée en reconstruction osseuse.
Extrait de Hernigou et al., 2014.

Dans la greffe d'os allogénique, l'ajout de moelle osseuse concentrée lors de la reconstruction (pratiqué comme illustré dans la figure 50) est pratiqué depuis près de 20 ans par Hernigou et ses collaborateurs (Hernigou and Beaujean, 1997). Une étude rétrospective menée par cette équipe grâce à sa longue expérience, s'est intéressée à l'application de moelle osseuse concentrée lors de chirurgie reconstructrice faisant suite à la résection d'une tumeur osseuse primitive (Hernigou

et al., 2014). Ainsi, ils ont montré que l'ajout de moelle osseuse concentrée, contenant en moyenne 250 000 CSMMO, ne provoquait pas de récurrences locales, précoces ou tardives grâce à l'analyse de 92 patients suivis en moyenne durant plus de 15 ans.

L'utilisation de moelle osseuse concentrée par injection dans l'ostéonécrose de la tête fémorale constitue un traitement sûr et efficace de cette affection avant d'envisager la pose d'une prothèse de hanche (Hernigou and Beaujean, 2002; Hernigou et al., 2015; Yan et al., 2009). Dans un modèle d'ostéonécrose de la mâchoire induit chez le rat, les facteurs solubles produits par les CSMMO ont montré un intérêt thérapeutique en réduisant la nécrose et l'inflammation et en induisant la formation de tissu osseux (Ogata et al., 2015).

Une alternative à la greffe osseuse est l'implantation de biomatériaux couplés à des CSM. Deux études de 2014 menées dans le cadre du projet européen REBORNE (acronyme pour Regenerating Bone Defects using New biomedical Engineering approaches) mettent en avant les propriétés inductrices de la formation osseuse et du remodelage osseux par des CSMMO humaines transplantées avec des biocéramiques chez la souris nude (Brennan et al., 2014; Gamblin et al., 2014).

Les CSM ne semblent pas présenter de risque dans les traitements de chirurgie reconstructrice faisant suite à la résection d'une tumeur osseuse. Elles semblent au contraire présenter des avantages dans le domaine de la reconstruction osseuse.

Interactions des CSM avec les cellules d'ostéosarcome

Le tropisme naturel vers le site tumoral de CSM circulantes (Rehman et al., 2004; Studeny et al., 2004) est une propriété pouvant être exploitée pour des thérapies cellulaires anticancéreuses. Les CSM sont alors modifiées par transgénèse pour produire et sécréter massivement dans la tumeur des molécules décrites comme ayant un effet anti-tumoral (Grisendi et al., 2011).

Par exemple, dans le cadre de carcinome mammaire et de mélanome induits chez la souris, des CSMMO modifiées pour produire de l'interféron- β (IFN- β) permettaient d'augmenter la survie des animaux de manière plus efficace qu'un traitement par injection d'IFN- β recombinant (Studeny et al., 2002).

Plus récemment, des CSMMO modifiées pour produire la molécule TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) montraient une action pro-apoptotique sur des cellules de carcinome pulmonaire *in vitro* ainsi qu'un effet anti-tumoral *in vivo* dans un modèle préclinique induit chez la souris nude (Mohr et al., 2008). L'action pro-apoptotique des CSMMO exprimant TRAIL a été également décrite *in vitro* sur des cellules de lignées d'ostéosarcome, de sarcome d'Ewing et de rhabdomyosarcome (Grisendi et al., 2015). Dans cette même étude, les CSMMO modifiées pour exprimer la protéine TRAIL présentaient également une activité pro-apoptotique et anti-angiogénique *in vivo* dans un modèle de sarcome d'Ewing induit chez la souris nude.

Les CSMMO ont été décrites pour exercer une activité anti-tumorale sur le sarcome de Kaposi (Khakoo et al., 2006). Dans un modèle préclinique induit chez la souris nude par l'injection sous-cutanée de cellules d'une lignée humaine de sarcome de Kaposi, une seule injection intraveineuse de CSMMO humaines suffisait à provoquer un ralentissement du développement tumoral. Les CSMMO étaient retrouvées dans le stroma de la tumeur et exerçaient leur action anti-tumorale par contact direct avec les cellules de sarcome de Kaposi.

type de cancer	nombre d'études en fonction de l'effet des CSM	
	pro-tumoral	anti-tumoral
sein	3	1
colon	2	1
mélanome	2	1
prostate	2	
poumon	1	1
cerveau	2	1
foie		2
hématopoïétique		3
pancréas		2
sarcome de Kaposi		1

Tableau 1 : Récapitulatif de l'effet des CSM sur les différents types de cancers.
Adapté de Klopp et al., 2011.

En fait, les CSM ont un impact très variable sur le développement local des tumeurs et sur le processus métastatique. Le tableau 1, adapté d'une revue de 2011, recense les études montrant un effet pro- ou anti-tumoral (Klopp et al., 2011). Cette variabilité ne serait pas seulement liée à la tumeur étudiée ou au modèle utilisé, puisque pour

un même type de tumeur, des effets variables voire opposés ont pu être décrits, parfois dans une seule et même étude sur le cancer ovarien (Waterman et al., 2012). Par exemple, dans des modèles précliniques de cancer du côlon, des CSM humaines co-injectées avec des cellules cancéreuses augmentaient l'incidence tumorale (Zhu et al., 2014), la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Shinagawa et al., 2010) alors que des CSMMO immortalisées de rat, ajoutées à des cellules de cancer du côlon transplantées chez le rat, ralentissaient la croissance tumorale (Ohlsson et al., 2003).

Parmi les études référencées en 2011 par Klopp et ses collaborateurs, aucune ne s'intéresse à l'ostéosarcome. Par contre, 2 études rapportent une accélération de la croissance d'ostéosarcomes liée à l'injection de CSMMO, dans des modèles induits par co-injection chez les rongeurs (Bian et al., 2010), et dans un modèle de co-transplantation chez le rat (Tsukamoto et al., 2012).

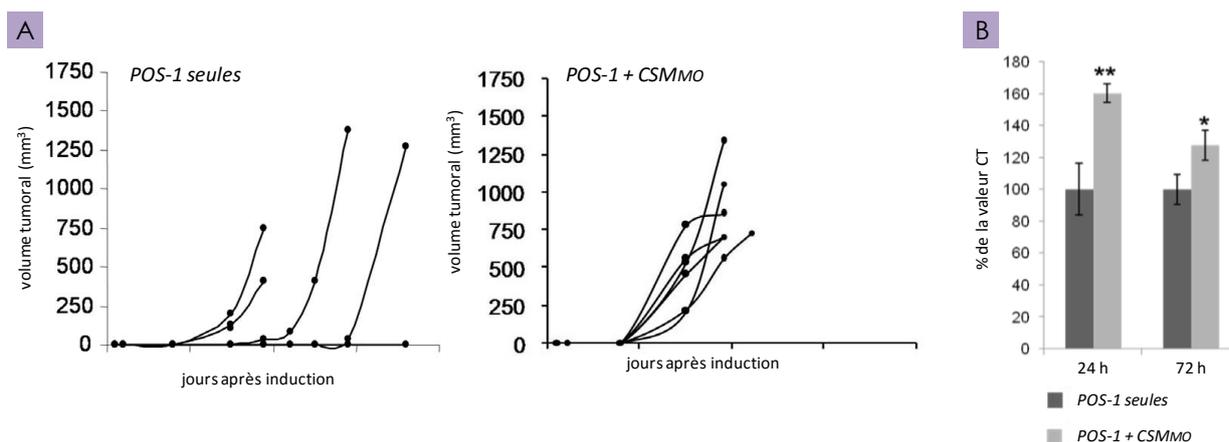


Figure 51 : Impact des CSMMO sur la croissance de l'ostéosarcome.

A- Suivi temporel du développement d'ostéosarcome induit chez la souris C3H/HeN. Les tumeurs ont été induites par des cellules d'ostéosarcome murin POS-1 injectées seules (groupe POS-1 seules) ou co-injectées avec des CSMMO de souris (groupe POS-1 + CSMMO). B- Graphique représentant la prolifération de cellules POS-1 cultivées 24 et 72 h seules ou en présence de CSMMO en co-culture indirecte (sans contact cellulaire via des membranes de Transwell). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT (POS_& seules pendant 24 h). Les barres représentent les écart-types. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$. Extraits de Perrot et al., 2010.

Au laboratoire, la co-injection de CSMMO de souris a été testée dans un modèle préclinique d'ostéosarcome murin induit chez la souris immunocompétente (Perrot et al., 2010). Les CSMMO de souris ont provoqué l'accélération de la croissance tumorale (figure 51A). Dans cette même étude, l'emploi de Milieu Conditionné par des CSMMO (MC-CSMMO) accélérail la prolifération *in vitro* des cellules murines d'ostéosarcome en culture (figure 51B). Cet effet pro-prolifératif des CSMMO sur les

cellules d'ostéosarcome semblait paracrine puisqu'il ne nécessitait pas de contact entre les deux types cellulaires.

Interactions des ostéoclastes avec les cellules d'ostéosarcome

Un des enjeux dans la prise en charge de l'ostéosarcome est l'atteinte osseuse causée par la tumeur. En effet, ces tumeurs se développent à l'intérieur de l'os, détruisent le tissu osseux environnant et s'étendent aux tissus voisins. Une activité ostéolytique est souvent associée au développement de l'ostéosarcome. En effet, un cercle vicieux s'établit entre les cellules d'ostéosarcome et les cellules du tissu osseux, en particulier les ostéoclastes (figure 52). La prolifération des cellules tumorales est favorisée par l'ostéolyse qui est elle-même entretenue par les cellules de la tumeur (Rousseau et al., 2010).

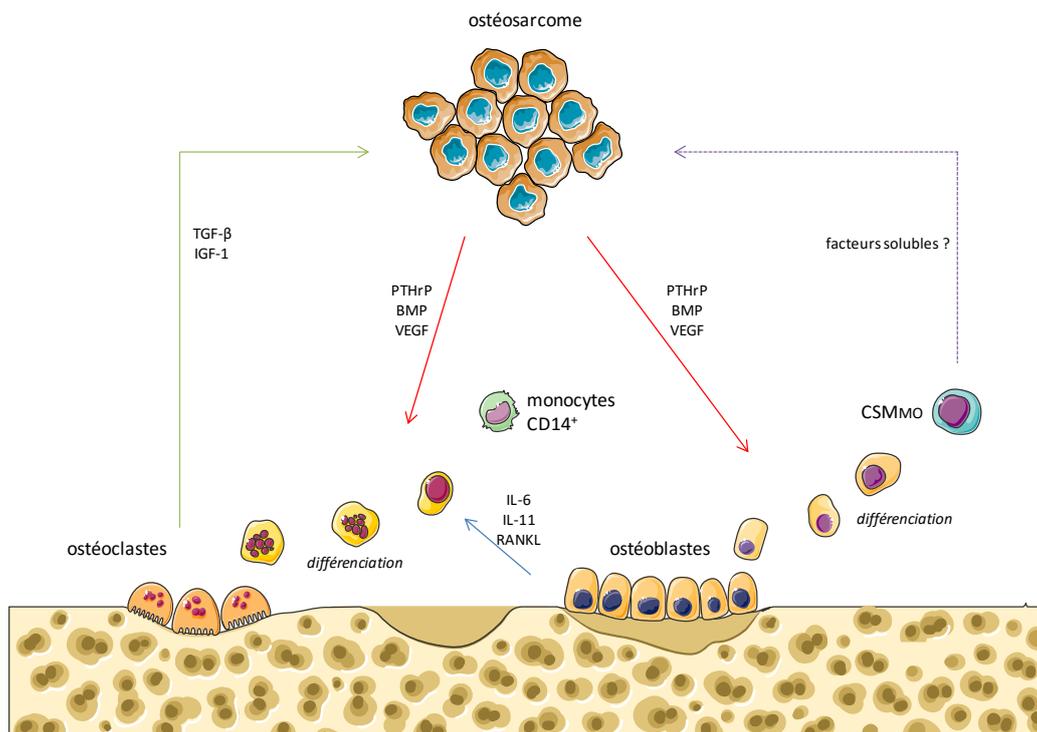


Figure 52 : Schéma du cercle vicieux entre les cellules d'ostéosarcome et les cellules du tissu osseux.

Adapté de Lamoureux et al., 2014.

Dans une étude réalisée dans notre laboratoire, l'utilisation d'une molécule anti-résorptive (acide zolédronique) dans un modèle d'ostéosarcome induit chez le rat permettait de réduire l'incidence métastatique (Heymann et al., 2005). Cependant, une étude portant sur l'analyse transcriptomique tumorale de 23 patients a mis en évidence un lien entre une dissémination métastatique renforcée de l'ostéosarcome et une baisse de l'expression des marqueurs de l'activité ostéoclastique sur le site de la tumeur primaire (Endo-Munoz et al., 2010) .

Devant ces différentes études, il serait intéressant de connaître l'effet d'un apport d'ostéoclastes ou de pré-ostéoclastes dans ces modèles d'ostéosarcome et de comparer cet effet à celui observé lors de l'apport de CSM.

Objectifs : évaluer les interactions des CSM avec les cellules d'ostéosarcome en prolifération ou en quiescence

Le but de ce travail était d'évaluer l'effet de CSMTA sur le développement d'ostéosarcome et de le comparer à celui CSMMO mais aussi à celui de pré-ostéoclastes en utilisant un même modèle de co-injection de humaines cellules d'ostéosarcome.

Dans le développement de l'ostéosarcome, il réside une ambiguïté sur le rôle des ostéoclastes. L'utilisation d'inhibiteurs d'ostéoclastes a montré un potentiel anti-métastatique dans des modèles développés au laboratoire LPRO (Odri et al., 2014; Ory et al., 2005), tandis que la préservation des ostéoclastes aurait un rôle protecteur de la dissémination métastatique dans les modèles décrits par Endo-Munoz et al. (Endo-Munoz et al., 2010). Nous avons donc aussi utilisé la co-injection de pré-ostéoclastes avec de cellules HOS pour évaluer leur potentiel impact sur le développement tumoral.

Puisque les milieux contenant des facteurs solubles produits par les CSM entraînaient une accélération de la prolifération *in vitro* des cellules d'ostéosarcome, nous nous sommes interrogés sur leur effet sur des cellules tumorales en quiescence, obtenues grâce à la culture en conditions de perte d'adhérence. Nous avons aussi cherché à

identifier les facteurs solubles sécrétés par les CSM pouvant activer la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cellules et conditions de culture

Cellules d'ostéosarcome

Les cellules d'ostéosarcome utilisées HOS et Saos-2 sont issues de lignées cellulaires fournies auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC ; n° CRL-1547 et HTB-85 respectivement). Comme cela a été décrit dans la partie I, les cellules étaient cultivées en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) pour apporter les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération cellulaire.

Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM)

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses dérivées du Tissu Adipeux (CSMTA) ont été récupérées à partir de prélèvements de TA réalisés au cours d'interventions chirurgicales comprenant une procédure de lipoaspiration. La lipoaspiration était réalisée au niveau de la paroi abdominale antérieure selon la méthode de Coleman.

Le prélèvement de TA était ensuite dilué dans un volume équivalent de milieu aMEM supplémenté en collagénase A (1 mg/mL) pour être dissocié. Le mélange était homogénéisé puis incubé 45 minutes à 37°C avant d'être centrifugé à 1600 rpm pendant 10 minutes. Le culot cellulaire ainsi obtenu était remis en suspension dans du milieu aMEM supplémenté en Sérum de Veau Foetal (SVF, 10%), en antibiotiques (mélange pénicilline/streptomycine, P/S, 1%) et en Fibroblast Growth Factor de type 2 (FGF2 , 1 ng/mL ; Cordonnier et al., 2011) et mises en culture. Afin d'éliminer les cellules sanguines éventuellement résiduelles, les cellules étaient rincées 3 fois par du DPBS après 24 heures puis remises en culture dans du milieu complet frais. Les CSMTA étaient ainsi sélectionnées puis amplifiées grâce à leur propriété d'adhérence au plastique.

Les Cellules Souches Mésenchymateuses dérivées de Moelle Osseuse (CSMMO) ont été récupérées auprès de patient ayant donné leur consentement éclairé et après l'approbation du comité d'éthique. Les moelles osseuses ont été ponctionnées sur des donneurs sains volontaires au niveau des crêtes iliaques.

Les CSMMO étaient isolées par leur capacité d'adhérence au plastique de culture, puis amplifiées dans du milieu composé de α MEM supplémenté en SVF (10%), antibiotiques (P/S, 1%) et en FGF2 (1 ng/mL).

Le milieu de culture des CSMTA et CSMMO était changé 3 fois par semaine. Une fois le tapis cellulaire à 70-80% de confluence, les cellules étaient décollées puis repiquées à raison de 3000 cellules / cm².

Au bout d'une vingtaine de passages, les CSM gardaient leur capacité de prolifération lorsqu'elles étaient cultivées en présence de FGF2.

Caractérisation des CSM

Les CSMMO et CSMTA ont été caractérisées par analyse en cytométrie en flux. Après culture, les cellules ont été décollées de leur support puis centrifugées (2500 rpm pendant 3 minutes) pour obtenir un culot de cellules. Les étapes suivantes se sont toutes déroulées sur glace ou à 4°C. Le culot de cellules a été rincé 3 fois avec du PBS puis incubé dans du PBS supplémenté en SVF (10%) pendant 15 minutes avant d'être à nouveau rincé avec du PBS. Cent mille cellules étaient ensuite marquées pendant 15 minutes et à l'obscurité par un anticorps dirigé contre un marqueur membranaire (CD34, CD45, CD90 ou CD105), directement couplé à un fluorochrome : phycoérythrine (PE) ou isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Un anticorps anti-isotype était utilisé comme contrôle. Les anticorps étaient dilués dans du PBS supplémenté en SVF (10%). Une dernière centrifugation a été effectuée pour permettre de remettre les cellules en suspension dans du PBS seul. L'observation de la fluorescence portée par les cellules a été réalisée sur le cytomètre en flux FC500 et selon les instructions du constructeur (Beckman-Coulter). L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel CXP Analysis.

Les CSM_{TA} (figure 53A) et CSM_{MO} (figure 53B) utilisées lors des expérimentations étaient positives pour les protéines membranaires CD90 et CD105, et négatives pour les protéines CD45 et CD34.

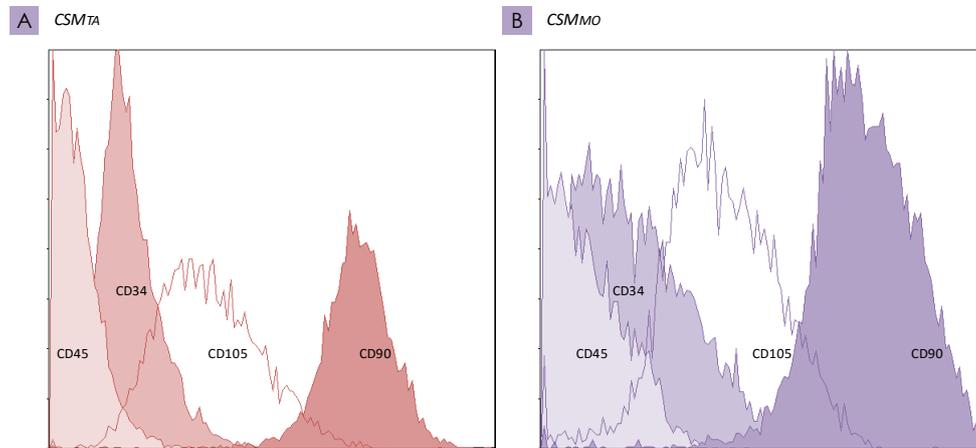


Figure 53 : Caractérisation membranaire des CSM.

Graphiques représentant les profils d'expression des protéines membranaires CD34, CD45, CD90 et CD105 par les CSM_{TA} (A) et CSM_{MO} (B). Les résultats, observés par cytométrie en flux, sont exprimés en nombre de cellules en fonction de leur intensité relative d'expression pour chaque protéine.

Différenciation adipocytaire des CSM_{TA}

Les CSM_{TA} ont été cultivées dans un milieu renouvelé 3 fois par semaine et permettant d'orienter la différenciation des cellules dans la lignée adipocytaire. Pour obtenir ce milieu, du DMEM riche en glucose (1 M) était supplémenté en SVF (10%), en antibiotiques (P/S, 0,4%) et en inducteurs de la différenciation : isobutylméthylxanthine (IBMX, 0,5 M), indométacine (60 µM) et dexaméthasone (10 µM).

Après 3 semaines de culture en milieu de différenciation, une coloration du tapis cellulaire au rouge Nil était réalisée afin d'observer les gouttelettes lipidiques. Les cellules étaient fixées dans du PBS supplémenté en formaldéhyde (4%) pendant 10 minutes puis rincées au PBS. Une solution de rouge Nil diluée au 1/1000^{ème} dans du PBS était ensuite ajoutée sur les cellules pendant 30 minutes, à l'obscurité et à 4°C. Le tapis cellulaire était rincé avec du PBS, puis les noyaux cellulaires étaient colorés par l'ajout de DAPI. Les lipides colorés pouvaient alors être observés par microscopie à fluorescence.

Précurseurs ostéoclastiques

Les monocytes ont été obtenus à partir de cellules issues d'un échantillon de sang humain provenant de l'Établissement Français du Sang (EFS), après une sélection positive grâce au marqueur membranaire CD14 (Duplomb et al., 2008).

Dans un premier temps, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) étaient récupérées à partir d'un prélèvement sanguin dilué au demi dans du PBS et déposé sur une solution de Ficoll. Une centrifugation de 20 minutes à 2000 rpm conduisait à la formation d'un anneau contenant les PBMC sous la phase plasmatique. La fraction cellulaire était récupérée et mise en suspension dans du PBS avant d'être centrifugée 10 minutes à 1600 rpm.

Les monocytes pouvaient alors être isolés parmi les PBMC grâce à la présence de la protéine CD14 à leur membrane. Des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD14 et diluées dans du PBS étaient ajoutées aux PBMC pendant 15 minutes à 4°C. Le culot cellulaire obtenu après 10 minutes de centrifugation à 1600 rpm était remis en suspension dans du PBS pour être déposé sur une colonne aimantée. Après 3 lavages au PBS, la colonne contenant les monocytes était retirée de l'aimant et les cellules étaient diluées dans du PBS.

Afin d'être prédifférenciés en ostéoclastes, les monocytes étaient cultivés en conditions d'adhérence dans du milieu α MEM supplémenté en SVF (10%), en antibiotiques (1%) et en facteur stimulant l'adhérence et la survie des macrophages humains (hM-CSF, 25 ng/mL). Après 3 jours de culture, du ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire κ B (RANKL, 100 ng/mL) était ajouté aux monocytes pendant 7 jours pour initier leur différenciation dans la voie ostéoclastique.

Obtention des milieux conditionnés de cellules en culture

Les cellules étaient cultivées pour atteindre 80-90% de confluence. Le milieu de culture était alors enlevé et le tapis cellulaire était rincé 3 fois avec du PBS. Les cellules étaient ensuite cultivées avec du milieu α MEM non supplémenté en SVF. Au bout de 24 heures, le milieu était récupéré et filtré à travers un filtre-seringue de 0,22 μ m pour enlever tous les éventuels débris cellulaires. Le milieu ainsi obtenu correspondait à du Milieu Conditionné (MC).

Modèle d'ostéosarcome in vivo

Toutes les manipulations ont été menées au sein de l'unité de Thérapie Expérimentale de Nantes (UTE, plateau technique de la faculté de médecine de Nantes), et dans le respect des directives de la communauté européenne validées par le comité d'éthique local.

Les animaux utilisés dans les modèles précliniques décrits par la suite étaient des femelles âgées de 5 semaines. Ces souris sont issues de la souche NMRI Nu/Nu (nude), leur système immunitaire déficient permettant de limiter leur réaction suite à l'injection de cellules humaines. Les expérimentations sur les souris ont été initiées après une semaine d'acclimatation.

Induction tumorale

Le modèle d'ostéosarcome chez la souris était induit par l'injection de cellules d'ostéosarcome HOS dans la loge antéro-externe du muscle fibial antérieur gauche, espace permettant une mesure tridimensionnelle aisée du volume tumoral.

Pour l'induction tumorale, les souris étaient anesthésiées par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane (2,5%, Flucka) avec un débit de 1 L/min, puis placées sous une lampe chauffante. La zone d'injection était désinfectée par l'application d'une solution iodée (Bétadine). Les animaux recevaient alors une injection de 50 μ L de suspension cellulaire contenant 2 millions de cellules HOS diluées dans du PBS. Les cellules tumorales étaient co-injectées ou non par des CSMTA, des CSMMO ou des monocytes CD14⁺ (de 0,2 à 1 millions de cellules pour atteindre un ratio cellules/HOS allant de 10/1 à 2/1).

Suivi expérimental

Volume tumoral

L'évolution du volume tumoral était surveillée à l'aide d'un pied à coulisse, par mesure de 2 diamètres perpendiculaires. Le volume était calculé (en mm³) selon la formule :

$$V = (l^2 * L)/2$$

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

Les animaux étaient euthanasiés lorsque le volume tumoral dépassait 2500 mm³ ou lorsque la nécrose tumorale entraînait des ulcérations cutanées. L'euthanasie était réalisée par dislocation cervicale sur des souris anesthésiées par inhalation d'isoflurane. Les tumeurs étaient alors prélevées pour être examinées microscopiquement par histologie. Les pattes portant les tumeurs étaient également récupérées pour réaliser des analyses radiologiques (radiographies et micro-scanner) permettant d'observer l'influence du développement tumoral sur les os de la jambe (ostéolyse ou ostéoformation, sur tibia et fibula).

Bioluminescence

La présence de cellules transduites pour exprimer la luciférase dans les poumons des souris était évaluée par la détection de leur activité de luminescence au moment de l'euthanasie. Les animaux étaient anesthésiés avant de recevoir une injection intra-péritonéale de luciférine D (10 mg/mL) à la dose de 1 mg/g puis étaient euthanasiés après 7 minutes. Les poumons étaient ensuite rapidement explantés et la détection de bioluminescence était réalisée sur un appareil NightOwl LB981 avec un objectif CCD NC 320 et selon les paramètres suivants : filtre de 560 nm, pixels de 12 x 12, exposition de 2 x 1,5 minutes.

Paramètres de biomorphométrie osseuse

Les tibias des souris portant une tumeur sont débarrassés des tissus mous puis fixés en formaldéhyde 10%. Les images sont obtenues avec un micro-tomodensitomètre (μ CT) à haute résolution Skyscan 1076 selon les paramètres suivants : pixel de 18 μ m, 50 kV, filtre Al de 0,5 mm, acquisition de 15 min. La reconstruction tridimensionnelle est analysée grâce au logiciel NRecon et les paramètres de morphométrie osseuse sont quantifiés par le logiciel CTan. Le calcul des paramètres de morphométrie en 3 dimensions est réalisé sur le tibia à 2 mm du point d'insertion de la fibula et selon la nomenclature proposée par l'American Society for Bone and Mineral Research.

Analyses histologiques

Selon le type de marquage histologique à réaliser, le traitement des prélèvements (membre, tumeur ou cellules) variait pour permettre la conservation du composant d'intérêt.

Une fois le montage de l'échantillon entre lame et lamelle réalisé, les colorations étaient observées au scanner de lames Nanozoomer (Hamamatsu) et la fluorescence était observée au microscope inversé à fluorescence.

La congélation des prélèvements sans déshydratation par bains d'alcool permettait la conservation des lipides ainsi que des molécules fluorescentes. Les échantillons étaient incubés dans des solutions de sucrose dilué en concentrations croissantes dans du PBS (6 à 30%, bains de 48 h). Les échantillons étaient ensuite recouverts de gel d'inclusion NEG.50 puis plongés dans un bain d'isopentane refroidi à -50°C , faisant durcir le gel d'inclusion pour obtenir un bloc pouvant être conservé à -80°C . Des coupes de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur du prélèvement congelé étaient alors réalisées dans une atmosphère maintenue à -20°C à l'aide d'un cryostat et déposées sur une lame de verre (Superfrost, Menzel).

Les autres analyses histologiques ont été réalisées sur des prélèvements inclus en paraffine après fixation dans un bain de PBS + PFA à 4% à 4°C (bain de 48 h pour les prélèvements de tumeur et de 15 minutes pour des cellules cultivées en oncosphères). Après la fixation, les échantillons étaient déshydratés par incubation dans des bains d'éthanol en concentration croissante (de 70° à 100°) puis dans un bain de but-2-ol avant d'être inclus dans un bain de paraffine à 56°C . Les échantillons étaient alors moulés en bloc dans de la paraffine liquide et refroidis ensuite sur une plaque réfrigérante.

Les blocs pouvaient alors être découpés sur un microtome. Les coupes de $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur étaient ensuite placées sur une lame de verre et laissées à l'air libre pour sécher pendant 24 h. Une fois séchées, les lames étaient débarrassées de leur

paraffine par des bains successifs d'éthanol en concentration décroissante (de 100° à 80°) puis maintenues dans de l'eau distillée.

Observation de la protéine EGFP par fluorescence

La fluorescence générée par la protéine EGFP présente dans les CSMTA transduites pouvait être observée au microscope par fluorescence directe ou après un marquage de la protéine EGF à l'aide d'un anticorps spécifique.

Brièvement, les lames sont rincées 3 fois 5 minutes dans un tampon TBS à pH 7,4 supplémenté en Tween-20 (0,05% ; TBStween) puis incubées 30 minutes température ambiante dans une solution de saturation composée de TBStween supplémenté en sérum de chèvre (isotype de l'anticorps secondaire ; 2%). L'anticorps primaire dirigé contre la protéine EGFP, produit chez la souris (Abcam) et dilué au 1000^{ème} dans une solution de saturation était ensuite ajouté aux échantillons pendant 1 h à 37°C. Les lames étaient ensuite rincées par du TBStween pendant 3 fois 5 minutes puis incubées pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Life Technologies) dirigé contre l'isotype de souris, produit chez la chèvre, couplé au fluorochrome AlexaFluor954 et dilué au 500^{ème} dans une solution de saturation. Enfin, les échantillons étaient rincés par du TBStween et montés entre lame et lamelle à l'aide d'un montage aqueux.

Observation de l'activité ostéoclastique : coloration TRAP

La coloration de l'enzyme exprimée par les ostéoclastes était réalisée selon un protocole commercial de coloration TRAP (Acid Phosphatase Leukocyte Staining Kit, Sigma). Des coupes d'échantillons inclus en paraffine ont été incubées, après déparaffinage, dans une solution de coloration pendant 90 minutes à 37°C. Cette solution se composait de sel de Fast Red TR (3,9 mM), de sel de naphthol AS-TR sodium diphosphate (2,3 mM), de diméthylformamide (68 µM) et d'acide tartrique (100 mM), dilués dans un tampon d'acétate de sodium (0,1 M ; pH 5,2). Les noyaux étaient ensuite contre-colorés à l'hématoxyline de Mayer et les lames rincées à l'eau avant montage aqueux.

Détection de cellules humaines : hybridation in situ ciblant les sondes Alu

L'hybridation *in situ* ciblait les sondes Alu, qui représentent environ 5% de l'ensemble du génome humain, sur des coupes issues de l'inclusion en paraffine.

Les peroxydases endogènes aux échantillons étaient inactivées par l'ajout d'H₂O₂ à 3% pendant 15 minutes, puis les coupes étaient incubées pendant 10 minutes à 37°C en présence de protéinase K (10 %g/mL). Les lames étaient ensuite laissées 20 minutes à température ambiante dans un bain de triéthanolamine (0,1 M ; pH 8) supplémenté avec 0,25% d'acide acétique, avant d'être incubées pendant 3 heures à 56°C dans un tampon d'hybridation. Ce tampon était composé d'une solution SSC (Sodium et Chlorure de Citrate) 4X, de formamide dé-ionisé à 50%, de solution de Denhardt 1X, de sulfate de dextran à 5% et de 100 µg/mL de sperme de saumon, dilués dans de l'eau distillée (sans RNases ni DNases). Le tampon d'hybridation était ensuite complété par 70 nM d'une sonde Alu couplée à la digoxine (5DigN/5'-TCTCGATCTCCTGACCTCATGA-3'/3DigN ; Exiqon). Une première étape de dénaturation des ADN des coupes de 5 minutes à 95°C précédait l'étape d'hybridation durant 19 heures à 56°C.

La sonde était ensuite détectée par immuno-histochimie à l'aide d'un anticorps murin anti-digoxine couplé à la HRP (Jackson Immunoresearch) dilué au 200ème dans du TBStween ajouté aux lames pendant 45 minutes à 37°C.

L'ajout pendant quelques secondes et à l'obscurité, d'un mélange d'H₂O₂ et de DAB se colorant en brun par oxydation permettait en suite la détection de la protéine Ki-67. Les échantillons étaient ensuite rincés à l'eau distillée (2 fois 5 minutes) avant d'être contre-colorés à l'hématoxyline de Gill-2 et déshydratés par bains successifs d'éthanol en concentration croissantes (de 80° à 100°) puis conservés dans du xylène (OTTIX-Plus) pour être montés entre lame et lamelle dans un milieu hydrophobe (Pertex).

Évaluation de la croissance cellulaire in vitro

Les protocoles utilisés pour observer l'activité mitochondriale et le cycle cellulaire des cellules d'ostéosarcome étaient identiques à ceux décrits dans la Partie I.

De la même façon, les dosages multiplex de cytokines ont été réalisés dans les mêmes conditions que dans la Partie I

RÉSULTATS

Les ADSC et MSC accélèrent la croissance de l'ostéosarcome primitif

Impact des CSMTA sur la croissance de l'ostéosarcome

Des études mises en place par Pierre Perrot lors de ses travaux de thèse visaient à évaluer l'impact des CSM dérivées du tissu adipeux (CSMTA) dans un modèle d'ostéosarcome humain induit chez la souris nude. Co-injectées avec les cellules tumorales HOS, les CSMTA réduisaient le temps de développement de la tumeur (volume tumoral de 1000 mm³ atteint à J25 au lieu de J29 ; figure 54A). Les CSMTA accélèrent de la croissance de l'ostéosarcome de manière dose-dépendante, mais n'influaient pas sur les paramètres de morphométrie osseuse (figure 54B) ni sur l'incidence métastatique (évaluée macroscopiquement à l'euthanasie).

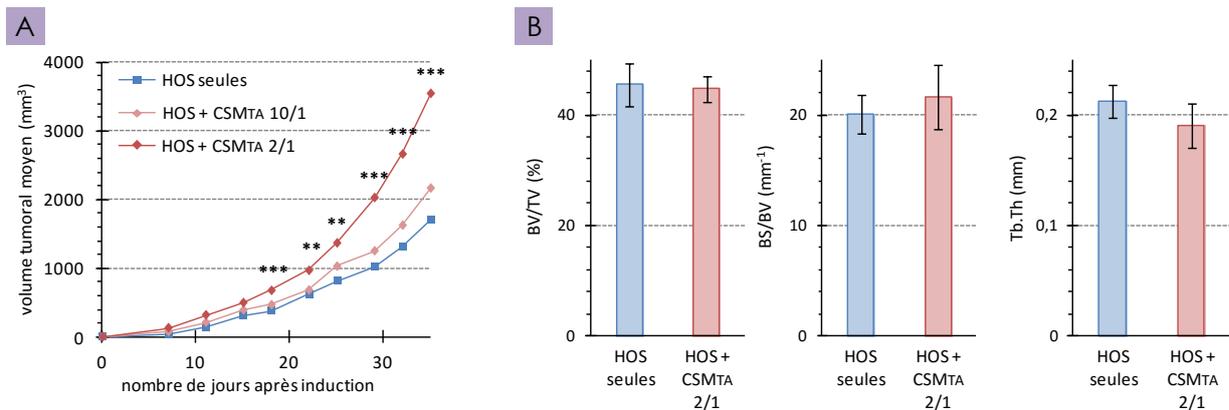


Figure 54 : Impact des CSMTA sur la croissance tumorale et le remodelage osseux l'ostéosarcome.

Les tumeurs ont été induites par des cellules d'ostéosarcome HOS injectées seules (groupe HOS seules) ou co-injectées avec des CSMTA humaines en quantités 2 à 10 fois inférieures (groupes HOS + CSMTA 2/1 et 10/1 respectivement). A- Suivi temporel du développement d'ostéosarcome induit chez la souris nude. B- Graphiques comparant les paramètres de morphométrie osseuse entre les tibias de souris des groupes HOS seules et HOS + CSMTA 2/1. Le volume osseux est exprimé en % du volume total de la pièce analysée (Bone Volume / Total Volume, BV/TV) ; Le XXX (exprimé en mm⁻¹) est le rapport entre la surface osseuse (en mm²) et le volume osseux (en mm³) ; et l'épaisseur des travées osseuses (Trabecular Thickness, Tb. Th) est exprimée en mm. Les résultats sont une moyenne de XX échantillons. Les barres représentent les écart-types.

Afin de déterminer si les CSMTA participaient directement à la formation de la masse tumorale finale, les cellules souches dérivées du tissu adipeux ont été modifiées par

transduction lentivirale. Cette modification a permis aux CSM_{TA} d'exprimer constitutivement et stablement la protéine EGFP (EGFP⁺). Les cellules ont ensuite été co-injectées avec des cellules HOS (2 millions de HOS pour 1 million de CSM_{TA}-EGFP⁺, ratio 2 /1) dans des souris nudes. Dix jours après l'induction tumorale, des CSM_{TA}-EGFP⁺ étaient détectées au sein de la tumeur, de manière dispersée entre les cellules tumorales et incluses dans des parties fibreuses de tissu conjonctif (Figure 55). La présence de cellules EGFP⁺ était évaluée par observation directe de la fluorescence (figure 55A) et par détection de la protéine EGFP par un anticorps couplé à un fluorochrome (figures 55B et 55C). Néanmoins, aucune cellule EGFP⁺ n'était observable au 24^{ème} jour. Ces observations indiquent que les ADSC représentant 33% du volume initial ne constituaient plus que 5% de ce volume après 10 jours pour être totalement absentes après 24 jours d'expansion tumorale. Ainsi, l'accélération de la croissance tumorale lors de la co-injection des HOS avec les ADSC ne serait due qu'à la prolifération des cellules d'ostéosarcome HOS et non à la prolifération des cellules souches du tissu adipeux.

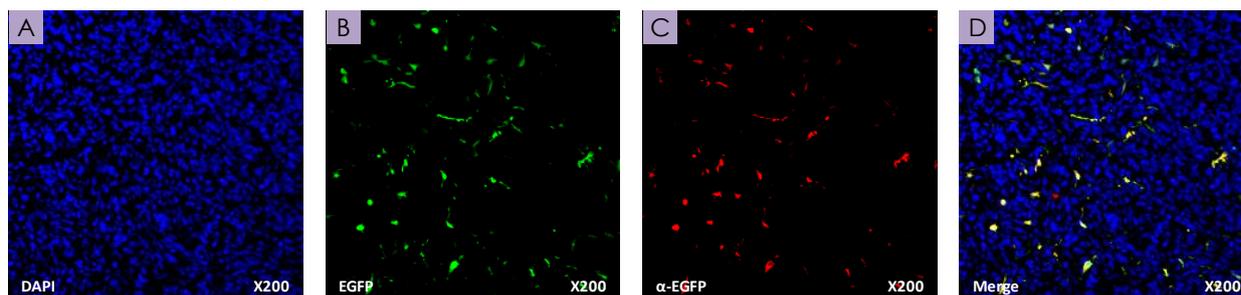


Figure 55 : Détection des CSM_{TA} co-injectées dans l'ostéosarcome à un stade précoce.

Images de l'observation en microscopie à fluorescence sur des coupes de tumeurs 1à jours après leur induction par la co-injection de cellules HOS avec des CSM_{TA} exprimant la protéine EGFP (ratio 2/1). A- Noyaux colorés en bleu par du DAPI. B- Fluorescence verte directe de l'EGFP. C- Détection de l'EGFP par un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome rouge (AlexaFluor). D- Superposition des images A, B et C. Le jaune correspond à la colocalisation de fluorescence rouge et verte.

Comparaison de l'effet pro-tumoral des CSM_{TA} et des CSM_{MO}

Pour comparer les effets pro-tumoraux des CSM issues de Tissu Adipeux ou de Moelle Osseuse, les 2 types cellulaires ont été co-injectés avec des cellules HOS dans un modèle murin d'ostéosarcome induit chez la souris nude (2 millions de HOS + 1 million de CSM, ratio de 2/1).

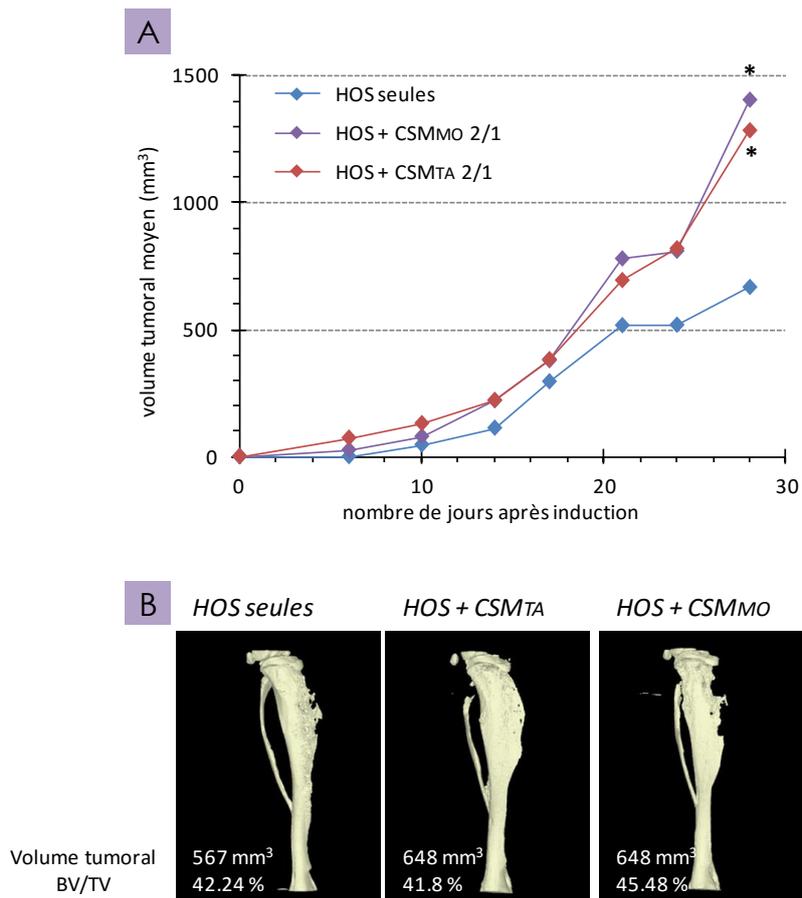


Figure 56 : Comparaison de l'effet pro-tumoral des CSMta et des CSMmo sur la croissance de l'ostéosarcome.

Les tumeurs ont été induites dans des souris nues par des cellules d'ostéosarcome HOS injectées seules (groupe HOS seules) ou co-injectées avec des CSM dérivées de MO ou de TA en quantités 2 fois inférieures (groupes HOS + CSMmo et HOS + CSMta respectivement). A- Suivi temporel du développement tumoral. * : $p < 0,05$. B- Images de reconstructions tridimensionnelles de scanner réalisés sur des tibias portant les tumeurs issus de souris des 3 groupes. Le volume de la tumeur présentée est indiqué, ainsi que le ratio -exprimé en %- du volume osseux sur le volume total de la pièce anatomique (Bone Volume / Total Volume, BV/TV).

La croissance de l'ostéosarcome était significativement accélérée par la présence de CSMta ou de CSMmo. Cette accélération était tout à fait comparable entre les 2 groupes co-injectés (figure 56A). De plus, des analyses du remodelage osseux sur les os de la jambe portant la tumeur (figure 56B) indiquaient que la densité osseuse était similaire entre des os issus des 3 groupes et pour des tumeurs de volume équivalent.

Ces résultats indiquaient que l'effet pro-tumoral des CSM n'était pas différent en fonction de leur provenance tissulaire.

Impact des cellules CD14⁺ sur le développement tumoral

L'ostéolyse provoquée par la présence de l'ostéosarcome est connue pour avoir un effet pro-tumoral sur la tumeur osseuse. L'accélération du développement de l'ostéosarcome du fait de l'activité ostéoclastique n'a cependant été démontrée que dans des modèles précliniques murins en utilisant des molécules anti-résorptives (Heymann et al., 2005; Rousseau et al., 2011). Des précurseurs ostéoclastiques exprimant la protéine de surface CD14 (CD14⁺) ont été obtenues à partir de monocytes isolés parmi les cellules mononucléées de sang périphérique provenant de l'Établissement Français du Sang. Les monocytes ont ensuite été traités par les cytokines M-CSF et RANKL pour permettre leur engagement vers la différenciation ostéoclastique. Ces pré-ostéoclastes CD14⁺, ainsi que des CSMMO ont été co-injectées avec des cellules d'ostéosarcome HOS exprimant l'enzyme luciférase issue de la luciole (LucF ; 1 million de CD14⁺ ou de CSMMO pour 2 millions de HOS, ratio 2/1).

Comme observé précédemment, la co-injection de CSMMO provoquait une accélération significative de la croissance tumorale (figure 57A). En revanche, la présence de CD14⁺ n'avait aucun impact sur le développement de l'ostéosarcome.

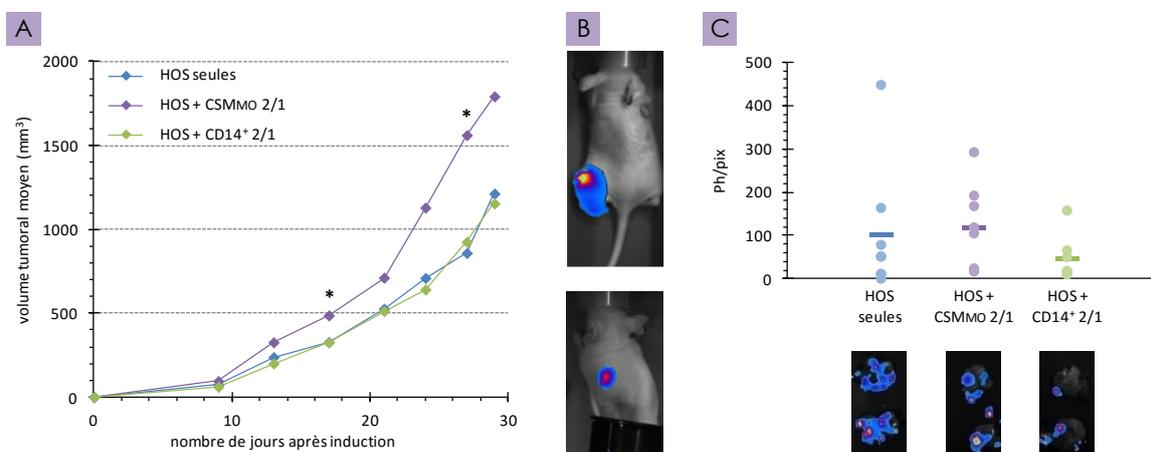


Figure 57 : Comparaison de l'effet des CSMMO et des CD14⁺ sur la croissance de l'ostéosarcome.

Les tumeurs ont été induites dans des souris nues par des cellules d'ostéosarcome HOS injectées seules (groupe HOS seules) ou co-injectées avec des CSM dérivées de MO ou des monocytes sanguins CD14⁺, en quantités 2 fois inférieures (groupes HOS + CSMMO et HOS + CD14⁺ respectivement). A- Suivi temporel du développement tumoral. * : $p < 0,05$. B- Images d'observation de la bioluminescence sur des souris vivantes. L'image du haut montre la détection de la luminescence émise par la tumeur primaire ; l'image du bas montre la luminescence émise par les poumons lorsque le site de la tumeur primaire est masqué par un cache. C- Graphique représentant la quantité de lumière émise par les poumons des souris des 3 groupes, avec les images représentatives de 2 des 6 poumons observés.

La propriété de bioluminescence des HOS exprimant l'enzyme LucF a été employée pour détecter la présence de métastases pulmonaires par administration du substrat de l'enzyme LucF, la luciférine D. Lorsque la bioluminescence était observée sur l'animal entier, la détection d'un signal provenant des poumons était rendue compliquée par la forte lumière émise par la tumeur primaire (figure 57B haut) et même quand celle-ci était masquée (figure 57B bas), le signal émis par les poumons était peu précis. Après l'euthanasie des animaux au 30ème jour, les poumons étaient excisés et la détection de la luminescence indiquait la présence de métastases chez tous les individus (figure 57C) alors que l'observation macroscopique ne permettait une détection de nodules pulmonaires que dans 50% des souris. La quantification de la bioluminescence émise par les poumons des souris ne montrait pas de différence significative entre les tumeurs induites par injection de HOS seules ou co-injectées avec des CSMMO ou des pré-ostéoclastes CD14⁺.

Dans le but d'observer d'éventuels ostéoclastes humains au contact de l'os ou à proximité de la tumeur, des analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes successives -ou sériées- des tibias portant les tumeurs induites par la co-injection de HOS avec des pré-ostéoclastes (figure 58).

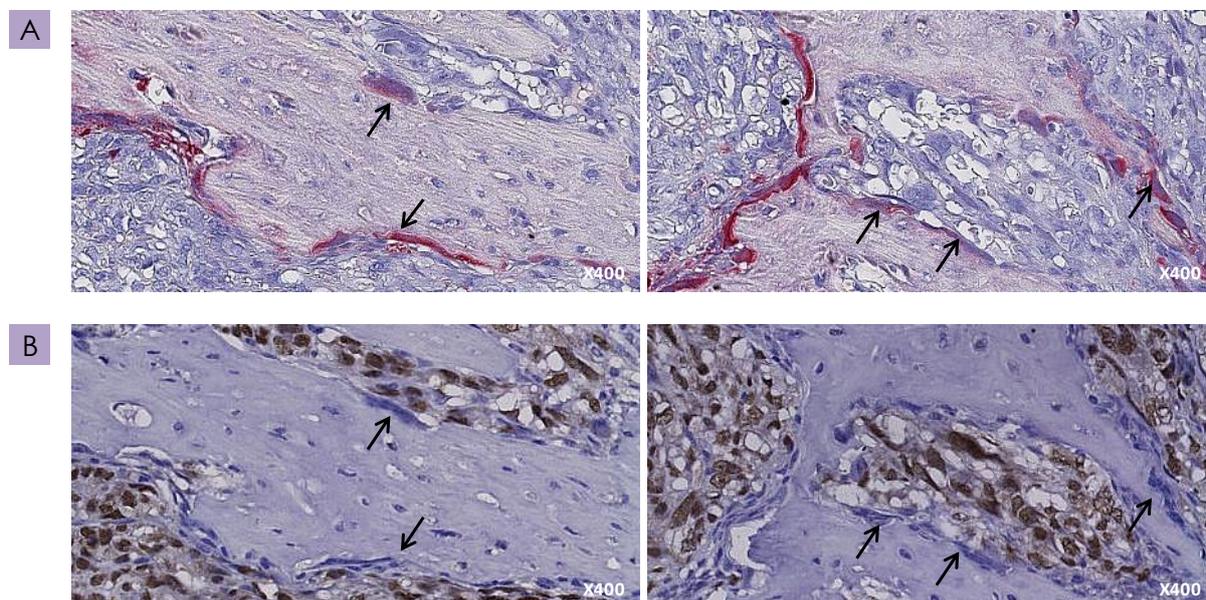


Figure 58 : Recherche d'ostéoclastes humains dans les tumeurs induites par co-injection de cellules HOS et CD14⁺.

Analyses histologiques réalisées sur des coupes sériées obtenues à partir des os portant les tumeurs induites par co-injection de cellules d'ostéosarcome HOS et pré-ostéoclastiques CD14⁺. Les ostéoclastes sont indiqués par des flèches. A- Images de l'activité ostéoclastique par détection histochimique de l'enzyme TRAP. B- Images de la détection de cellules humaines par hybridation in situ de séquences ADN Alu.

Sur la première coupe sériée, l'activité de l'enzyme phosphatase acide résistante au tartrate (Tartrate-Resistant Acid-Phosphatase, TRAP) spécifique des ostéoclastes a été détectée par coloration enzymatique (figure 58A). La coloration rouge de l'enzyme TRAP était observable au contact de l'os, notamment dans des cellules plurinucléées, permettant d'identifier des ostéoclastes.

Sur la seconde coupe sériée, les cellules humaines ont été détectées par immunohistochimie grâce à un anticorps dirigé contre des séquences *Alu*, répétitions de séquences ADN propres aux cellules humaines (figure 58B). La détection des séquences *Alu* a permis l'identification de nombreuses cellules humaines tumorales, mais pas d'identifier des ostéoclastes comportant des noyaux d'origine humaine (pas de colocalisation des signaux TRAP et *Alu*). Les pré-ostéoclastes CD14⁺ n'étaient donc pas détectés 30 jours après l'induction tumorale, comme observé précédemment pour les CSM co-injectées.

Ces résultats semblaient indiquer que les cellules CD14⁺ pré-ostéoclastiques qui étaient co-injectées avec les cellules HOS ne participaient ni au remodelage osseux, ni au développement tumoral, même pas de façon précoce, comme cela a pu être observé avec les CSM.

Effet pro-prolifératif des facteurs solubles des CSMTA sur les cellules d'ostéosarcome

Suite à l'effet observé des CSMTA sur la croissance de l'ostéosarcome *in vivo*, l'implication de ces cellules et plus particulièrement de leurs facteurs solubles et sécrétés, sur la croissance des cellules d'ostéosarcome *in vitro* a été étudiée. Du milieu α MEM sans facteurs de croissance était ajouté aux CSMTA à 80-90% de confluence. Le milieu récupéré après 24 heures était appelé Milieu Conditionné de CSM (MC-CSMTA) et contenait les facteurs solubles produits par les CSMTA.

Effet des facteurs solubles produits par les CSM sur la prolifération et la quiescence des cellules HOS

Du milieu conditionné par des CSMTA en culture (MC-CSMTA) a été ajouté à des cellules de lignées humaines d'ostéosarcome HOS et Saos-2 et pouvait accélérer la

prolifération cellulaire de manière dose-dépendante (figure 59A). Le MC-CSMTA dilué au demi pouvait augmenter la croissance cellulaire des HOS de 50% et des Saos-2 de 30% ; alors que dilué au dixième, le MC-CSMTA accélérât la prolifération des HOS de 10% et n'avait pas d'impact sur la prolifération des Saos-2. Les cellules HOS semblaient être la lignée la plus sensible aux facteurs solubles des CSMTA.

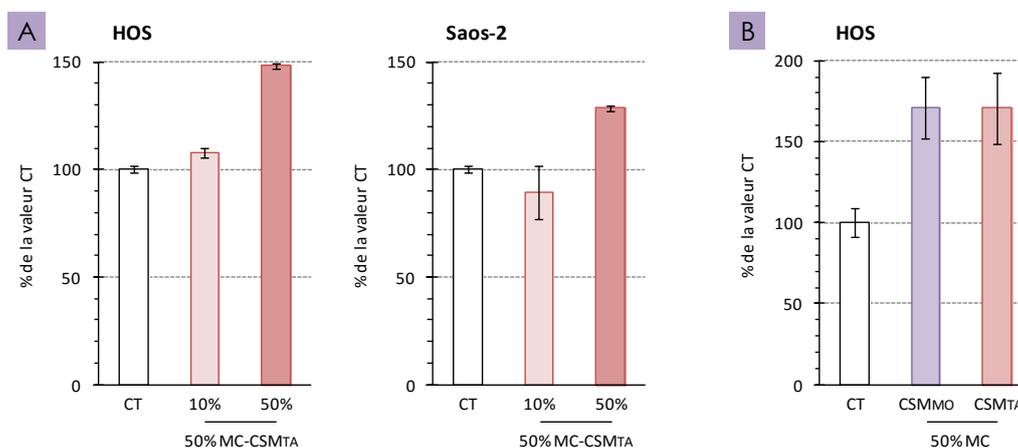


Figure 59 : Prolifération de cellules d'ostéosarcome en présence de MC-CSM.

Graphiques représentant la prolifération des cellules de 2 lignées humaines d'ostéosarcome (HOS et Saos-2). La prolifération est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. A- Les cellules ont été cultivées 24 h en présence de milieu conditionné de CSMTA dilué à 10 et 50% dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). B- Les cellules HOS ont été cultivées 24 h en présence de milieu conditionné de CSMTA ou de CSMMO dilués à 50% dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 12 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Pour comparer les effets des facteurs solubles produits par les CSM issues de Tissu Adipeux (CSMTA) ou de Moelle Osseuse (CSMMO), du MC des 2 types cellulaires (MC-CSMTA et MC-CSMMO, respectivement) a été ajouté à des cellules HOS en culture et un test de prolifération a été réalisé (figure 59B). La prolifération des cellules HOS était augmentée de façon similaire par les MC des CSMTA et des CSMMO (+ 71% pour les 2 types de CSM). L'effet comparable des CSMMO et des CSMTA sur la croissance tumorale *in vivo* pouvait donc être observé *in vitro* sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

Dans le but de mieux caractériser l'effet des facteurs solubles des cellules souches mésenchymateuses sur le cycle des cellules d'ostéosarcome, du milieu conditionné par des CSMTA (MC-CSMTA) ou des CSMMO (MC-CSMMO) a été ajouté sur des cellules HOS cultivées en condition de prolifération et la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été observée en cytométrie en flux (figure

60). Les cellules HOS cultivées sans facteurs de croissance (condition CT ; figure 60A) étaient principalement en phases G_0/G_1 (45%) et en phase de réplication S (38%). L'ajout de 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; figure 60B) induisait une baisse du nombre de cellules en phase de réplication S (- 10%) associée à une hausse du nombre de cellules en phase de préparation à la mitose G_2/M (+ 10%) par rapport à des cellules cultivées en conditions CT.

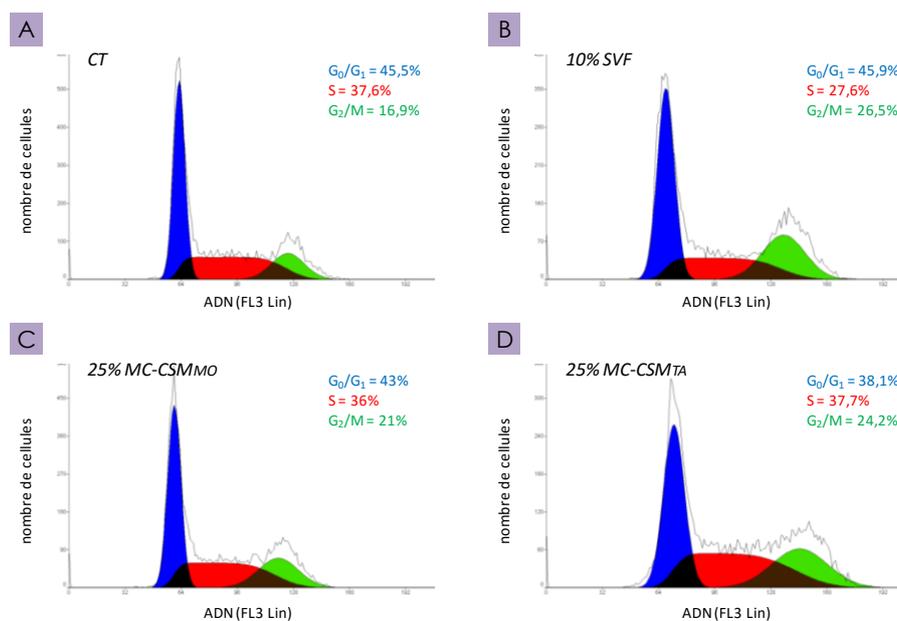


Figure 60 : Cycle cellulaire de cellules HOS en présence de MC-CSM.

Graphiques représentant la quantité d'ADN par cellule, observée par cytométrie en flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF, B ; MC-CSM_{MO}, C ; ou MC-CSM_{TA}, D) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT, A). Les % indiquent la part de cellules dans chacune des différentes phases du cycle cellulaire. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

En comparaison, l'ajout de 25% de MC-CSM_{MO} (figure 60C) ne provoquait que des variations légères dans la répartition des cellules HOS dans les différentes phases du cycle : légère réduction de la part de cellules en phase G_0/G_1 (- 2,5%) et en phase S (- 1,5%) et légère augmentation de la part de cellules en phase G_2/M (+ 4%). Dans un même temps, la présence de 25% de MC-CSM_{TA} dans le milieu de culture (figure 60D) avaient pour effet une baisse plus marquée de la part de cellules en phase G_0/G_1 (- 7%) associée à une hausse du nombre de cellules ayant achevé leur réplication (G_2/M : + 7%) alors que la part de cellules encours de réplication restait inchangée. Ces observations semblaient indiquer un impact différent sur les phases du cycle cellulaire des milieux conditionnés de CSMTA et de CSM_{MO}. Le premier

accélérait l'achèvement de la réplication des cellules entrées en phase S quand le second n'a pas semblé avoir d'impact sur le cycle cellulaire.

Afin de se rapprocher de conditions de récurrence tumorale et pour observer l'effet des CSMTA sur la croissance de cellules d'ostéosarcome proches de cellules souches cancéreuses, les expériences de culture en conditions de perte d'adhérence ont été réalisées. La quiescence des cellules -évaluée par le niveau d'expression de la protéine Ki-67- ainsi que la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire -évaluée par la quantité d'ADN par cellules- ont été observées par cytométrie en flux.

Lorsque les cellules étaient cultivées en conditions d'adhérence (2-D) et sans facteurs de croissance (CT ; figure 61A), 92% d'entre elles étaient positives pour la détection de la protéine Ki-67 (Ki-67⁺) et parmi ces cellules en prolifération, près de la moitié (49% des cellules totales) étaient en phase G₁ du cycle cellulaire. Cultivées en 2-D et en présence de SVF (figure 61B), les cellules HOS Ki-67⁺ étaient plus nombreuses (97%) tandis que la part de cellules en phase G₁ restait presque inchangée (49,5%). Placées en conditions de perte d'adhérence (3-D) et sans facteurs de croissance (figure 61C), les cellules HOS négatives pour la détection de la protéine Ki-67 (Ki-67⁻) étaient plus nombreuses (35%) et la part de cellules dans les phases S/G₂/M du cycle cellulaire était réduite (16%). Ces résultats indiquaient que la culture des cellules HOS en conditions de perte d'adhérence permettait de modéliser la quiescence des cellules HOS.

Dans ces conditions de culture en oncosphères, l'ajout de SVF (figure 61D) induisait une baisse de la part de cellules en phase G₀ du cycle cellulaire (-15%) au profit d'une augmentation du nombre de cellules en phase G₁ (+ 13%). En revanche, des cellules HOS en 3-D cultivées en présence de MC-CSMMO (figure 61E) ou de MC-CSMTA (figure 61F) étaient moins nombreuses à exprimer la protéine Ki-67 (62% et 63% respectivement contre 65% en conditions CT). Par ailleurs, la part des cellules en phases S/G₂/M était légèrement réduite (- 1% et -3% respectivement). Les facteurs solubles produits par les CSM dérivées de la moelle osseuse et du tissu adipeux n'induisaient donc pas la sortie de quiescence des cellules HOS cultivées en oncosphères.

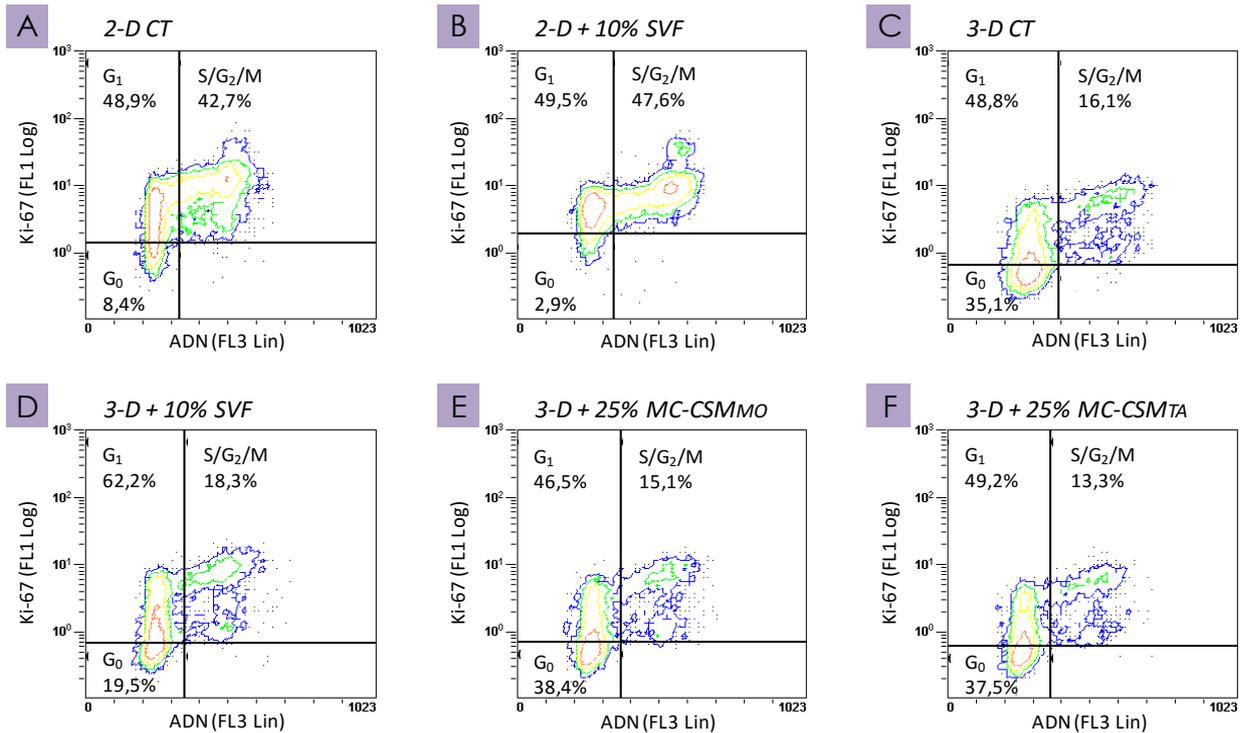


Figure 61 : Effet de l'ajout de MC-CSM sur la quiescence de cellules HOS en sphères.

Graphiques représentant la répartition des cellules HOS en fonction de leur niveau d'expression de la protéine Ki-67 et de leur quantité d'ADN. Les cellules HOS étaient cultivées en conditions d'adhérence (2-D) sans facteurs de croissance (CT, A) ou en présence de SVF (B). Les cellules HOS étaient ensuite cultivées pendant 3 jours en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance (3-D) pour induire la formation d'oncosphères (C). Une fois en oncosphères, les cellules HOS étaient traitées pendant 48 h avec du SVF (D) du MC- CSM_{MO} (E) ou du MC- CSM_{TA} (F) dilués dans du milieu sans facteurs de croissance. Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences.

Identification des cytokines et voies de signalisation impliquées dans l'effet pro-prolifératif des CSM

Un dosage du surnageant des cellules HOS, Saos-2, CSM_{MO} et CSM_{TA} utilisant la technologie luminex et ciblant 31 cytokines parmi lesquelles des interleukines, des chémokines, des facteurs de croissances et des adipokines a été réalisé (figure 62).

Le dosage a permis d'observer des différences importantes de concentration en certaines cytokines (IL-1RA, IL-6, IL-8, IP-10 et MCAF) produites entre les deux lignées d'ostéosarcome. La concentration de chacune de ces cytokines était plus élevée dans le MC-Saos-2 que dans le MC-HOS. Ce profil cytokinique varié pouvait s'expliquer par la différence d'origine de ces deux lignées et l'hétérogénéité des cellules d'ostéosarcome.

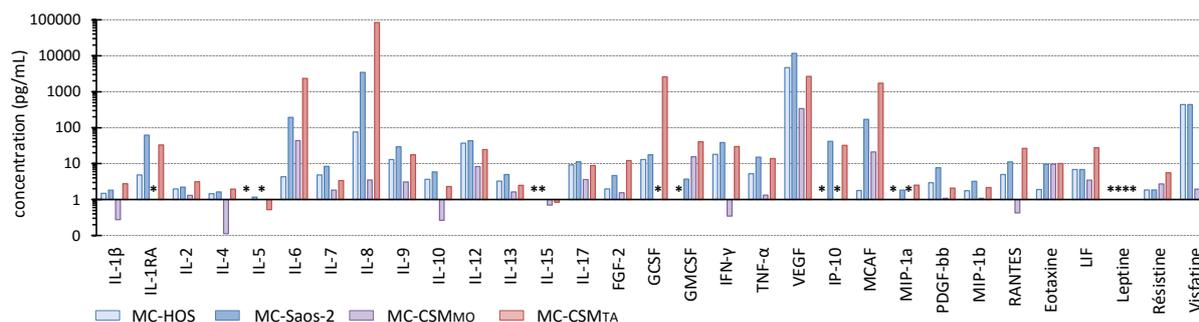


Figure 62 : Dosage multiplex des MC de CSM.

Graphique représentant la concentration en 31 cytokines dosées dans les MC de cellules d'ostéosarcome (HOS et Saos-2) et de CSM de MO et de TA. Les résultats sont une moyenne de 3 mesures. * : non détecté.

Les cytokines retrouvées en quantité dans le surnageant des CSMTA mais pas dans celui des cellules d'ostéosarcome ont plus particulièrement été recherchées pour écarter de nos candidates les molécules potentiellement responsables d'une action autocrine des cellules d'ostéosarcome sur elles-mêmes. Ainsi, de fortes concentrations en interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8) ont été dosées dans le surnageant CSMTA (respectivement 2000 et plus de 50000 pg/mL) alors qu'elles étaient retrouvées en plus faibles concentrations dans le surnageant des cellules Saos-2 (respectivement 200 et 2000 pg/mL) et des cellules HOS (moins de 10 et moins de 100 pg/mL respectivement). Ces 2 cytokines peuvent être impliquées dans l'effet pro-prolifératif des facteurs solubles des CSMTA sur les cellules d'ostéosarcome, et la production différente de ces 2 molécules par les cellules HOS et Saos-2 pourrait alors expliquer la différence de sensibilité de ces 2 lignées cellulaires au surnageant des CSMTA.

L'implication des IL-6 et 8 dans l'effet du MC-CSMTA sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome HOS et Saos-2 a été évaluée en bloquant la signalisation de ces 2 cytokines dans les cellules HOS grâce à des anticorps spécifiques au cours d'expériences d'observation de la prolifération (figure 63).

La signalisation de l'IL-6 a été bloquée par l'ajout d'un anticorps dirigé contre la sous-unité gp130 commune à tous les récepteurs de la famille de l'IL-6. Dans les 2 lignées de cellules d'ostéosarcome testées, l'ajout de l'anticorps n'avait pas d'effet sur la prolifération des cellules cultivées sans facteurs de croissance (CT) ou sur l'effet pro-prolifératif du MC-CSMTA (figure 63A).

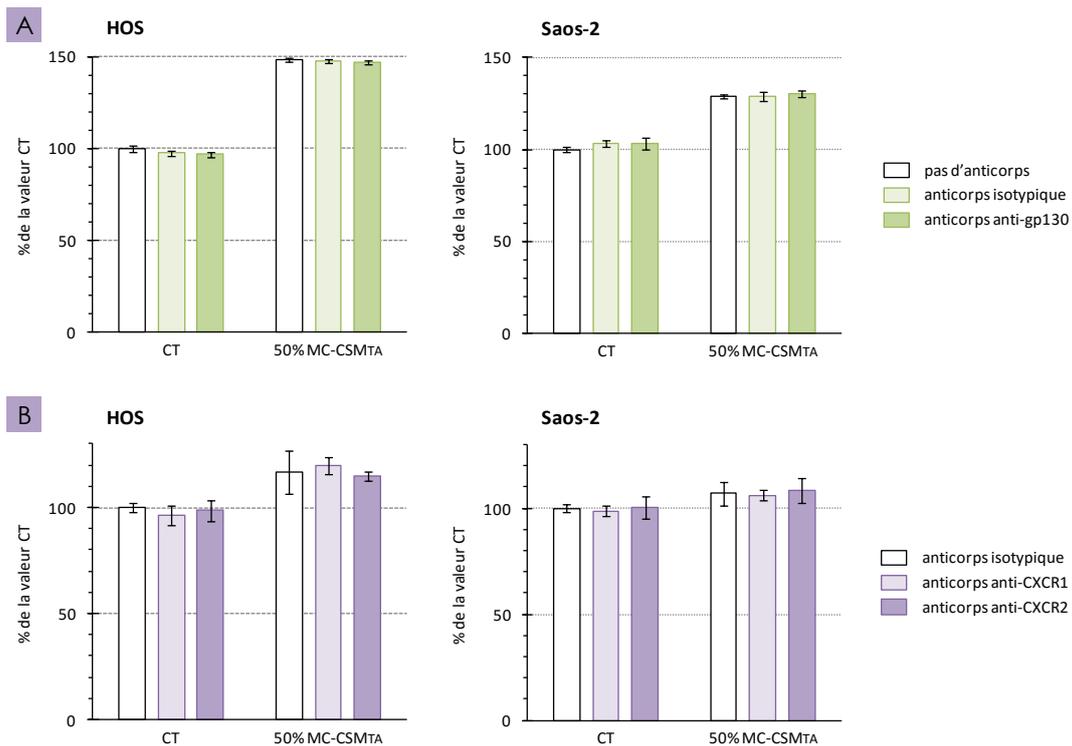


Figure 63 : Implication de l'IL-6 et de l'IL-8 dans l'effet pro-prolifératif du MC- CSMτA sur les cellules d'ostéosarcome.

Les cellules HOS et Saos-2 ont été cultivées 24 h en présence de MC- CSMτA dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Le milieu était supplémenté en anticorps anti-isotype de XX ou anti-gp130 pour bloquer la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6 (A) ou anti-CXCR1 et CXCR2 pour bloquer la signalisation de l'IL-8 (B). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Pour bloquer la signalisation de l'IL-8, 2 anticorps ont été utilisés, chacun étant dirigé contre l'un des 2 récepteurs de l'IL-8, CXCR1 et 2. L'ajout de chacun des anticorps était sans effet sur la prolifération des cellules HOS et Saos-2 cultivées ou non en présence de MC-CSMτA (figure 63B).

Ces expériences ont montré que les 2 interleukines dosées en grandes quantités parmi les facteurs solubles produits par les CSMτA n'étaient sans doute pas impliquées dans leur effet pro-prolifératif sur les cellules d'ostéosarcome.

Impact de la différenciation en adipocytes des CSM_{TA} sur leur effet pro-prolifératif

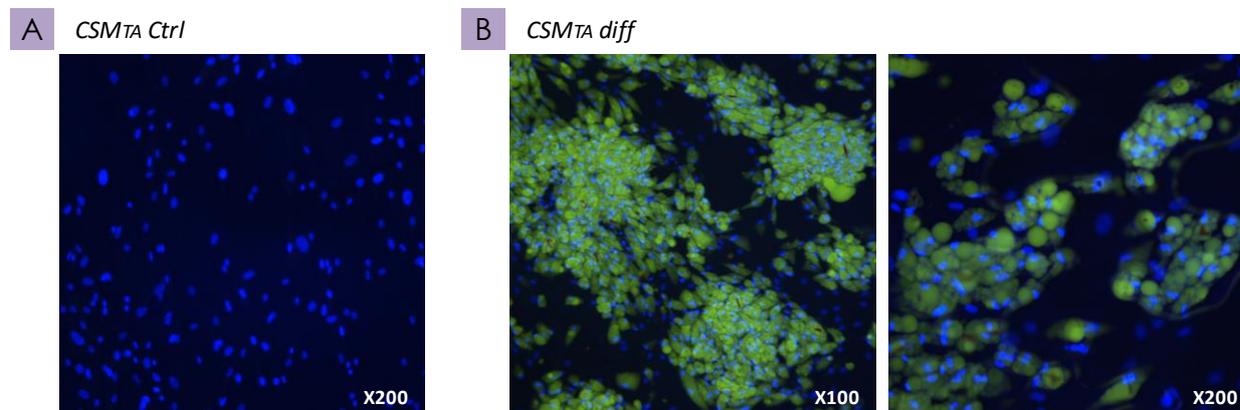


Figure 64 : Différenciation adipocytaire des CSM_{TA}.

Images de CSM_{TA} colorées au rouge Nil pour faire apparaître les vacuoles lipidiques en jaune et au DAPI pour détecter les noyaux en bleu. Les cellules cultivées en milieu standard (A) ou inducteur de la différenciation adipocytaire (B) sont observées par microscopie à fluorescence.

Pour modéliser l'obtention de facteurs solubles produits par des adipocytes seuls, et évaluer l'impact du niveau de différenciation des CSM_{TA} sur leur effet pro-prolifératif, des CSM_{TA} provenant de 2 donneurs différents ont été orientées dans la voie de différenciation adipocytaire. L'accumulation de vacuoles lipidiques après 21 jours de culture en milieu de différenciation était observable par coloration au Rouge Nil (figure 64).

Les Milieux Conditionnés des CSM_{TA} standard et différenciées (respectivement MC-CSM_{TA} Ctrl et MC-CSM_{TA} Diff) étaient récupérés, puis ajoutés à des cellules d'ostéosarcome HOS en culture pour un test de prolifération (figure 65). Les MC-CSM_{TA} Ctrl exerçaient un effet pro-prolifératif plus marqué (125 à 130% de la valeur contrôle) que les MC-CSM_{TA} Diff (115 à 120% de la valeur contrôle). L'engagement des MC-CSM_{TA} dans la voie de différenciation adipocytaire semblait atténuer leur effet pro-prolifératif sur les cellules HOS.

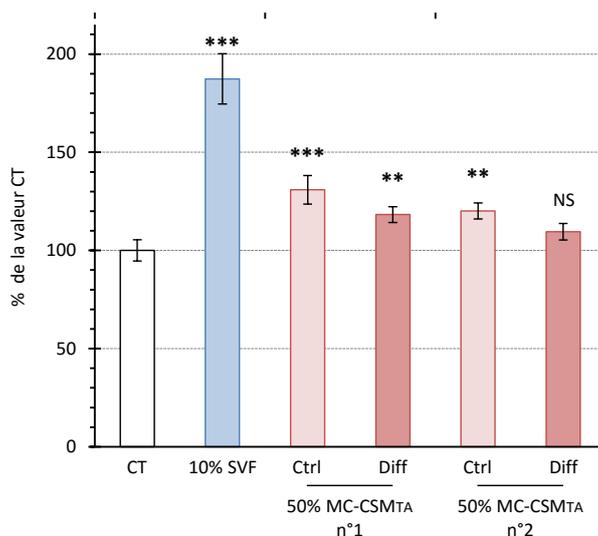


Figure 65 : Impact du niveau de différenciation adipocytaire des CSMTA sur leur effet pro-prolifératif observé sur les cellules HOS.

Graphique représentant la prolifération des cellules HOS cultivées 24 h en présence de SVF ou de MC- CSMTA provenant de 2 donneurs (n°1 et n°2), dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les CSMTA avaient préalablement été cultivées en milieu standard (Ctrl) ou différenciées en adipocytes (Diff). La prolifération des cellules HOS est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 12 manipulations. Les barres représentent les écarts-types. ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$; NS : non significatif.

En parallèle, les MC-CSMTA ont été ajoutés à des cellules d'ostéosarcome cultivées en oncosphères favorisant l'entrée en quiescence des cellules, observée par cytométrie en flux (figure 66). Dans l'expérience présentée figure 50, le nombre de cellules quiescentes représenté par la part de cellules Ki-67- n'était pas modifié par l'ajout de SVF (figure 66B) par rapport à des cellules cultivées sans facteurs de croissance (figure 66A) et était d'environ 25%. La culture en présence des MC de CSMTA standard (figure 66C) ou différenciées (figure 66D) avait pour effet d'augmenter la part de cellules Ki-67- (+7% et + 13% respectivement). Les MC de CSMTA différenciées ou non n'avaient pas d'effet sur la reprise du cycle cellulaire des cellules HOS en oncosphères et semblaient même favoriser le maintien de la quiescence des cellules d'ostéosarcome.

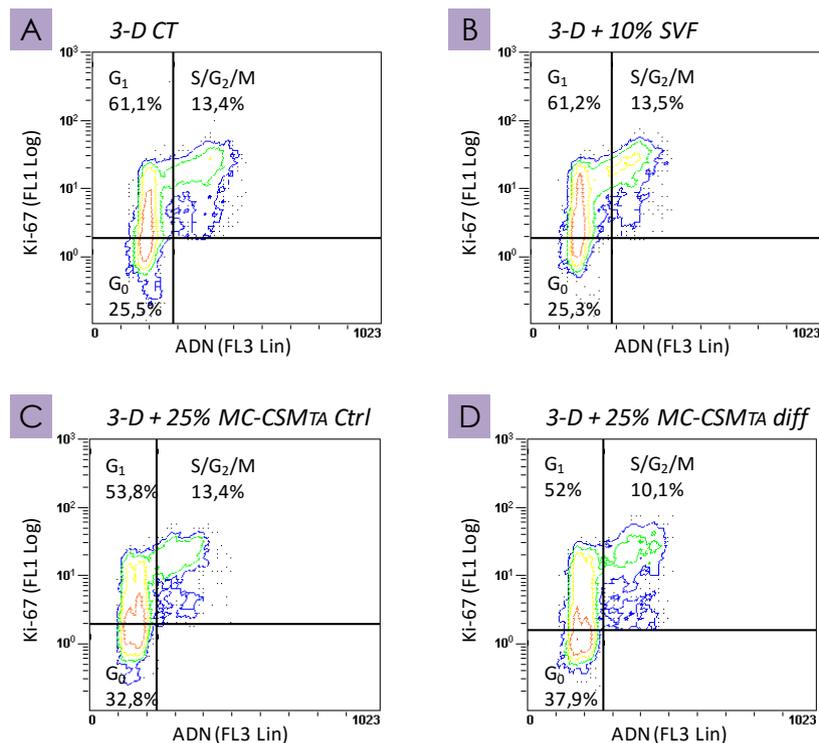


Figure 66 : Effet du niveau de différenciation adipocytaire des CSM_{TA} sur la quiescence de cellules HOS en sphères.

Graphiques représentant la répartition des cellules HOS en fonction de leur niveau d'expression de la protéine Ki-67 et de leur quantité d'ADN. Les cellules HOS étaient cultivées pendant 3 jours en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance (3-D) pour induire la formation d'oncosphères (A). Une fois en oncosphères, les cellules HOS étaient traitées pendant 48 h avec du SVF (B) ou du Milieu Conditionné de CSM_{TA} préalablement cultivées en milieu standard (Ctrl, C) ou différenciées en adipocytes (Diff, D). Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences.

Co-culture directe des cellules d'ostéosarcomes et des CSM

Après avoir étudié l'effet des facteurs solubles des CSM_{TA} sur des cellules tumorales en quiescence, il aurait été intéressant de tester l'effet d'interactions cellulaires directes entre ces deux types cellulaires. Dans ce but, des cellules tumorales HOS ont été co-ensemencées avec des CSM_{TA} dans un milieu semi-solide favorisant la formation de sphères. Pour observer la répartition de chaque type cellulaire lors de la culture, des HOS exprimant l'EGFP⁺ et des CSM_{TA} modifiées pour exprimer la protéine fluorescente rouge (Red Fluorescent Protein, RFP⁺) ont été utilisées.

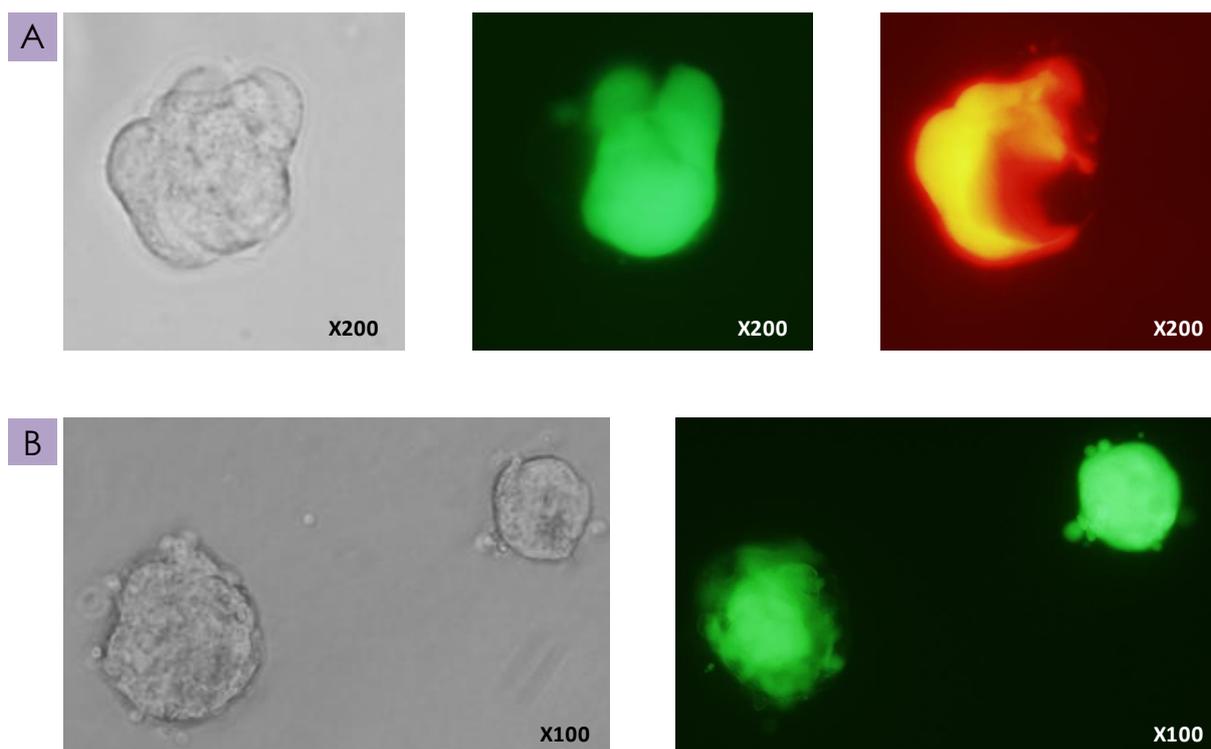


Figure 67 : Formation de sphères mixtes de cellules HOS et de CSMTA.

Des cellules HOS-EGFP+ et des CSMTA -RFP+ ont été co-ensemencées en conditions de perte d'adhérence. A- Images de microscopie optique et à fluorescence d'une sphère mixte après 1 jour de culture. B- Images de microscopie optique et à fluorescence d'une sphère représentative de la co-culture après 3 jours, aucune fluorescence rouge n'était détectée.

Ensemencées à un ratio de 1/1, après un jour de culture les cellules étaient restées isolées ou s'étaient jointes en sphères mixtes présentant une partie rouge (CSMTA) et une partie verte (HOS, figure 67A). En revanche, après 3 jours de culture, aucune cellule rouge n'était détectée, seulement quelques débris (figure 67B). La croissance des HOS en sphères n'explique pas à elle seule la disparition des CSMTA après un temps de culture si court ; ainsi les HOS en sphères auraient induit la mort des CSMTA. Dans ces conditions, nous n'avons pas pu étudier l'interaction directe des CSMTA et des cellules tumorales en quiescence.

CONCLUSION

L'implication des CSMTA dans l'effet pro-tumoral du TA sur l'ostéosarcome a été testée *in vivo* par des expériences de co-injection avec des cellules HOS chez la souris nude. Ainsi, les CSMTA accélèrent la croissance tumorale de manière dose-dépendante et observable dès un faible ratio (10 HOS pour 1 CSMTA). Néanmoins, l'utilisation de CSMTA modifiées pour exprimer stablement la protéine fluorescente EGFP a permis d'observer la disparition des CSMTA du site tumoral à des temps précoces après la co-injection. Ceci semble indiquer que la présence conjointe des CSMTA dans les premiers jours de l'induction tumorale suffit à promouvoir la croissance de l'ostéosarcome.

Cet effet pro-tumoral des CSMTA sur l'ostéosarcome a été comparé à celui de CSMMO et de monocytes CD14⁺. Si les cellules pré-ostéoclastiques CD14⁺ n'avaient pas d'effet sur la croissance de l'ostéosarcome, les CSMMO présentaient un effet pro-tumoral similaire à celui des CSMTA. Cependant, aucun de ces trois types cellulaires ne semblait avoir un impact sur la dissémination métastatique ni sur l'atteinte osseuse induites par l'ostéosarcome. Le seul effet observé *in vivo* était celui des CSMTA et des CSMMO sur la croissance tumorale.

L'effet des CSMTA et des CSMMO sur les cellules d'ostéosarcome a donc été étudié *in vitro*. La co-culture directe de CSM et cellules tumorales ne s'étant pas révélée concluante, les expériences se sont focalisées sur l'implication des facteurs solubles produits par les CSM représentés par le Milieu Conditionné des CSMTA et des CSMMO (MC-CSMTA et MC-CSMMO respectivement).

Ainsi, les MC-CSMTA et MC-CSMMO avaient un effet pro-prolifératif dose-dépendant et globalement similaire sur les cellules d'ostéosarcome HOS et Saos-2. En revanche, leur action précise sur le cycle cellulaire des cellules HOS semblait différente. Le MC-CSMTA augmentait la part de cellules HOS en phase G₂, indiquant peut-être une accélération de la phase de réplication S ou/et un blocage du cycle cellulaire en phase de préparation à la mitose. Quant au MC-CSMMO, il ne semblait pas modifier la répartition des cellules HOS dans les différentes phases du cycle cellulaire par rapport à une culture en milieu standard, sans facteurs de croissance, alors qu'il

activait la prolifération cellulaire, ceci pouvant indiquer une accélération générale du cycle cellulaire des HOS.

Comme dans le cas des facteurs solubles produits par le TA total, aucune molécule n'a pu être identifiée comme étant impliquée dans l'effet du MC-CSM sur la prolifération cellulaire.

Les cellules HOS ont ensuite été cultivées en conditions de perte d'adhérence pour favoriser leur quiescence et l'acquisition de caractéristiques de cellules souches cancéreuses (CSC) par la formation de sphères. Dans ces conditions, l'apport de MC-CSMTA ou de MC-CSMMO ne permettraient pas une sortie de quiescence des cellules HOS.

Ces résultats indiquent donc que l'utilisation des CSM dans le cadre de stratégies thérapeutiques d'un traitement anti-tumoral pourrait s'avérer dangereuse. En effet, les CSM favorisent la prolifération des cellules d'ostéosarcome *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo*. En revanche, l'implication de CSM dans des procédures de reconstruction post-tumorale pourrait être envisageable puisque les facteurs solubles produits par les CSM ne semblent pas capables de relancer la prolifération de cellules d'ostéosarcome quiescentes.

Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication soumise dans le *Journal of Bone Oncology* (Article 2 en Annexes).

L'étude de l'impact du TA et de ses CSM sur le développement de l'ostéosarcome *in vivo* et *in vitro* s'inscrit dans le cadre de l'observation d'un cas clinique de récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome suite à une GTA. Or, cette technique de chirurgie plastique est principalement utilisée en reconstruction post-tumorale après un cancer du sein. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du TA et de CSMTA sur le développement du cancer du sein, *in vitro* et *in vivo*.

**PARTIE III : EFFETS DES FACTEURS
SOLUBLES DU TISSU ADIPEUX SUR LES
CELLULES DE CARCINOME MAMMAIRE**

INTRODUCTION

Le cancer du sein

Description

Le cancer du sein est une pathologie très fréquente chez la femme (près de 49 000 nouveaux cas en France en 2012) et représente plus de 30% des cancers féminins (Institut National du Cancer, 2015).

Le cancer du sein est un carcinome issu de la transformation maligne de cellules épithéliales de la glande mammaire. Ces cellules épithéliales peuvent être lobulaires ou canalaire en fonction de leur localisation. Plusieurs stade de développement peuvent être distingués (figure 68 ; Debnath and Brugge, 2005) :

- une lésion pouvant être un précurseur du carcinome est l'hyperplasie atypique. Les cellules épithéliales prolifèrent anormalement sans pour autant s'étendre ou obstruer le canal ou le lobule dans lequel elles se situent.
- le carcinome mammaire est dit *in situ* si la prolifération des cellules tumorales est circonscrite au canal ou au lobule sans invasion du tissu stromal conjonctif voisin. Ces tumeurs de bas-grade sont représentées à 85% par des carcinomes canauxaires (Kosir, 2013).

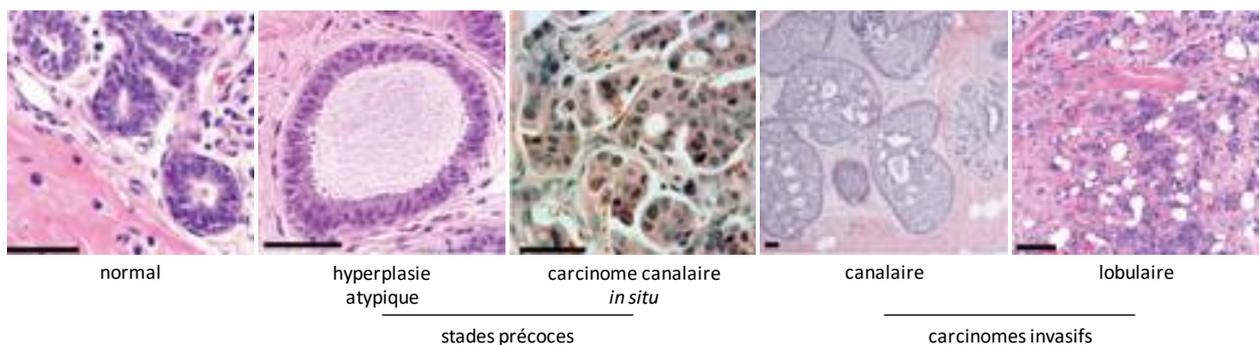


Figure 68 : Tissu mammaire et carcinomes de différents stades observés en histologie.
Barre : 40 µm. Extrait de Debnath and Brugge, 2005.

- le carcinome mammaire devient invasif lorsqu'est rompue la continuité de la membrane basale et des cellules myoépithéliales lobulaires ou canauxaires. La tumeur peut alors envahir les tissus voisins et infiltrer la circulation, en particulier les vaisseaux

lymphatiques, ce qui génère une inflammation de la glande mammaire. L'invasion tumorale peut aboutir à la dissémination métastatique, principalement vers les poumons. Soixante-dix pour cent des cancers du sein chez l'humain sont des carcinomes canaux invasifs (Debnath and Brugge, 2005).

Traitement

Le traitement, adapté selon le type de tumeur, consiste généralement en une chimiothérapie néo-adjuvante, suivie lorsque c'est possible, d'une résection tumorale par chirurgie (Kosir, 2013). Le traitement peut se poursuivre par des séances de radiothérapie. La méthode de résection est adaptée en fonction du volume et du type de tumeur. Si le volume tumoral a pu être réduit par la chimiothérapie néo-adjuvante, la chirurgie pourra rester conservatrice (tumorectomie ou quadrantectomie ; figure 69). En revanche, si la tumeur est inflammatoire, mauvaise répondeuse ou trop volumineuse, une mastectomie peut s'avérer indispensable.

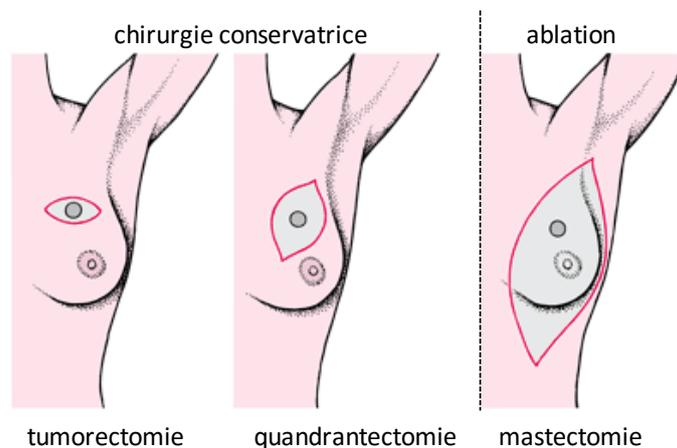


Figure 69 : Chirurgie du cancer du sein.

Extrait de Kosir, 2013.

Application de la GTA en reconstruction après un cancer du sein

Intérêt de la GTA en reconstruction mammaire

La technique de Greffe de Tissue Adipeux (GTA) autologue est de plus en plus couramment utilisée en reconstruction mammaire. La GTA peut être employée seule

en plusieurs séries d'injections, pour une reconstruction mammaire totale, bien que sa principale indication soit dans le cadre de corrections locales suite à une chirurgie conservatrice ou à l'application d'une autre technique de reconstruction.

Cependant, le TA constitue une source de CSM, dont la multipotence confère des propriétés de régénération tissulaire, et est également responsable de la production de cytokines pouvant interagir avec les cellules de la glande mammaire. Ces différentes propriétés ont amené les chirurgiens à s'interroger sur des éventuelles modifications de la physiologie du tissu mammaire local par le TA. En effet, ils se sont notamment interrogés sur l'éventuelle favorisation par le TA de la tumorigenèse, du développement de tumeurs qui étaient encore trop petites pour être détectables, ou de la récurrence tumorale.

Ces interrogations ont abouti à la mise en place d'études rétrospectives qui ont permis de confirmer les très bons résultats cliniques apportés par la GTA en reconstruction tissulaire (Chan et al., 2008). Certaines de ces études indiquaient notamment que la GTA appliquée hors contexte post-tumoral n'interférait pas avec la détection d'un nouveau cancer du sein lors d'examens radiologiques (Coleman and Saboeiro, 2007; Gosset et al., 2008; Zheng et al., 2008).

Par exemple, dans une étude portant sur plus de 150 patientes étudiées ayant reçu une GTA, moins de 4% ont présenté des complications mineures suite à la procédure (Rietjens et al., 2011). Par ailleurs, parmi les patientes ayant reçu une GTA après une chirurgie conservatrice, 6% ont engendré l'apparition d'évènements anormaux observables en radiographie.

Cependant en 2007, la Société Française de Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique (SoFCPRE) a déclaré ne pas soutenir l'application de la GTA en augmentation mammaire sur sein natif ou en reconstruction post-tumorectomie tant que des études et des essais approfondis ne seraient pas réalisés.

Risque de récurrence après une GTA : études rétrospectives

Le cas clinique rapporté par notre équipe d'une récurrence locale et tardive inattendue d'un ostéosarcome faisant suite à une Greffe de Tissu Adipeux (GTA ; Perrot et al., 2010), a permis d'apporter un nouveau regard et de nourrir le débat sur la question du risque de récurrence tumorale associé à la GTA.

Parmi les recherches ayant découlé de ces interrogations, une étude rétrospective a été mis en place avec 321 patientes ayant reçu une GTA, chacune appariées avec 2 patientes au dossier comparable mais n'ayant pas reçu de GTA (Petit et al., 2012). Dans cette étude, l'incidence des récurrences locales chez l'ensemble des patientes ayant reçu une GTA n'était pas différent de celle observée pour les autres patientes : inférieur à 5% après 3 ans (figure 70A). Cependant, dans le cas des patientes qui avaient préalablement contracté une tumeur *in situ* (canalaire ou lobulaire), l'incidence des récurrences était significativement accru chez les patientes qui avaient ensuite reçu une GTA (figure 70B).

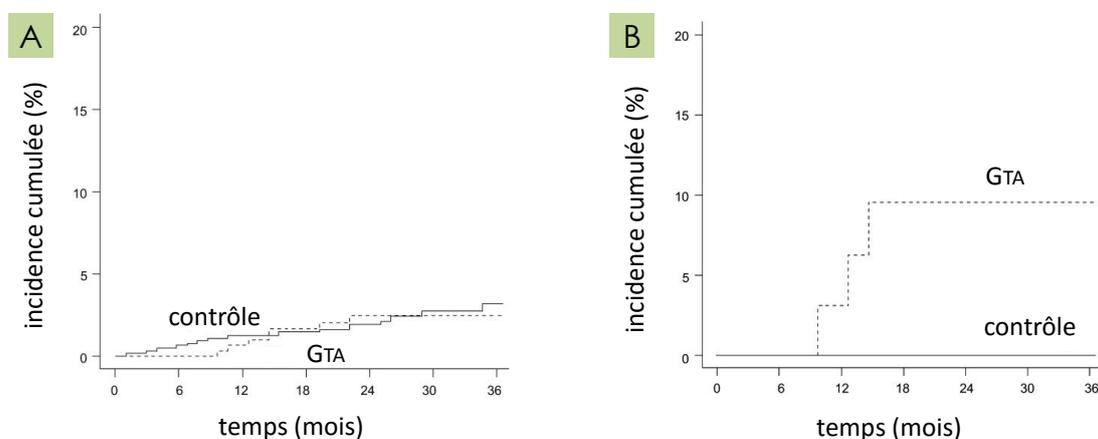


Figure 70 : Impact de la GTA sur la récurrence locale du carcinome mammaire.

Graphiques représentant l'incidence cumulée de récurrences locales de carcinome mammaire en fonction du temps. Le suivi a été réalisé sur des patientes n'ayant pas demandé de reconstruction (groupe contrôle : 568 personnes) et sur des patientes ayant reçu une GTA (groupe GTA: 284 personnes) A- Suivi portant sur l'ensemble des patientes de l'étude. B- Suivi réalisé sur les patientes qui avaient contracté un carcinome *in situ* (groupe contrôle : 74 personnes ; groupe GTA: 37 personnes). Extraits de Petit et al., 2012.

Une seconde étude a alors été réalisée, visant 177 patientes ayant contracté initialement un carcinome *in situ*. Face à chacune des 59 patientes ayant reçu une GTA et retenues parmi les dossiers de l'Institut Européen d'Oncologie, 2 patientes n'ayant pas reçu de GTA étaient sélectionnées pour la similarité de leur dossier (Petit et al., 2013). Le calcul de l'incidence cumulée des récurrences locales sur l'ensemble des patientes confirmait l'observation de l'étude précédente : la GTA est associée à un plus haut taux de récurrences locales chez les patientes ayant contracté un carcinome *in situ*. De plus, des sous-groupes de patientes ont été constitués en fonction de leur âge et de l'agressivité de leur première tumeur (grade et indice

mitotique). A partir des observations réalisées dans ces sous-groupes, l'incidence des récidives après une GTA était accrue chez des patientes de moins de 50 ans (figure 71A) ou qui présentaient un premier carcinome *in situ* de haut-grade (figure 71B) ou avec un indice mitotique élevé (plus de 14% de cellules Ki-67⁺ ; figure 71C).

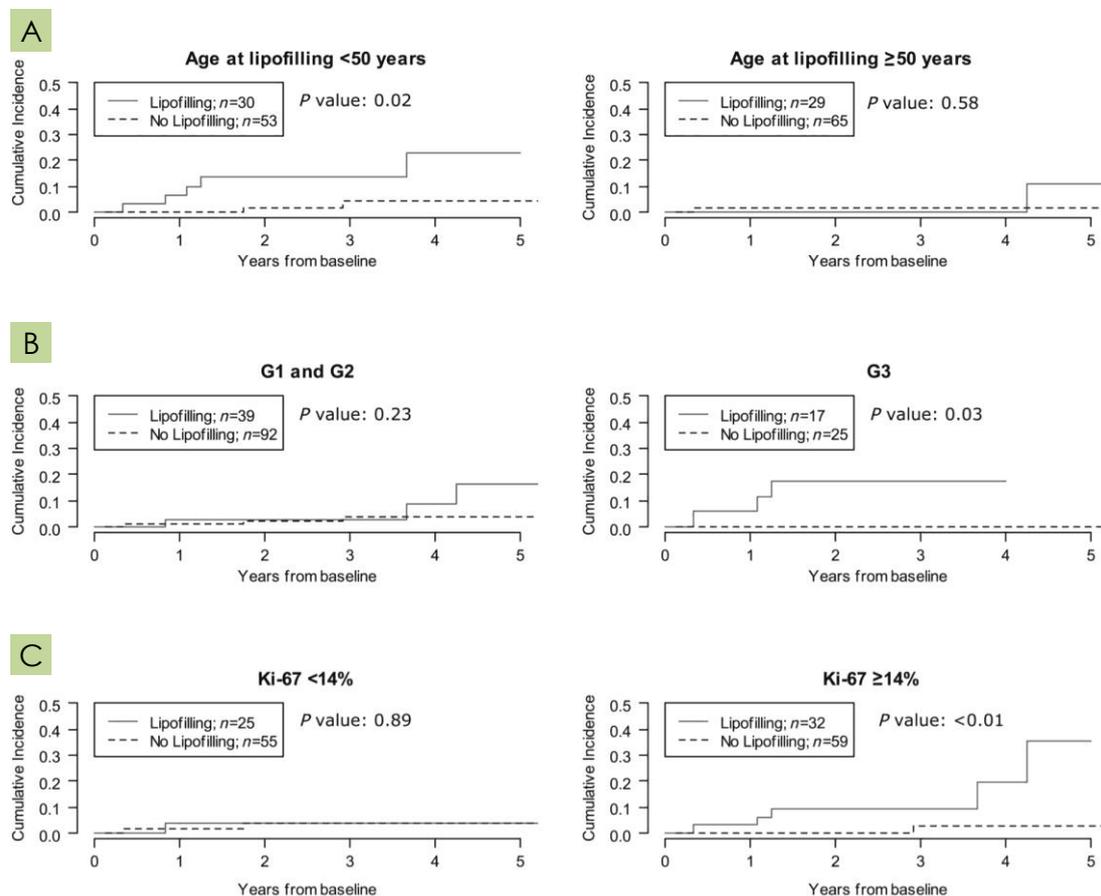


Figure 71 : Effet de l'âge de la patiente, du grade et de l'indice Ki-67 de la tumeur initiale sur la récurrence locale du carcinome mammaire *in situ* après une GTA.

Graphiques représentant l'incidence cumulée de récurrences locales de carcinome mammaire en fonction du temps. L'incidence a été calculée en fonction de l'âge des patientes au moment de la GTA (A), du grade (bas grade G1 et G2 ; haut grade G3) de la tumeur initiale (B) et de l'indice Ki-67 de la tumeur initiale (C). Le nombre de patientes n'ayant pas demandé de reconstruction (groupe No Lipofilling) et ayant reçu une GTA (groupe Lipofilling) est indiqué pour chaque sous-groupe (n). Extraits de Petit et al., 2013.

Carcinome mammaire et CSM

Le développement du carcinome mammaire peut engendrer une réaction desmoplastique. Cette formation de tissu fibreux autour de la tumeur implique le recrutement de nombreux précurseurs, en particulier de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM).

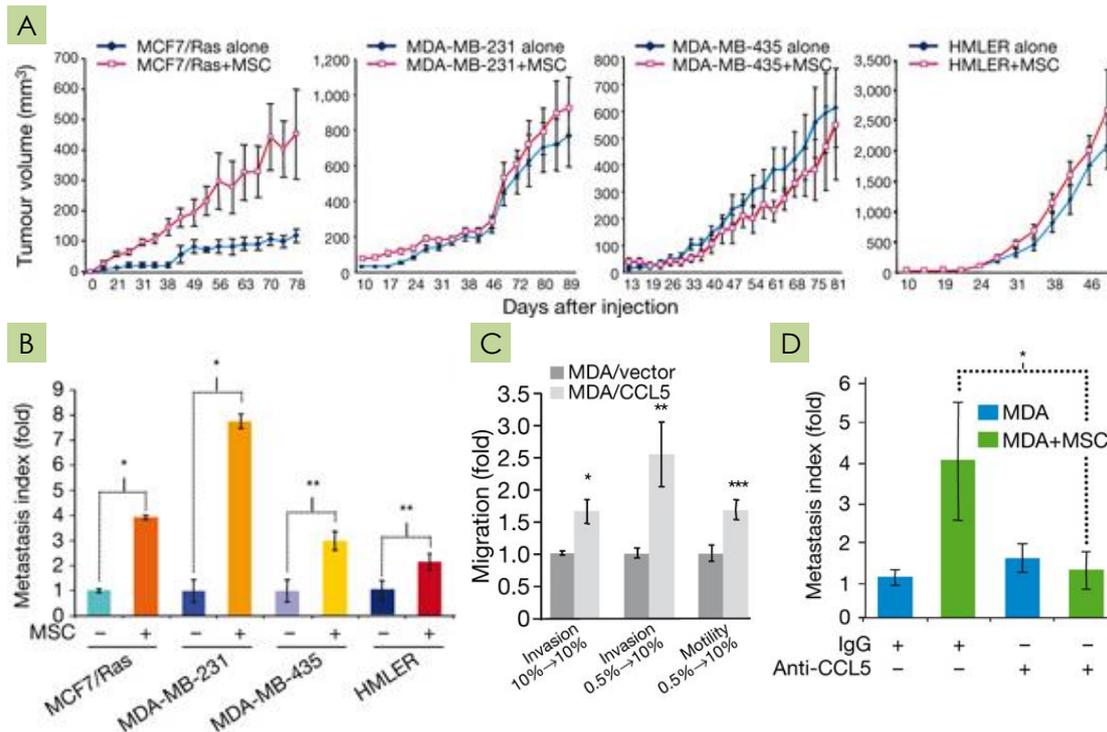


Figure 72 : Promotion de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique des CSMMO dans le carcinome mammaire.

Les tumeurs sont induites par la co-injection sous-cutanée de 500 000 cellules tumorales (MCF7/Ras, MDA-MB-231, MDA-MB-435 ou HMLER) seules (groupes « alone ») ou avec 1,5 million de CSMMO (groupes « +MSCs »). A- Suivi temporel du volume tumoral. Les résultats sont présentés en une moyenne de 5 à 8 individus par groupe. B- Graphique présentant l'incidence métastatique pour chacune des lignées rapportée à la valeur du groupe « alone ». C- Graphique montrant la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231 seules (groupe « vector ») ou en présence de CCL5. D- Graphique montrant l'incidence métastatique modifiée par le blocage de CCL5. Un anticorps anti-CCL5 ou contrôle (IgG) ont été administrés chez des souris portant une tumeur induite par l'injection de cellules MDA-MB-231 seules (groupe « MDA », n = 9) ou avec des CSMMO (groupe « MDA+MSC », n = 11). Les résultats sont une moyenne et les barres représentent les écart-types à la moyenne. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 *** : p < 0,005. Extraits de (Karnoub et al., 2007)

Ainsi, une étude a montré que la co-injection de cellules de carcinome mammaire avec des CSM dérivées de la Moelle Osseuse (CSMmo ; selon un ratio de 1/3) accélérât la croissance tumorale uniquement pour les tumeurs induites par l'injection de cellules MCF7 (figure 72A ; Karnoub et al., 2007). En revanche, pour toutes les lignées cellulaires testées, l'incidence métastatique était augmentée en présence de CSMMO (figure 72B). Cet effet des CSMMO sur la dissémination métastatique pouvait être véhiculé par la protéine CCL5 également appelée RANTES (pour Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), puisque des expériences réalisées *in vitro* ont montré un effet pro-migratoire de la molécule CCL5 sur les cellules MDA-MB-231 (figure 72C). *In vivo*, l'effet pro-migratoire des CSMMO pouvait être inhibé par un anticorps bloquant CCL5 (figure 72D).

Dans le cas des CSM dérivées du TA (CSMTA), une étude a montré leur effet sur la croissance et la dissémination métastatique du carcinome mammaire dans des expériences de co-injection de cellules cancéreuses murines avec des CSMTA de souris (Muehlberg et al., 2009). Dans cette étude, l'effet pro-métastatique des CSMTA était véhiculé par la sécrétion de la protéine CXCL12 également appelée SDF-1 (pour Stromal-Derived Factor type 1).

A l'inverse, une étude portant sur des CSM dérivées de peau foetale humaine a montré un effet anti-tumoral sur le carcinome mammaire (Qiao et al., 2008). Des expériences *in vivo* de co-injection de cellules tumorales avec des CSM montraient que les CSM retardaient la détection des tumeurs (de 14 jours). *In vitro*, l'ajout de milieu conditionné par des CSM (MC-CSM) à des cellules tumorales en culture réduisait leur prolifération.

L'effet des CSMTA sur la croissance des cellules de carcinome mammaire doit être étudié plus en détails pour déterminer si l'apport de CSMTA lors d'une GTA suite à un carcinome mammaire constituerait un éventuel risque de récurrence tumorale. Cette récurrence pouvant être le fait de la présence de Cellules Souches Cancéreuses (CSC) après le traitement anti-tumoral et capables de former une nouvelle tumeur.

Cellules Souches Cancéreuses du carcinome mammaire

Caractérisation des CSC

A partir du carcinome mammaire de 8 patients, des cellules ont été isolées pour leur fort potentiel tumorigène : 100 de ces cellules suffisaient à induire la formation d'une tumeur chez la souris immuno-déficiente quand plus de 10 000 des autres cellules ne formaient aucune masse tumorale (Al-Hajj et al., 2003). Les cellules tumorales hautement tumorigènes étaient caractérisées en cytométrie en flux par l'expression de la protéine CD44 et l'absence d'expression du marqueur hématopoïétique CD24. CD44 est le récepteur à l'acide hyaluronique, une de ses isoformes est responsable du tropisme vers la moelle osseuse des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques (Sackstein et al., 2008). Les cellules de carcinome mammaire au phénotype CD44⁺/CD24⁻ pourraient donc être identifiées comme des Cellules Souches Cancéreuses (CSC).

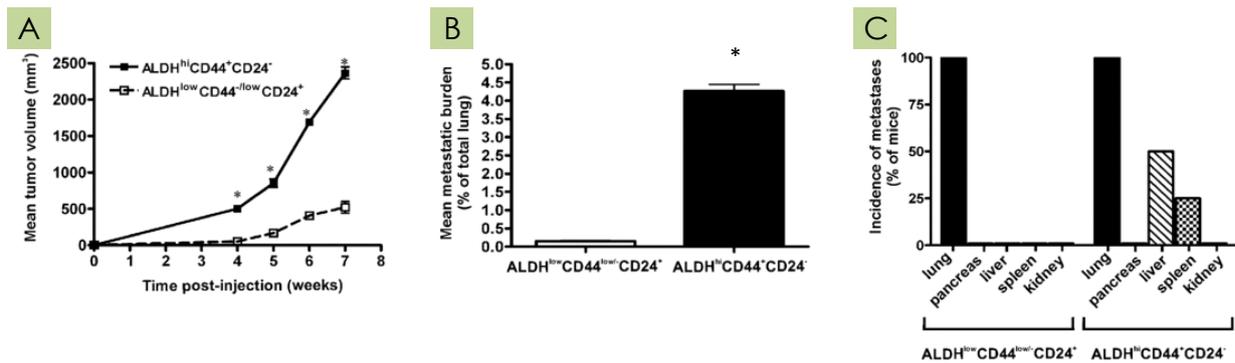


Figure 73 : Propriétés de CSC chez une sous-population de la lignée cellulaire MDA-MB-231. Deux sous-groupes de cellules ($ALDH^{hi}$, $CD44^{+}$, $CD24^{-}$ et $ALDH^{low}$, $CD44^{-}$, $CD24^{+}$) ont été isolés à partir de la lignée MDA-MB-231. Cinq-cent-mille cellules de chaque sous-groupe ont été injectées dans la glande mammaire de souris immuno-déficientes ($n = 4$). A- Suivi temporel de la croissance tumorale moyenne. B- Graphique montrant le nombre moyen de métastases pulmonaires. C- Graphique montrant l'incidence métastatique moyenne en fonction des tissus. * : $p < 0,05$. Extraits de Croker et al., 2009.

Des CSC ont pu être isolées à partir de lignées cellulaires de carcinome mammaire humain (MDA-MB-231 et MDA-MB-468), en fonction de leur phénotype membranaire ($CD44^{+}/CD24^{-}$ et $CD44^{+}/CD133^{+}$, respectivement) et de leur activité de l'enzyme ALDH ($ALDH^{hi}$; Croker et al., 2009). Les propriétés de CSC ont été identifiées dans ces sous-populations cellulaires par des tests de clonogénicité et de migration *in vitro*. De plus, les CSC isolées à partir de la lignée MDA-MB-231 (phénotype $ALDH^{hi}/CD44^{+}/CD24^{-}$) induisaient une formation tumorale plus rapide lorsqu'elles étaient injectées chez des souris immuno-déficientes (figure 73A) ainsi qu'une dissémination métastatique plus forte vers le poumon (figure 73B) et une incidence métastatique globale accrue (figure 73C).

Transition Épithélio-Mésenchymateuse

La Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM) peut être définie comme la propriété de former des cellules mésenchymateuses à partir de cellules épithéliales. Durant la progression tumorale, l'acquisition d'une plasticité et la dédifférenciation de cellules de carcinome est un cap permettant l'invasion des tissus voisins de la tumeur et la dissémination métastatique (Thiery, 2003).

Dans le cas de cellules épithéliales non-tumorigènes de la glande mammaire, le phénotype de cellules souches était associé *in vitro* avec l'expression de marqueurs de la TEM (figure 74 ; Mani et al., 2008).

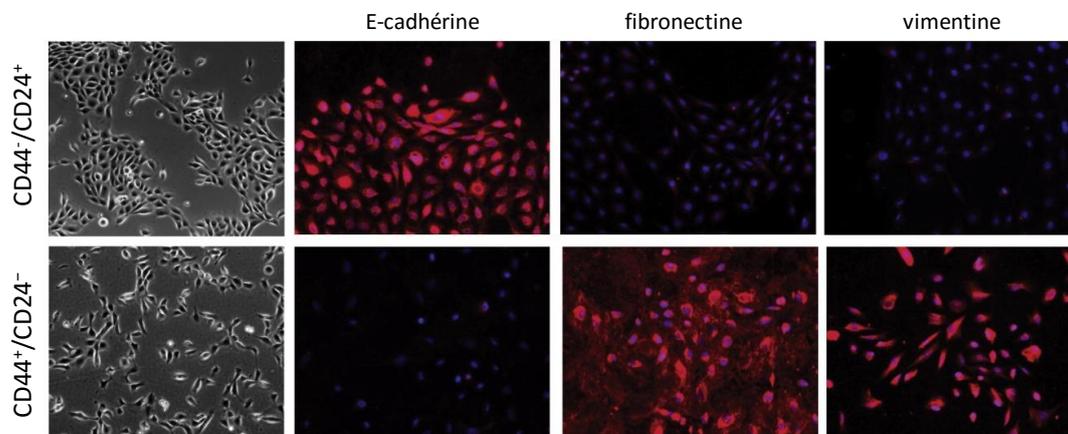


Figure 74 : Expression de marqueurs de la TEM par des cellules non tumorigènes aux caractéristiques de cellules souches.

Images d'immunofluorescence sur deux populations de cellules épithéliales dérivées de glande mammaire humaine : $CD44^-/CD24^+$ et $CD44^+/CD24^-$ aux caractéristiques de cellules souches. Les cellules ont été marquées par des anticorps couplés à un fluorochrome et dirigés contre les protéines E-cadhérine (marqueur épithélial), fibronectine et vimentine (marqueurs mésenchymateux). Extrait de Mani et al., 2008.

Ainsi des cellules $CD44^+/CD24^-$ présentaient les caractéristiques de cellules ayant effectué la TEM : baisse de l'expression de la protéine d'ancrage E-cadhérine, spécifique des tissus épithéliaux, associée à une hausse de l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine ou la fibronectine.

Un des acteurs de la TEM dans les cellules tumorales est la protéine c-myc. Le gène MYC codant pour la protéine c-myc est fréquemment impliqué dans les processus d'initiation tumorale (Cho et al., 2010).

Par exemple, dans le cancer de la prostate, les propriétés de clonogénicité *in vitro* et de tumorigénicité *in vivo* de CSC $CD133^+/CD24^-$ sont inhibées par le blocage de l'expression de MYC (Goodyear et al., 2009). De plus, le blocage de c-myc par l'utilisation d'un shRNA empêche la TEM induite par le TGF- β dans les cellules de carcinome prostatique humain (Amatangelo et al., 2012).

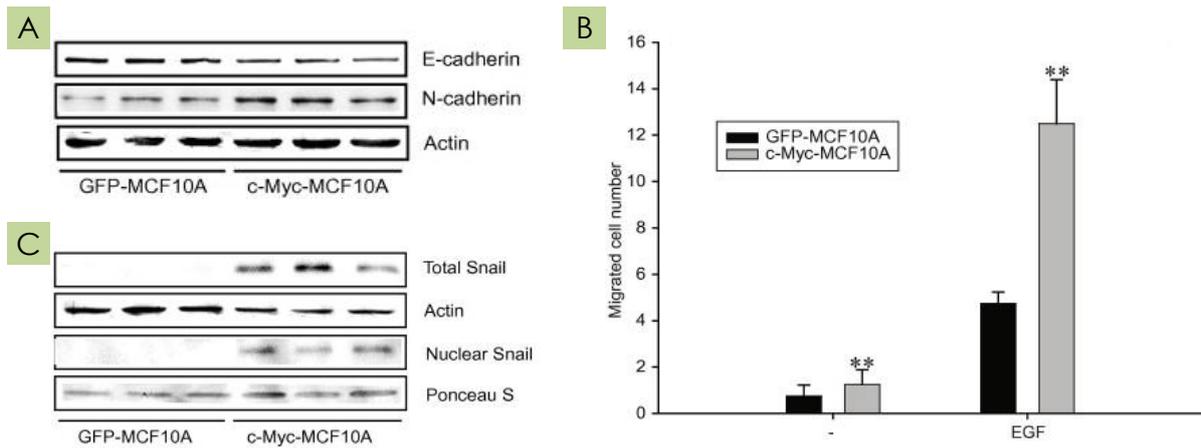


Figure 75 : Induction de la TEM par surexpression de c-myc dans des cellules épithéliales. Des cellules non-tumorigènes de l'épithélium mammaire MCF10A ont été modifiées pour exprimer la protéine GFP (GFP-MCF10A, contrôle) ou la protéine c-myc (c-Myc-MCF10A). A- Images de détection par Western Blot des protéines E- et N-cadhérine. B- Graphique montrant la migration des cellules MCF10A en conditions standard (-) ou en réponse à la stimulation à l'EGF (Epidermal Growth Factor). Les résultats sont une moyenne ($n = 4$) et les barres représentent les écart-types. ** : $p < 0,01$. C- Images de détection par Western Blot des formes totale et nucléaire (activée) de la protéine Snail. Extraits de Cho et al., 2010.

Dans le cas du tissu mammaire, la surexpression du gène MYC dans des cellules épithéliales non-tumorigènes MCF10A (Cho et al., 2010) suffit à induire la baisse de l'expression de la E-cadhérine, la hausse de l'expression de la N-cadhérine (figure 75A) et la hausse des capacités de migration des cellules (figure 75B). La TEM serait activée par c-myc en augmentant notamment l'expression et l'activité du facteur de transcription Snail (figure 75C).

Objectifs : évaluer les interactions du TA et des CSMTA avec les cellules de carcinome mammaire en prolifération ou en quiescence

Notre laboratoire n'étant pas spécialisé dans l'étude des cancers du sein, nous avons collaboré avec l'équipe 8 du Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers (CRCNA ; INSERM U892) et plus particulièrement avec le Docteur Sophie Barillé pour choisir 2 lignées cellulaires humaines représentatives du cancer du sein et fréquemment employées dans la littérature : MDA-MB-231 et MCF7. Les premières, MDA-MB-231 (figure 76A), sont issues d'un carcinome triple négatif, qui représente 10 à 15% des cancers du sein et qui est plus agressif (Dent et al., 2007). Les

MCF7 représentent quant-à-elles un carcinome invasif moins agressif, plus fréquent et avec des caractéristiques épithéliales plus marquées (figure 76B).

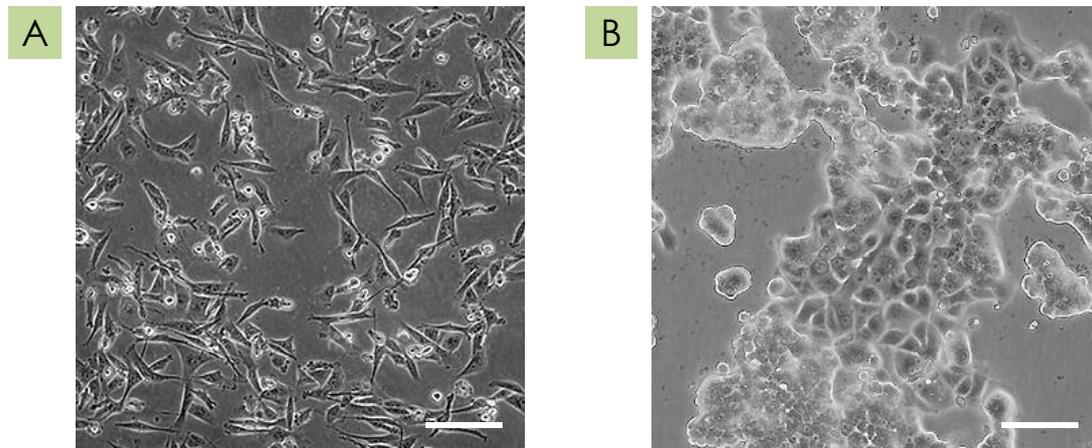


Figure 76 : Cellules de carcinome mammaire en culture

Images de microscopie montrant l'aspect des cellules MDA-MB-231 (A) et MCF7 (B). Barre : 100 μ m. Extraites du site de l'ATCC (lgcstandards-atcc.org).

Le but de ce travail a été de transposer les observations sur l'interaction du TA et des CSMTA avec les cellules d'ostéosarcome au carcinome mammaire, plus fréquemment associé à l'utilisation de la GTA. Ainsi, l'impact des facteurs solubles produits par le TA et les CSMTA sur la prolifération des cellules de carcinome mammaire a été observé et les voies de signalisation potentiellement impliquées ont été étudiées.

La récurrence d'un carcinome mammaire suite à une GTA implique que des CSC aient été stimulées par un composant du TA greffé. Le modèle de culture en conditions de perte d'adhérence favorisant l'acquisition *in vitro* de caractéristiques de CSC par les cellules tumorales a donc été utilisé pour étudier l'éventuel impact des facteurs solubles du TA et des CSMTA sur la quiescence des cellules de carcinome mammaire.

En parallèle, un modèle de carcinome mammaire *in vivo* a été mis en place chez la souris pour observer l'impact du TA et de ses facteurs solubles sur le développement tumoral.

Enfin, l'impact de la variabilité du mode de prélèvement du TA en vue d'une GTA a été étudié sur les cellules de carcinome mammaire. En effet, avant d'être aspiré, le TA ne reçoit pas les mêmes traitements en fonction de la zone prélevée et du chirurgien pratiquant l'intervention. Cette différence de traitement peut notamment avoir une influence sur la production de facteurs solubles par le TA.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cellules tumorales et conditions de culture

La lignée de cellules MCF7 est dérivée de l'épanchement pleural d'un carcinome mammaire survenu sur une femme de 69 ans. Ces cellules ont gardé un aspect et des propriétés épithéliales et expriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (Soule et al., 1973) Elles sont référencées par l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro HTB-22.

Les cellules de la lignée MDA-MB-231 sont elles-aussi dérivées d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire (numéro ATCC : HTB-28), celui-ci étant survenu chez une femme de 51 ans. Ces cellules n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (Cailleau et al., 1974).

Les méthodes d'amplification et de culture cellulaire standard étaient les mêmes que celles décrites dans la Partie I, section Matériel et Méthodes.

Croissance en oncosphères

La formation d'oncosphères en conditions de pertes d'adhérence était obtenue comme dans la Partie I, section Matériel et Méthodes.

Obtention des milieux conditionnés

Les Milieux Conditionnés de Tissu Adipeux (TA) ou de Cellules Souches Mésoenchymateuses du TA (CSMTA) en culture étaient obtenus comme décrit dans la section Matériel et Méthodes des Parties I et II, respectivement.

Évaluation de la croissance cellulaire *in vitro*

La viabilité cellulaire, évaluée par mesure de l'activité mitochondriale, et l'observation du cycle cellulaire en cytométrie en flux ont été réalisées comme décrit dans la Partie I, section Matériel et Méthodes.

Analyse de l'expression génique

Les conditions d'extraction des ARN, de rétrotranscription et d'amplification quantitative étaient similaires à celles décrites dans la partie I, Matériel et Méthodes.

Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 2 en Annexes.

Étude de l'expression protéique

Les protocoles utilisés pour l'extraction et le dosage des protéines, ainsi que pour la réalisation des Western Blot étaient les mêmes que ceux décrits dans la partie I, section Matériel et Méthodes.

Migration cellulaire

Pour évaluer le potentiel migratoire des MCF7, 200 000 cellules ont étéensemencées dans des inserts de culture à pores de 8 μm , permettant le passage de cellules, et cultivées en milieu aMEM standard supplémenté avec 1 % de SVF au-dessus d'un puits contenant le milieu d'intérêt. Après 24 heures de culture, les inserts étaient rincés avec du PBS et les cellules étaient fixées pendant 5 minutes en présence de glutaraldéhyde 1%. Les cellules restées à l'intérieur de l'insert étaient enlevées à l'aide d'un coton-tige et les inserts étaient à nouveau rincés avec du PBS. Les membranes plasmiques des cellules ayant traversé les pores de l'insert ont alors été colorées par une solution de *crystal violet* pendant 5 minutes. Les inserts étaient enfin rincés à l'eau distillée puis séchés.

Modèle de carcinome mammaire *in vivo*

Toutes les manipulations ont été menées au sein de l'unité de Thérapie Expérimentale de Nantes (UTE, plateau technique de la faculté de médecine de Nantes), et dans le respect des directives de la communauté européenne validées par le comité d'éthique local.

Les animaux utilisés dans les modèles précliniques décrits par la suite étaient des femelles âgées de 9 semaines. Ces souris sont issues de la souche NMRI Nu/Nu (nude), leur système immunitaire déficient permettant de limiter leur réaction suite à l'injection de cellules humaines. Les expérimentations sur les souris ont été initiées après une semaine d'acclimatation.

Induction tumorale

Le modèle de carcinome mammaire chez la souris était induit par 2 millions de cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 ou MCF7. Les cellules étaient injectées soit directement dans le 4^{ème} canal galactophore gauche ; soit dans le Tissu Adipeux de la 3^{ème} glande mammaire droite après résection du 5^{ème} canal galactophore droite à l'aide d'un bistouri électrique.

Pour l'induction tumorale, les souris étaient anesthésiées par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane (2,5%, Flucka) avec un débit de 1 L/min, puis placées sous une lampe chauffante. La zone d'injection était désinfectée par l'application d'une solution iodée (Bétadine). Les animaux recevaient alors une injection de 50 µL de suspension cellulaire de PBS contenant 2 millions de cellules tumorales diluée au ½ dans du Matrigel (R&D).

Dans le cas des souris ayant reçu une injection de cellules MCF7, une complémentation hormonale était nécessaire puisque ces cellules présentent des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et leur développement *in vivo* est hormono-dépendant. Un implant libérant de manière prolongée du 17β-oestradiol (Innovative Research of America) était placé en sous-cutané au niveau de l'épaule gauche.

Suivi expérimental

La surveillance de l'évolution du volume tumoral ainsi que l'euthanasie étaient réalisées selon les mêmes méthodes que décrit dans la Partie II, section Matériel et Méthodes

Analyses histologiques

L'identification des cellules en prolifération par marquage immuno-histochimique de la protéine Ki-67 a été réalisée comme décrit dans la Partie I, section Matériel et Méthodes.

RÉSULTATS

Prolifération accélérée de cellules de carcinome mammaire par les facteurs solubles du tissu adipeux

Pour évaluer l'impact des facteurs solubles produits par le tissu adipeux sur la croissance des cellules de carcinome mammaire, des prélèvements de TA ont été placés dans des inserts de culture au-dessus de puits contenant du milieu standard sans facteur de croissance (voir partie I). Les inserts utilisés présentent des pores de 3 µm qui ne laissent passer que les facteurs solubles et pas les cellules. Après 24 h, le milieu ainsi récupéré est appelé Milieu Conditionné de Tissu Adipeux (MCTA) et peut être ajouté à des cellules en culture.

Augmentation de la prolifération des cellules de carcinome mammaire par le MCTA

Des tests de prolifération ont été réalisés sur des cellules de lignées humaines de carcinome mammaire MCF7 et MCD-MB-231 cultivées pendant 24 h en présence du traitement d'intérêt et dans des conditions standard d'adhérence au plastique. Les cellules avaient au préalable été privées de sérum de veau fœtal (SVF) durant une nuit (16 h) dans le but d'augmenter leur prolifération en réponse à l'apport de facteurs de croissance. Des milieux conditionnés par la graisse de 3 donneurs différents ont été ajoutés aux cellules en culture.

Les cellules traitées avec du milieu standard supplémenté en SVF, utilisé en guise de contrôle positif pour l'activation de la prolifération, avaient une croissance cellulaire augmentée de 20 à 140% (respectivement pour les cellules MDA-MB-231 et MCF7) par rapport à du milieu standard (CT, figure 77). Lorsqu'elles étaient cultivées en présence de MCTA, les cellules avaient une prolifération augmentée d'au moins 40% par rapport à la valeur contrôle. Cet effet pro-prolifératif du MCTA était observé dans les 2 lignées cellulaires de carcinome mammaire étudiées et pour les 19 prélèvements de TA récupérés et testés.

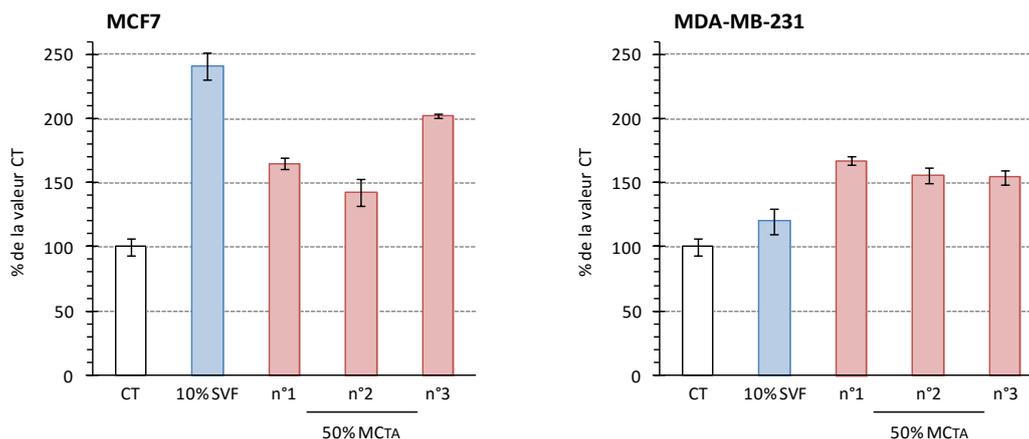


Figure 77 : Prolifération de cellules de carcinome mammaire en présence de MCTA.

Graphiques représentant la prolifération des cellules de 2 lignées humaines de carcinome mammaire (MCF7 et MDA-MB-231). La prolifération est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou milieux conditionnés de TA n°1 à 3 provenant de 3 donneurs) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 20 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Le MCTA accélère le cycle cellulaire des cellules MCF7

Afin de mieux caractériser cet effet pro-prolifératif des MCTA sur les cellules de carcinome mammaire, des expériences d'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont été réalisées (figure 78). Cette répartition des cellules était visualisée grâce au marquage de l'ADN par l'iodure de propidium, un intercalant fluorescent, et observée par cytométrie en flux.

La répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire des cellules MCF7 cultivées en présence de milieu contrôle (CT) était la suivante: 54% des cellules étaient en phase G_0/G_1 , 26% en phase S de réplication et 20% en phase G_2/M de préparation à la mitose (figure 78A). L'ajout de SVF (figure 78B) provoquait une augmentation de la part de cellules en phase de préparation à la mitose G_2/M (+ 10%), une hausse du nombre de cellules en phase de réplication S (+ 16%) et une diminution du nombre de cellules en phase d'initiation G_0/G_1 (- 27%). Lorsque les cellules étaient cultivées en présence de MCTA (figure 78C), la part de cellules en phase G_0/G_1 était aussi réduite de 25% par rapport à la condition CT et l'augmentation du nombre de cellules en phase G_2/M était plus marquée qu'en présence de SVF (+ 20%) tandis que la hausse de la part de cellules en phase S était moins marquée qu'avec du SVF (+ 10%). Ces résultats semblaient indiquer que le MCTA provoquait une progression du cycle cellulaire similaire au SVF, avec des

cellules qui passeraient plus rapidement de la phase de réplication S à la phase de préparation à la mitose G₂/M.

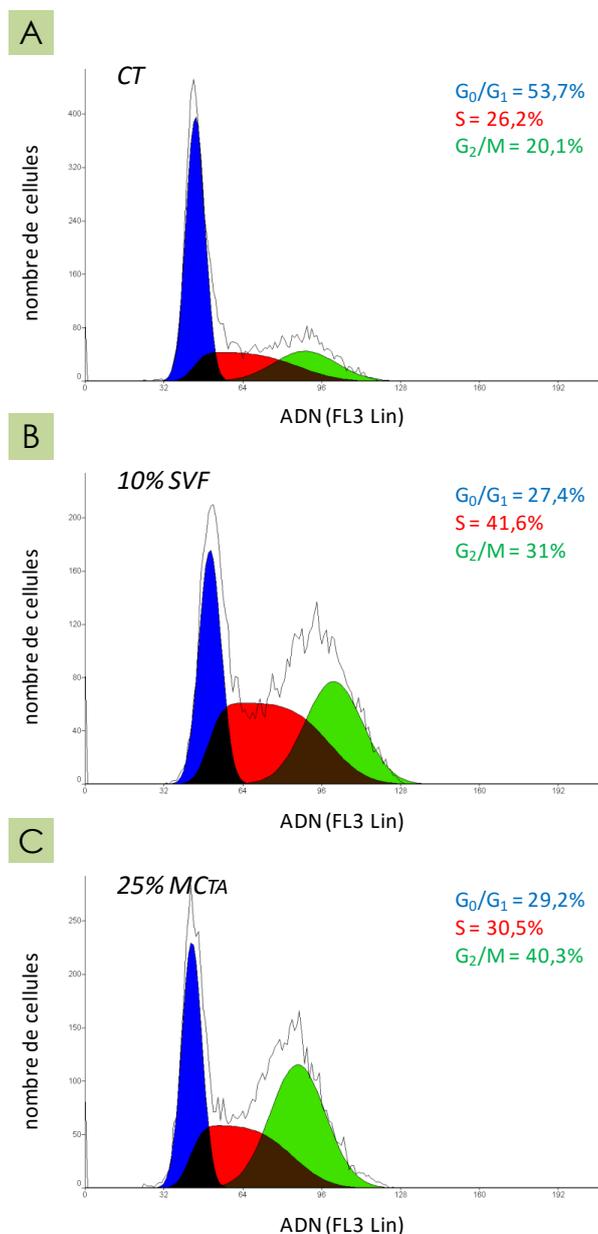


Figure 78 : Cycle cellulaire de cellules MCF7 en présence de MCTA.

Graphiques représentant la quantité d'ADN par cellule, observée par cytométrie en flux grâce au marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les % indiquent la part de cellules dans chacune des différentes phases du cycle cellulaire. Ces résultats sont représentatifs de 7 expériences.

Contribution des CSMTA à l'effet pro-prolifératif du MCTA

Parmi les composants du TA, les CSMTA ont montré un effet sur la croissance des cellules d'ostéosarcome (voir partie II), l'implication de ces cellules et plus

particulièrement de leurs facteurs solubles et secrétés, sur la croissance des cellules de carcinome mammaire a donc été observée (figure 79). Le milieu conditionné par des CSMTA en culture (MC-CSMTA) a été ajouté à des cellules MCF7 en culture. L'ajout de CSMTA avait pour effet d'augmenter la prolifération des cellules MCF7 d'environ 100%. Lorsque les CSMTA avaient préalablement été engagées dans la voie de différenciation adipocytaire (voir partie II), leur effet sur la prolifération était quasiment supprimé. Ces résultats indiquent que les facteurs solubles produits par les CSM du TA pourraient être plus impliqués dans l'effet pro-prolifératif du TA sur les cellules MCF7, que les facteurs solubles produits par les adipocytes.

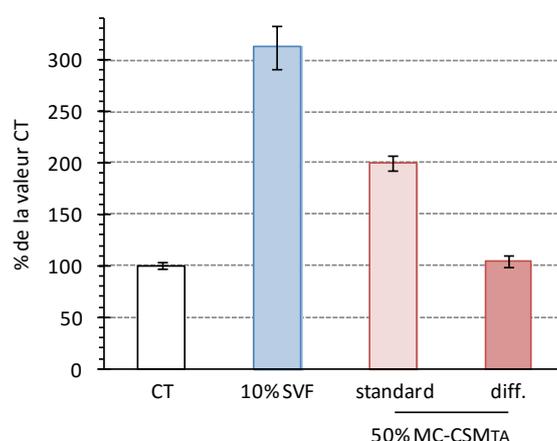


Figure 79 : Impact du niveau de différenciation adipocytaire des CSMTA sur leur effet pro-prolifératif observé sur les cellules MCF7.

Graphique représentant la prolifération des cellules MCF7 cultivées 24 h en présence de SVF ou de MC-CSMTA dilués dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les CSMTA avaient préalablement été cultivées en milieu standard (Ctrl) ou différenciées en adipocyte (Diff). La prolifération des cellules tumorales est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 9 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Voies de signalisation impliquées dans l'effet du MCTA

Parmi les possibles acteurs de l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7, la leptine a été dosée dans le MCTA (voir partie I). De plus, la leptine est décrite comme ayant un effet pro-prolifératif sur les cellules de carcinome mammaire, faisant intervenir la voie de signalisation STAT3 et ERK1/2 (Dieudonne et al., 2002; Saxena et al., 2007).

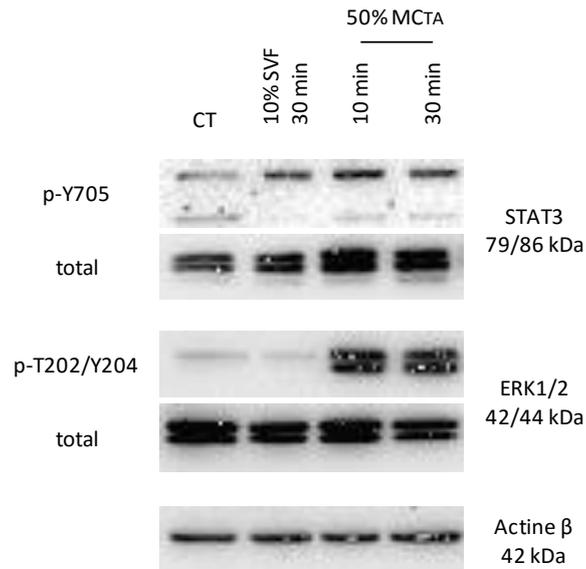


Figure 80 : Activation des voies de signalisation STAT et ERK1/2 par le MCTA dans les cellules MCF7.

Images de détection par Western Blot des formes phosphorylées et totales des protéines STAT3 et ERK1/2.

Les cellules MCF7 ont été cultivées en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). La détection de l'actine-B permet de vérifier le chargement d'une quantité homogène de protéines entre les différents puits.

Un Western Blot a permis d'observer que le MCTA pouvait activer la phosphorylation des protéines STAT3 (sur Tyr705) et ERK1/2 (sur Thr202/Tyr204) dès 10 min et que cette activation était plus marquée qu'en présence de SVF (figure 80).

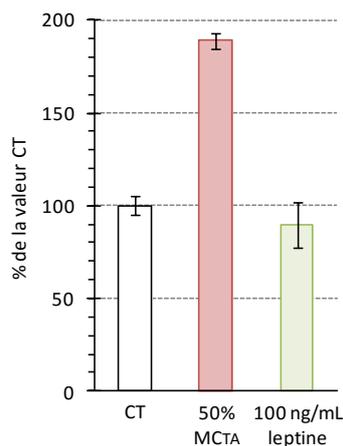


Figure 81 : Implication de la leptine dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Graphique représentant la prolifération de cellules MCF7 cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (MCTA ou leptine) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

De la leptine recombinante a donc été ajoutée à des cellules tumorales dans un test de prolifération, mais la cytokine n'induisait pas de hausse de la prolifération (figure 81). Du MCTA a été utilisé comme contrôle de l'activation de la prolifération. Ces expériences semblaient indiquer que la leptine n'était pas impliquée dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Pour savoir si l'effet du MCTA sur la prolifération des cellules MCF7 faisait intervenir les protéines STAT et ERK1/2, des inhibiteurs chimiques spécifiques ont été utilisés (AG490 et UO126 respectivement) dans des tests de prolifération (figure 82). Lorsque l'inhibiteur de la voie STAT AG490 était ajouté à des cellules MCF7 (figure 82A), la prolifération induite par le SVF et le MCTA n'étaient pas diminuées de manière dose-dépendante. De plus, l'inhibition de la prolifération induite par l'AG490 ne suffisait pas à ramener la prolifération des cellules MCF7 à la valeur CT.

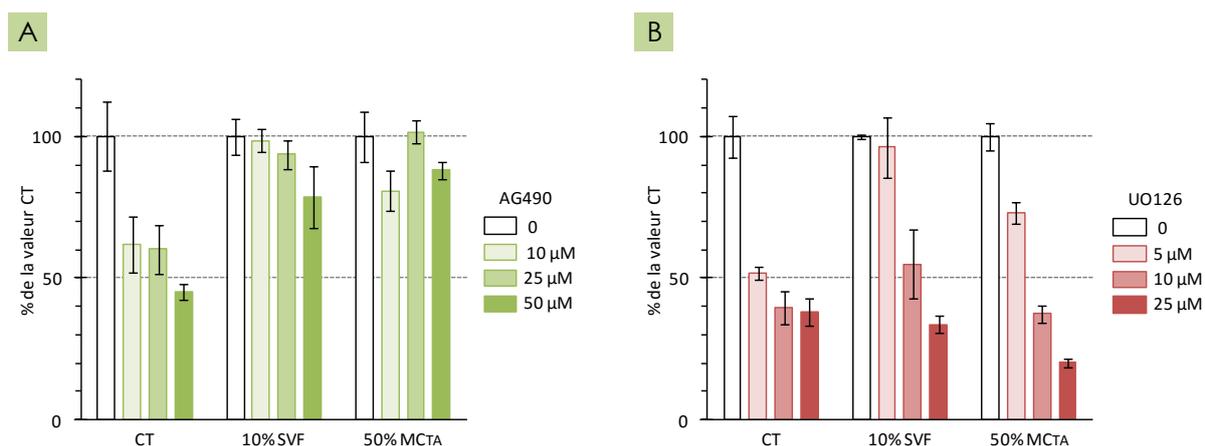


Figure 82 : Implication des voies de signalisation STAT et ERK1/2 dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Graphiques représentant la prolifération de cellules MCF7 cultivées 24 h en présence du traitement indiqué (SVF ou MCTA) dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) et supplémenté en AG490 (A) ou en UO126 (B). L'AG490 et l'UO126 sont des inhibiteurs chimiques de la phosphorylation des protéines STAT et ERK1/2 respectivement. Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 4 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Dans le cas de la voie ERK1/2, l'inhibiteur UO126 provoquait une baisse dose-dépendante de la prolifération induite par le SVF et le MCTA (figure 82B). La baisse de la croissance cellulaire induite par la MCTA en présence de faibles concentrations d'inhibiteur (5 µM) n'était cependant pas assez marquée pour ramener la valeur de prolifération à la valeur CT. Ces résultats semblaient indiquer que les voies de

signalisation STAT et ERK1/2 ne sont pas impliquées dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Modélisation de la quiescence *in vitro* et impact du MCTA

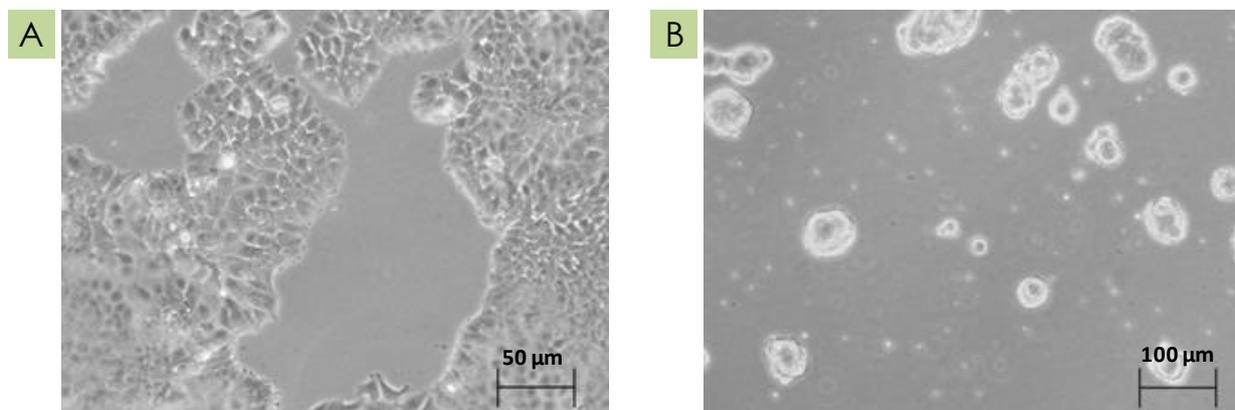


Figure 83 : Photographies de cellules MCF7 cultivées en conditions d'adhérence ou en oncosphères.

Les cellules MCF7 ont été photographiées en conditions normales d'adhérence au plastique (A) ou après 3 jours de culture en conditions de perte d'adhérence (B).

Les cellules MCF7 ont été cultivées en conditions de perte d'adhérence pour induire la formation d'oncosphères (figure 83). Ce mode de culture favorise l'acquisition par les cellules de marqueurs de Cellules Souches Cancéreuses (CSC).

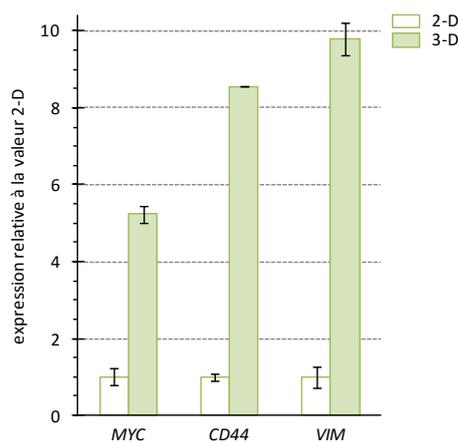


Figure 84 : Influence de la culture en oncosphères sur l'expression génique de marqueurs de CSC par les cellules MCF7.

Graphique représentant l'expression génique des cellules MCF7 cultivées en oncosphères (3-D) relative à celle de cellules cultivées en conditions d'adhérence (2-D). Les résultats exprimés sont des moyennes de 3 valeurs et représentent 11 expériences. Les barres représentent les écart-types.

Dans le cas des cellules MCF7, l'acquisition de ces marqueurs a été observée par RT-PCR. La culture en oncosphères provoquait une hausse de l'expression des gènes *MYC*, *CD44* et *VIM*, respectivement 5, 8,5 et 9,5 fois le niveau d'expression dans des cellules cultivées en conditions d'adhérence (figure 84).

Effet du MCTA sur la Transition Épithélio-Mésenchymateuse

Une des caractéristiques des CSC de carcinome mammaire est la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM). Cette TEM est induite par l'action de facteurs de transcription clés, provoquant notamment un remaniement des protéines d'adhérence qui aboutit à l'augmentation de la mobilité cellulaire et à la dissémination métastatique (figure 85 ; Smit et al., 2009).

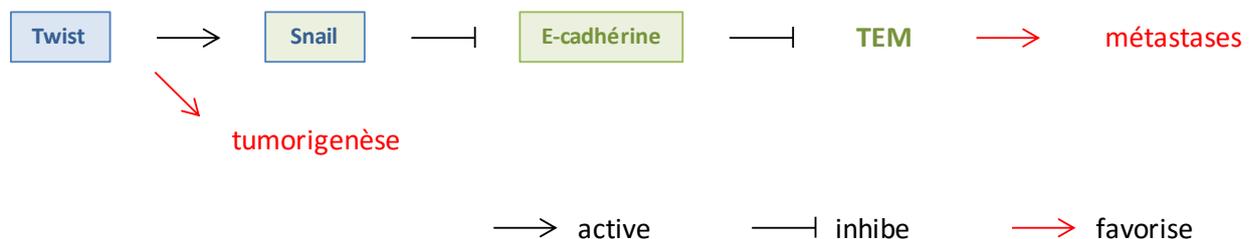


Figure 85 : Schéma de la voie d'induction de la TEM dans les cellules de carcinome mammaire.

Adapté de (Smit et al., 2009).

Dans le cas des cellules MCF7, la culture en oncosphères (3-D, figure 86A) par rapport à la culture monocouche (2-D) induisait une augmentation de l'expression des gènes des facteurs de transcription impliqués dans la TEM : *TWIST1* et 2 et *SNAI1* (respectivement x 5, x 2 et x 3) et une forte baisse de l'expression du gène codant pour la E-cadhérine, *CDH1* (x 0,005). Ces résultats indiquaient que la culture en conditions de perte d'adhérence favorisait l'acquisition de marqueurs de CSC et de la TEM par les cellules MCF7.

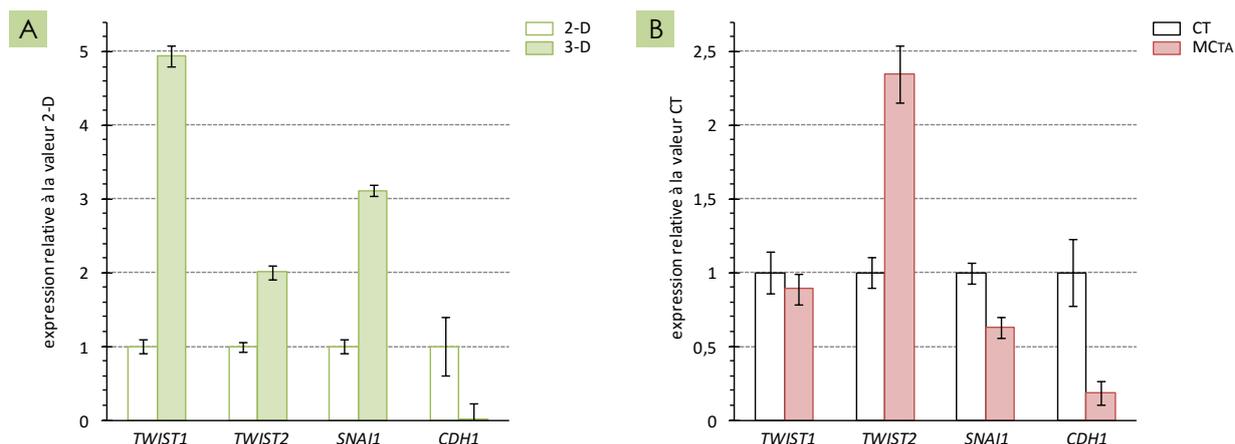


Figure 86 : Influence de la culture en oncosphères et du MCTA sur l'expression génique de marqueurs de la TEM par les cellules MCF7.

A- Graphique représentant l'expression génique des cellules MCF7 cultivées en oncosphères (3-D) relative à celle de cellules cultivées en conditions d'adhérence (2-D). B- Graphique représentant l'expression génique des cellules MCF7 cultivées en oncosphères en présence de MCTA (MCTA) relative à celle de cellules cultivées en oncosphères sans facteurs de croissance (CT). Les résultats exprimés sont des moyennes de 3 valeurs et représentent 7 expériences. Les barres représentent les écart-types.

L'ajout de MCTA à des cellules MCF7 cultivées en oncosphères provoquait une hausse de l'expression du gène *TWIST2* (x 2,5) associée à une baisse de l'expression des gènes *SNAI2* et *CDH1* (x 0,6 et x 0,2 respectivement ; figure 86B). L'expression du gène *TWIST1* n'était pas modifiée. L'augmentation de l'expression de *TWIST2* et la diminution de celle de *CDH1* pourraient indiquer que le MCTA favorisait l'acquisition de marqueurs de la TEM dans les cellules MCF7 cultivées en oncosphères.

TEM et migration cellulaire

La TEM se traduit par une hausse de la mobilité cellulaire, qui peut être observée par des expériences de migration. Les cellules sont placées dans un insert à pores de 8 μm et sont incubées 24 h (figure 87A). À l'issue du traitement, les cellules restées à l'intérieur de l'insert sont enlevées et celles ayant migré vers l'extérieur de l'insert sont fixées puis colorées au *crystal violet*. Il est alors possible de quantifier la migration cellulaire de manière relative en évaluant la part de la surface de l'insert colorée par le *crystal violet*. Afin de déterminer si un fort signal est dû à une forte migration ou à une prolifération des cellules ayant migré, du TGF- β est utilisé comme témoin. En effet cette cytokine n'induit pas de prolifération sur les cellules de carcinome

mammaire mais active la TEM et la migration (Meulmeester and Dijke, 2011; Chen et al., 2015).

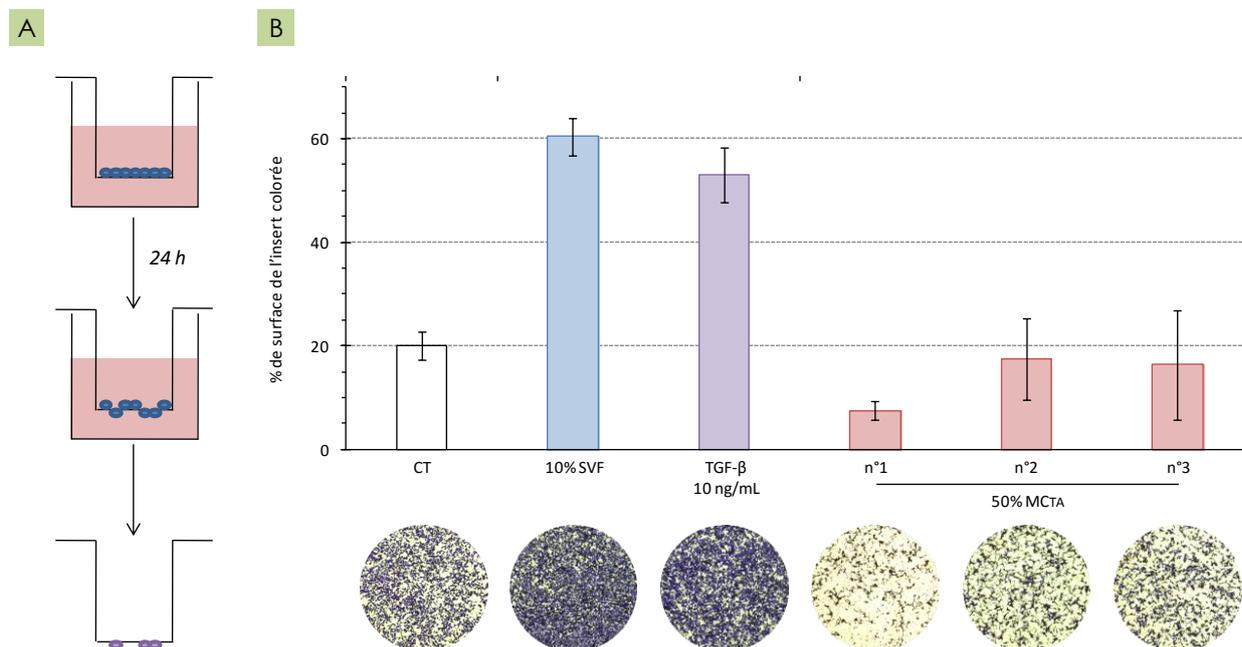


Figure 87 : Capacité de migration des cellules MCF7 et impact du MCTA.

A- Schéma du principe du test de migration. B- Graphique représentant la quantification relative de la migration des cellules MCF7. Les cellules ont été cultivées 24 h en présence de SVF, de TGF-β ou de MCTA issus de 3 donneurs différents (n°1 à 3). Les traitements étaient dilués en milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats sont une moyenne de 4 mesures et représentent 10 expériences. Les barres représentent les écarts-types. Une image représentative de chaque moyenne est indiquée sous chaque condition (grossissement X 40).

La présence de facteurs de croissance (SVF) ou d'un inducteur de la migration (TGF-β) augmentait la quantité de cellules à l'extérieur de l'insert par rapport à la condition contrôle (CT ; + 40 et 35% respectivement ; figure 87B). En revanche, aucun des MCTA testés (3 sont présentés sur 4 testés) n'était capable d'augmenter la part de cellules colorées à l'extérieur de l'insert. Les facteurs solubles du tissu adipeux ne pouvaient donc pas induire la migration des cellules MCF7 en conditions normales d'adhérence.

Les expériences de migration ont été renouvelées sur des cellules MCF7 après que celles-ci aient été cultivées en oncosphères (figure 88A). Après 3 jours de culture en conditions de perte d'adhérence, les cellules MCF7 présentaient une capacité de migration réduite par rapport à des MCF7 non cultivées en oncosphères (- 7% ; figure 88B). Après culture en oncosphères, l'ajout de SVF ne provoquait plus de hausse de la migration des cellules MCF7 (- 5%). Enfin, le MCTA n'induisait pas de changement observable dans la capacité des cellules MCF7 à migrer vers l'extérieur de l'insert (-

5%). La culture en oncosphères des MCF7 avait pour effet d'inhiber leurs capacités de migration.

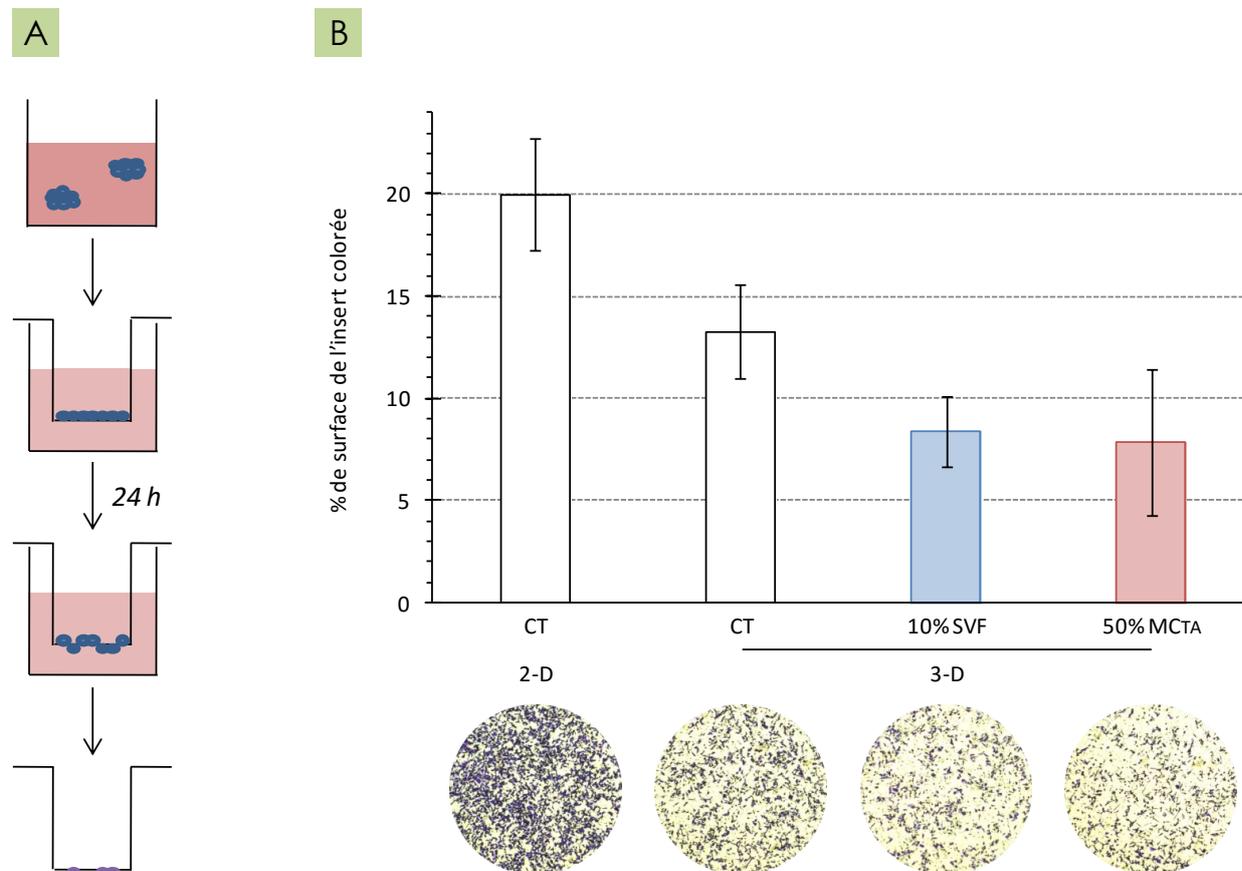


Figure 88 : Impact de la culture en oncosphères des MCF7 sur leur capacité de migration.

A- Schéma du principe du test de migration. B- Graphique représentant la quantification relative de la migration des cellules MCF7 cultivées 24 h en présence de SVF ou de MCTA dilués dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les cellules MCF7 avaient préalablement été cultivées en conditions d'adhérence (2-D) ou en conditions de perte d'adhérence (3-D). Les résultats sont une moyenne de 4 mesures et représentent 6 expériences. Les barres représentent les écart-types. Une image représentative de chaque moyenne est indiquée sous chaque condition (grossissement X 40).

Évaluation de la quiescence et impact du MCTA

Une propriété importante des CSC est la quiescence, caractérisée par une sortie des cellules du cycle cellulaire (phase G_1 vers G_0) et illustrée par la perte de l'expression de la protéine Ki-67. La quiescence cellulaire peut être évaluée par cytométrie en flux grâce à un marquage de la protéine Ki-67 par un anticorps couplé à un fluorochrome, conjointement à un marquage de l'ADN par l'iodure de propidium.

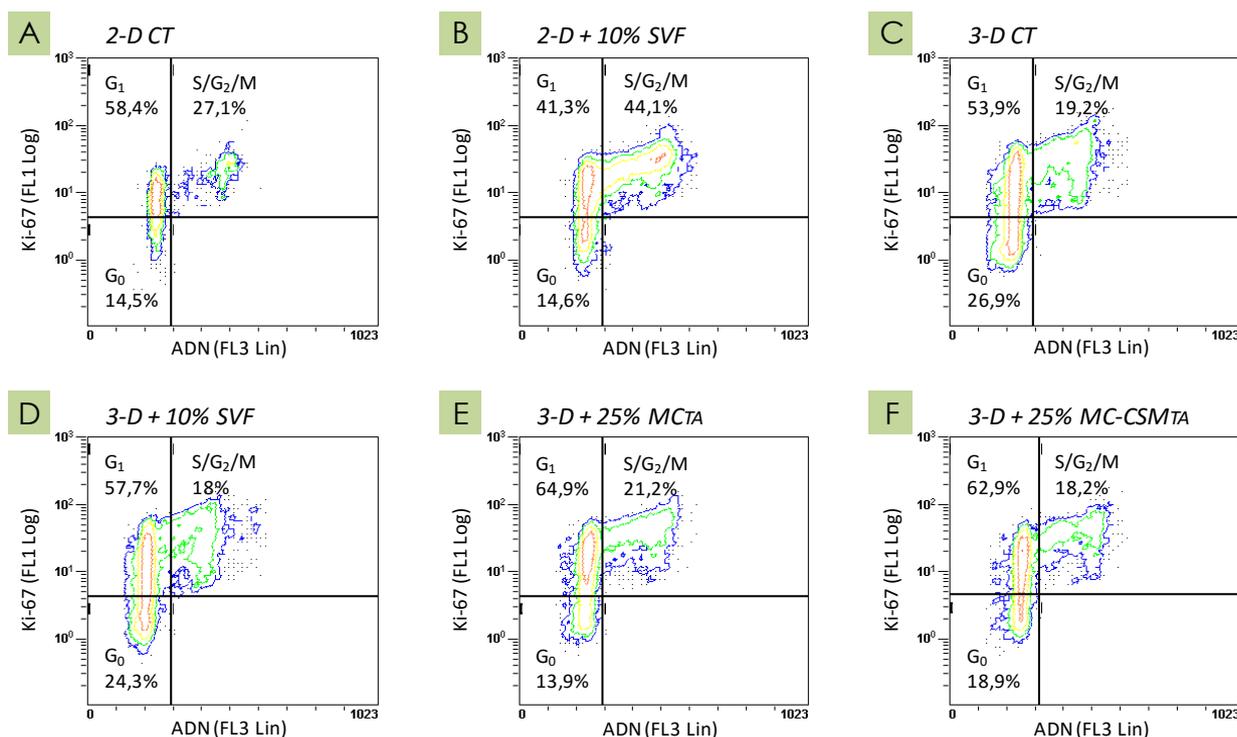


Figure 89 : Observation de la quiescence de cellules MCF7 en sphères et effet de l'ajout de MC de TA et de CSMTA.

Les cellules MCF7 étaient cultivées en conditions d'adhérence (2-D) sans facteurs de croissance (CT, A) ou en présence de SVF (B). Les cellules MCF7 étaient ensuite cultivées pendant 3 jours en conditions de perte d'adhérence sans facteurs de croissance (3-D) pour induire la formation d'oncosphères (C). Une fois en oncosphères, les cellules étaient traitées pendant 48 h avec du SVF (D) du MC- MCTA (E) ou du MC-CSMTA (F), dilués dans du milieu sans facteurs de croissance. Les graphiques sont représentatifs de 6 expériences.

Cultivées en conditions standard d'adhérence, moins de 15% des cellules MCF7 sont négatives pour la détection de la protéine Ki-67. Parmi les 85% restant, 27% étaient réparties dans les différentes phases du cycle cellulaire S/G₂/M (figure 89A). Le pourcentage de cellules en S/G₂/M s'élevait à 44% lorsque les cellules étaient traitées avec du SVF (figure 89B). La culture en conditions de perte d'adhérence provoquait une hausse de la part de cellules n'exprimant pas la protéine Ki-67 (Ki-67⁻; de 14,5% à 27%, figures 89A et 89C) et la plupart des cellules exprimant la protéine Ki-67 (Ki-67⁺) se situaient en phase G₁ (54%). Dans ces conditions, l'ajout de SVF ne provoquait pas de réelle différence sur l'expression de Ki-67 et la répartition dans les différentes phases du cycle des cellules MCF7 (figure 89D). En revanche, l'ajout de MCTA induisait une baisse de la part de cellules n'exprimant pas la protéine Ki-67 (-13% ; figure 89E), au profit d'une augmentation de la part de cellules en phase G₁ (+10%). Seulement une légère hausse de la part de cellules engagées dans les phases S/G₂/M du cycle cellulaire (+2%) était observée. De même, les facteurs solubles de

CSM du TA pouvaient également réduire la part de cellules Ki-67⁻ (- 8% ; figure 89F par rapport à figure 89C). Ces résultats montrent que les milieux conditionnés par le TA et par les CSM du TA pouvaient induire une baisse de la quiescences des cellules MCF7 cultivées en oncosphères.

Des marquages immuno-histochimiques ciblant la protéine Ki-67 ont été réalisés sur des oncosphères formées par des MCF7 (figure 90A) et ont montré une hausse de la part de cellules Ki-67⁺ en présence de MCTA par rapport à la condition CT (+ 28% ; figure 90B). Ces résultats viennent soutenir l'effet des facteurs solubles du Tissu Adipeux sur la sortie de quiescence des cellules de carcinome mammaire, déjà observé précédemment par cytométrie en flux.

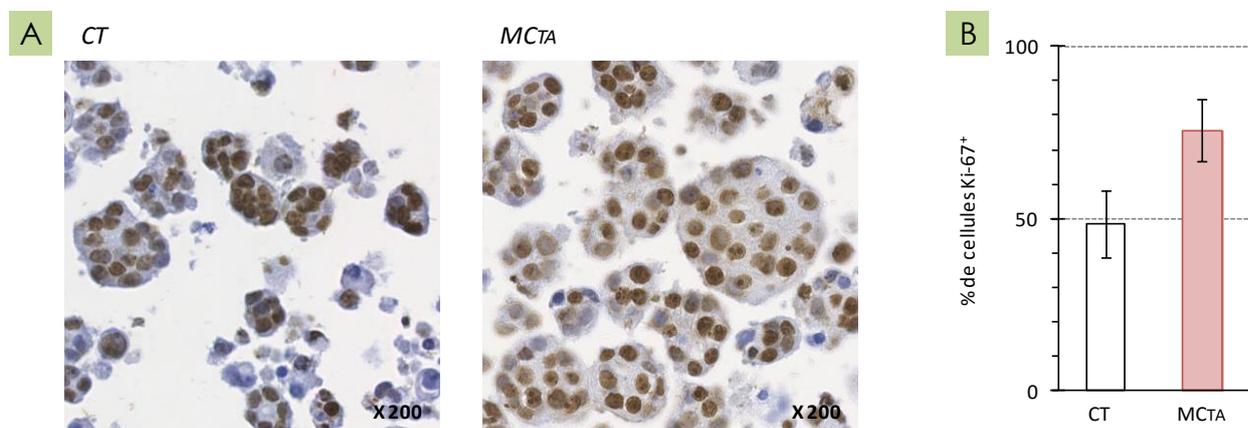


Figure 90 : Observation de la prolifération de cellules MCF7 cultivées en oncosphères.

Les cellules MCF7 ont été cultivées en conditions de perte d'adhérence pendant 3 jours sans facteurs de croissance, puis on été maintenues pendant 48 h dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) ou traitées pendant 48 h avec du MCTA (MCTA). A- Images d'un marquage immuno-histochimique de la protéine Ki-67 sur des cellules MCF7 en conditions CT ou MCTA. B- Graphique représentant le % de cellules MCF7 positives pour la détection de la protéine Ki-67. Les résultats sont une moyenne de 6 comptages sur plus de 2500 cellules chacune. Les barres représentent les écart-types.

Impact du TA injecté dans un carcinome mammaire *in vivo*

Mise en place du modèle préclinique

Pour observer l'effet du TA sur le développement du carcinome mammaire *in vivo*, l'établissement d'un modèle préclinique orthotopique était nécessaire. Deux lignées humaines de cellules tumorales, MCF7 et MDA-MB-231 ont été utilisées, mélangées à

du Matrigel afin d'éviter leur dispersion lors de l'injection. Deux modes d'induction tumorale ont été testés (figure 91A) : une première par injection dans la partie adipeuse de la glande mammaire inguinale droite (intra-glandulaire), et une seconde par injection dans le 4^{ème} canal galactophore gauche (intra-canalair).

La première méthode d'induction par injection intra-glandulaire est la plus couramment pratiquée mais implique un geste chirurgical pour rendre accessible la glande mammaire. De plus, l'injection dans le tissu adipeux donne naissance à une tumeur à proximité des vaisseaux sanguins du stroma, ce qui peut conduire à la formation de nombreuses métastases.

Lorsque les souris recevaient une injection intra-glandulaire de cellules MCF7 (figure 91B), 3 sur 4 développaient une tumeur palpable à partir du 35^{ème} jour ; la 4^{ème} n'a jamais produit de masse observable. Les 3 tumeurs en formation se sont développées de manière progressive jusqu'au 60^{ème} jour. La croissance des tumeurs s'est ensuite révélée variable entre les 3 animaux avec un volume tumoral allant de 225 à 825 mm³ à 80 jours.

Parmi les 4 souris injectées en intra-glandulaire avec des cellules MDA-MB-231 (figure 91C), seules 2 ont contracté une tumeur. Une des 2 tumeurs était observable dès le 20^{ème} jour et s'est développée de façon très rapide pour atteindre près de 4000 mm³ au 47^{ème} jour, obligeant l'euthanasie de l'animal. La 2^{nde} tumeur s'est formée plus tardivement, après 60 jours, mais tout aussi rapidement (+ de 1000 mm³ en moins de 20 jours).

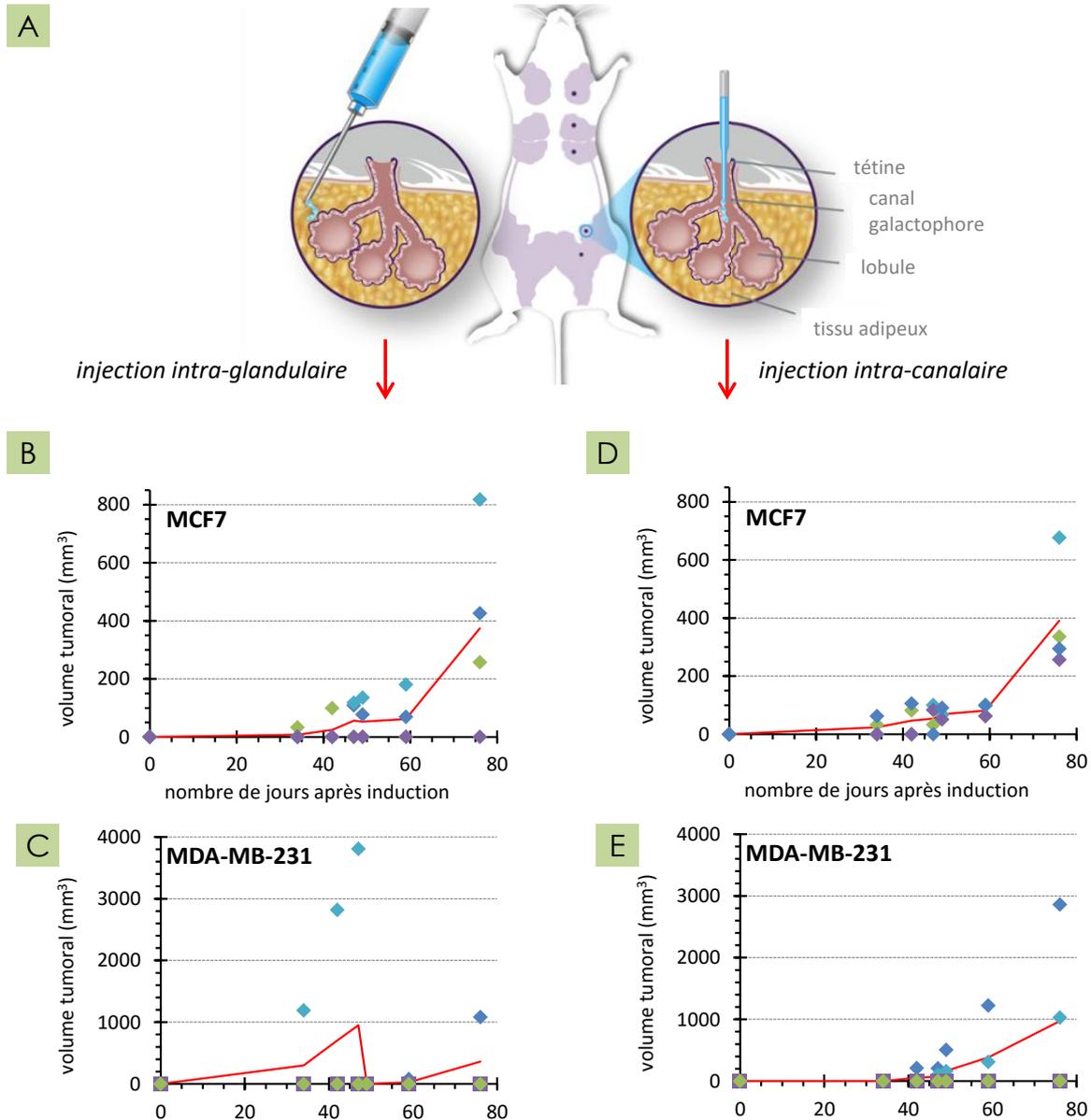


Figure 91 : Induction d'un modèle de carcinome mammaire humain orthotopique chez la souris.

Des cellules de carcinome mammaire humain MCF7 et MDA-MB-231 ont été injectées à des souris nudes de 2 manières différentes: dans le tissu adipeux de la glande mammaire inguinale droite (intra-glandulaire), ou dans le 4^{ème} canal galactophore gauche (intra-canaulaire). A- Schéma illustrant les 2 modes d'induction tumorale. Le suivi temporel du développement tumoral est représenté graphiquement pour les tumeurs induites par injection intra-glandulaire de cellules MCF7 (B) et MDA-MB-231 (C) et par injection intra-canaulaire de cellules MCF7 (D) et MDA-MB-231 (E).

Le second mode d'induction par injection intra-canaulaire évite la chirurgie et permet le développement d'un carcinome canalaire *in situ*. Les cellules tumorales prolifèrent au sein de l'arborescence des canaux galactophores avant d'envahir les tissus environnants.

Les cellules MCF7 induisaient la formation d'une tumeur dans les 4 souris injectées en intra-canaulaire (figure 91D). Le développement des tumeurs, observables à partir du 35^{ème} jour, était très lent jusqu'au 60^{ème} jour puis s'accélérait légèrement : le volume tumoral passait ainsi en moins de 20 jours de 100 à environ 300 mm³ pour 3 des 4 tumeurs et de 100 à 650 mm³ pour la quatrième.

Deux souris sur les 4 ayant reçu une injection intra-canaulaire de MDA-MB-231 ont développé une tumeur, palpable à partir du 40^{ème} jour (figure 91E). Dans les 40 jours suivants, l'une des 2 tumeurs se développait plus rapidement que l'autre pour atteindre près de 3000 mm³ en moins de 40 jours contre 1000 mm³.

D'après ces observations, l'injection de cellules MDA-MB-231 semblait produire des modèles tumoraux à faible incidence (50%) et à développement rapide et très variable. Dans le cas des modèles induits par des cellules MCF7, l'injection intra-canaulaire induisait la meilleure incidence (100%) avec un développement précoce relativement uniforme. Parmi les 4 modèles testés, les tumeurs induites par l'injection intra-canaulaire de cellules MCF7 présentaient la meilleure incidence et le développement le plus homogène.

Des marquages par immuno-histochimie ont été réalisés sur des coupes de tumeurs induites par l'injection intra-canaulaire de cellules MCF7 (figure 92) pour observer l'organisation tumorale. Des images montrent des canaux galactophores envahis par des cellules dont quelques-unes étaient marquées positivement pour la protéine Ki-67 humaine (figure 92, partie haute). Par ailleurs d'autres zones de la tumeur montraient des cellules nettement positives pour la protéine Ki-67 humaine au contact de structures adipeuses et conjonctives (figure 92, partie basse). Ces observations pouvaient indiquer un développement initialement canalaire de la tumeur qui aurait par la suite envahi le tissu adipeux de la glande mammaire, observations semblables aux étapes du développement d'un carcinome mammaire invasif.

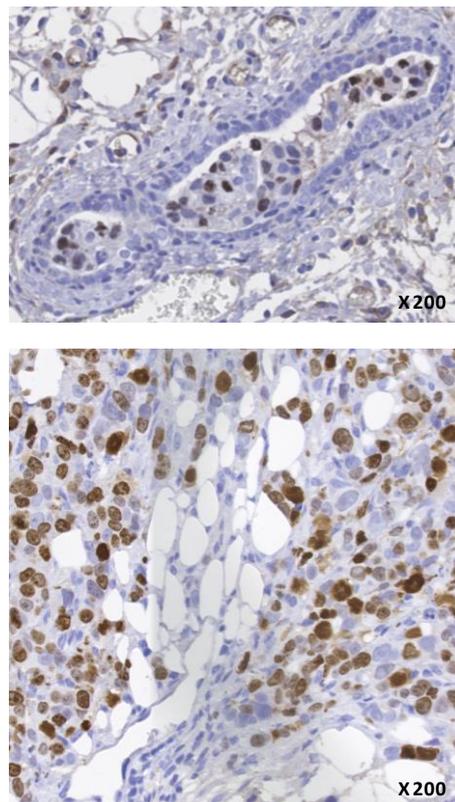


Figure 92 : Organisation des tumeurs induites par injection intra-canaulaire de cellules MCF7.
Images de marquages immuno-histochimiques de la protéine Ki-67 humaine réalisés sur des coupes de tumeurs MCF7 injectées en intra-canaulaire.

Impact du TA et de ses facteurs solubles sur le développement de carcinome mammaire chez la souris nude

L'impact du TA et des facteurs solubles qu'il produit (MCTA) a été testé sur la croissance du carcinome mammaire chez des souris ayant reçu une injection intra-canaulaire de cellules MCF7. Le développement tumoral a été suivi et les injections réalisées au moment où les tumeurs commençaient à devenir palpables (90 jours, flèches figure 93). Selon les groupes, les souris ont reçu soit une injection intra-tumorale de PBS (groupe MCF7 + PBS ; figure 93A) pour reproduire l'inflammation générée par le geste chirurgical, soit de TA (groupe MCF7 + TA; figure 93B), ou de MCTA (groupe MCF7 + MCTA; figure 93C).

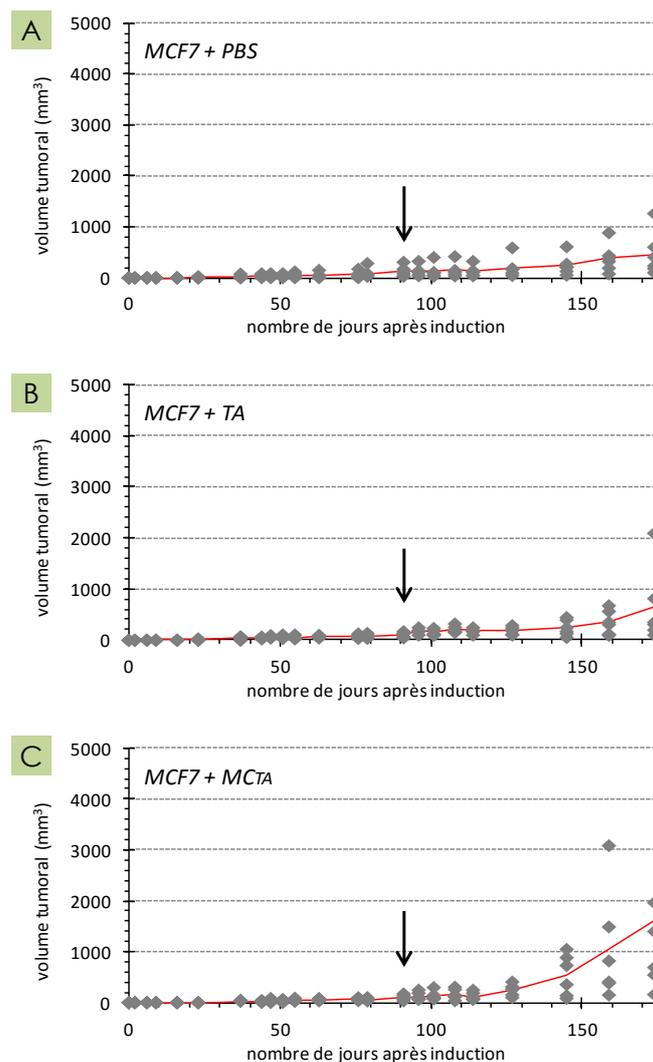


Figure 93 : Suivi temporel du développement du carcinome mammaire induit chez la souris nude.

Les tumeurs ont été induites par injection intra-canaulaire de cellules MCF7 puis ont reçu une injection de PBS (A), de TA (B) ou de MCTA (C). Le temps des injections est indiquée par une flèche. Le volume tumoral moyen est indiqué par une ligne rouge continue, tandis que les mesures individuelles sont identifiées par des points.

La série d'injections n'a pas semblé avoir d'impact sur le développement tumoral dans les souris des groupes MCF7 + PBS et MCF7 + TA pendant les 55 jours suivants l'injection (figures 93A et 93B respectivement). À partir du 159^{ème} jour, seule une des 6 tumeurs injectées par du TA a montré une croissance accélérée (+ 1500 mm³ en 15 jours ; figure 93B). Parmi les 6 tumeurs du groupe MCF7 + MCTA (figure 93C), 3 ont montré un développement semblable à celui des tumeurs injectées avec du PBS (figure 93A), avec des volumes tumoraux croissant progressivement sans dépasser 1000 mm³. Les trois autres tumeurs du groupe MCF7 + MCTA ont montré un développement plus rapide à partir du 145^{ème} jour (figure 93C) avec des volumes

tumoraux passant d'environ 1000 mm³ à 1500 en 15 jours. Une de ces trois tumeurs a même atteint très rapidement un volume critique de plus de 3000 mm³, contraignant à l'euthanasie prématurée de l'animal. Ces observations pourraient suggérer un impact du MCTA sur la croissance tumorale, tandis que le TA n'a pas semblé avoir d'effet sur le développement des tumeurs induites par l'injection intra-canalair de MCF7. Cette expérience devrait être répétée pour confirmer un effet pro-tumoral supérieur des facteurs solubles du TA à celui du TA complet conservant la fraction de CSM et d'adipocytes.

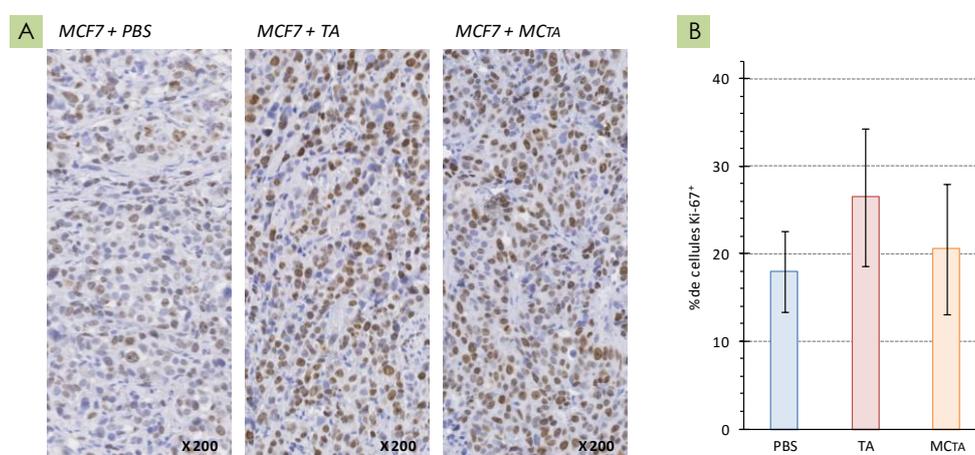


Figure 94 : Influence du TA et du MCTA sur la prolifération de cellules tumorales in vivo.

Des analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes de tumeurs MCF7 ayant reçu une injection de PBS (MCF7 + PBS), de TA (MCF7 + TA) ou de MCTA (MCF7 + MCTA). A- Images de marquages immuno-histochimiques de la protéine Ki-67 humaine sur des tumeurs des 3 groupes. B- Graphique représentant le % de cellules MCF7 positives pour la détection de la protéine Ki-67 au sein des tumeurs. Les résultats sont une moyenne de 6 comptages sur plus de 2500 cellules chacun. Les barres représentent les écart-types.

À l'issue des expériences *in vivo*, les tumeurs ont été analysées par immuno-histochimie. Des marquages de la protéine Ki-67 humaine ont été réalisés sur des coupes de tumeur de chacun des 3 groupes de souris (figure 94A), montrant de grandes zones de prolifération au centre de la masse tumorale. Des expériences de comptage du nombre de cellules marquées positivement pour la protéine Ki-67 par rapport aux cellules totales indiquaient que 18 à 26% des cellules étaient en prolifération (figure 94B). Ces résultats n'ont en revanche pas permis de mettre en évidence une différence du niveau de prolifération des cellules au sein des tumeurs des différents groupes. Ces résultats ont confirmé qu'aucun effet du TA ou de MCTA

sur la croissance du carcinome mammaire ne pouvait être mis en évidence dans ces expériences.

Variabilité des prélèvements de tissu adipeux

L'impact du Tissu Adipeux (TA) et plus particulièrement des facteurs solubles du TA (représentés par le MCTA) sur la croissance *in vitro* des cellules de carcinome mammaire était globalement similaire d'un prélèvement à l'autre ; c'est-à-dire que tous les prélèvements testés induisaient une augmentation de la prolifération. Par contre cette augmentation était variable en pourcentage et pouvait être liée à l'origine des différents échantillons testés (19 donneurs testés sur les cellules MCF7). Ces différences n'étaient sans doute dues qu'à la variabilité entre les différents donneurs, puisque dans notre expérimentation tous les prélèvements ont été récupérés selon la même procédure par la même équipe si ce n'est le même chirurgien.

Cependant, la méthode de récupération du tissu adipeux peut varier d'un chirurgien à l'autre ou d'une région à l'autre. Une infiltration sous-cutanée préalable à la lipoaspiration est facultative mais permet d'obtenir un TA à greffer plus fluide. Le liquide servant à l'infiltration, une solution de Ringer, ou du sérum physiologique, supplémentée avec 0,001% de lactate, peut être en plus supplémentée en adrénaline (0,2%) ; ceci pour limiter l'apparition d'hématome sur le site de prélèvement et permettre l'obtention d'un TA avec une fraction sanguine réduite.

Dans une expérience de prolifération, du liquide de Ringer supplémenté en Lactate et en Adrénaline (RLA) a été ajouté en concentrations croissantes à des cellules MCF7 en culture et a été comparée à l'ajout d'une solution isotonique standard (PBS). Aucune des 2 solutions n'augmentait la prolifération des cellules MCF7, au contraire, l'ajout de PBS ou de RLA dilué de 1 à 10% dans du milieu standard de culture réduisait la croissance cellulaire de 20% par rapport à la condition CT (figure 95). Dilué à 50%, le PBS ou le RLA réduisaient la prolifération de 60% par rapport à la condition CT. Le liquide d'infiltration n'avait donc pas d'effet pro-prolifératif sur les cellules MCF7 et ne compensait pas l'absence de facteurs de croissance contrairement aux milieux conditionnés de TA ou de CSMTA.

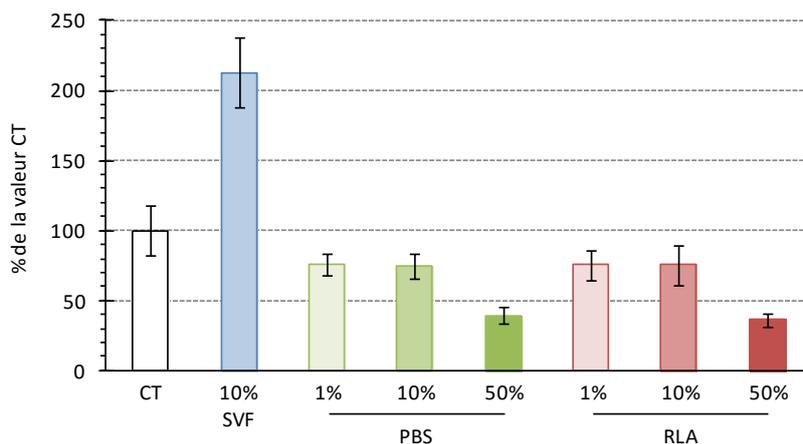


Figure 95 : Effet du liquide d'infiltration utilisé lors d'une GTA sur la prolifération de cellules MCF7.

Graphique représentant la prolifération de cellules MCF7 cultivées 24 h en présence de SVF, de PBS ou de RLA, dilués dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Le liquide d'infiltration -notamment lorsqu'il est supplémenté en adrénaline- peut cependant modifier la composition du TA prélevé et donc sa composition en facteurs solubles (MCTA). En effet l'adrénaline en activant ses récepteurs bêta adrénergiques induit la lipolyse et pourrait ainsi modifier la sécrétion d'acides gras.

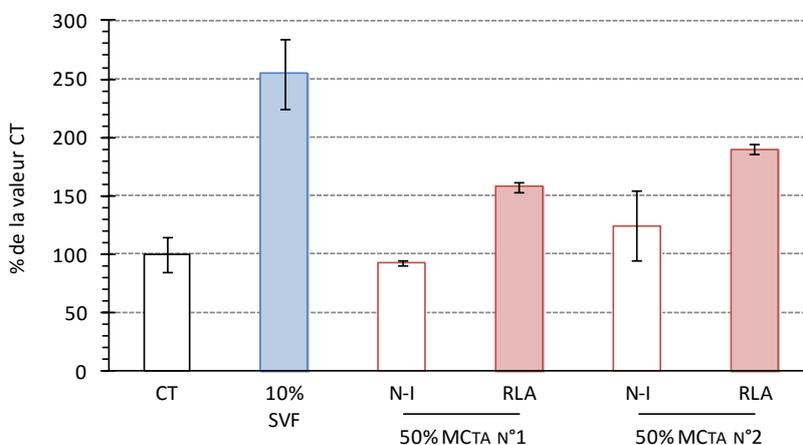


Figure 96 : Impact de l'infiltration du TA sur l'effet pro-prolifératif de ses facteurs solubles.

Graphique représentant la prolifération de cellules MCF7 cultivées 24 h en présence de SVF ou de MCTA issu de 2 donneurs différents (N°1 et n°2), dilués dans du milieu sans facteurs de croissance (CT). Pour chaque donneur, le TA avait été récupéré Non-Infiltré (N-I) ou après infiltration par du RLA (RLA). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 5 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Du TA issu d'une même zone (abdominale) d'une même personne mais d'un site infiltré au RLA ou non infiltré (N-I) a été récupéré sur 2 donneurs pour obtenir du MCTA. Ajouté à des cellules MCF7 en culture, le MCTA N-I n'induisait aucune

augmentation ou une faible augmentation de la prolifération des MCF7 (90 et 120% de la valeur CT respectivement ; figure 96). Lorsque le MC ajouté provenait de TA infiltré au RLA, la prolifération des cellules MCF7 atteignait 155 à 185% de la valeur CT. L'infiltration au RLA du TA avant son prélèvement semblerait responsable de l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Implication des composés lipidiques

Étant donné que l'adrénaline favoriserait la lipolyse dans les adipocytes, l'infiltration du TA avant sa lipoaspiration pourrait modifier sa composition en acides gras (AG). En collaboration avec l'équipe du Pr Stéphane Chevalier (INSERM-UMR1069, Tours), la composition en AG a été observée sur 3 prélèvements de TA, dont 2 prélèvements infiltrés au RLA chez 2 patients différents et un prélèvement provenant de TA non-infiltré pour l'un des deux patients. Leur composition en AG, évaluée par chromatographie en phase gazeuse est présentée dans la figure 97.

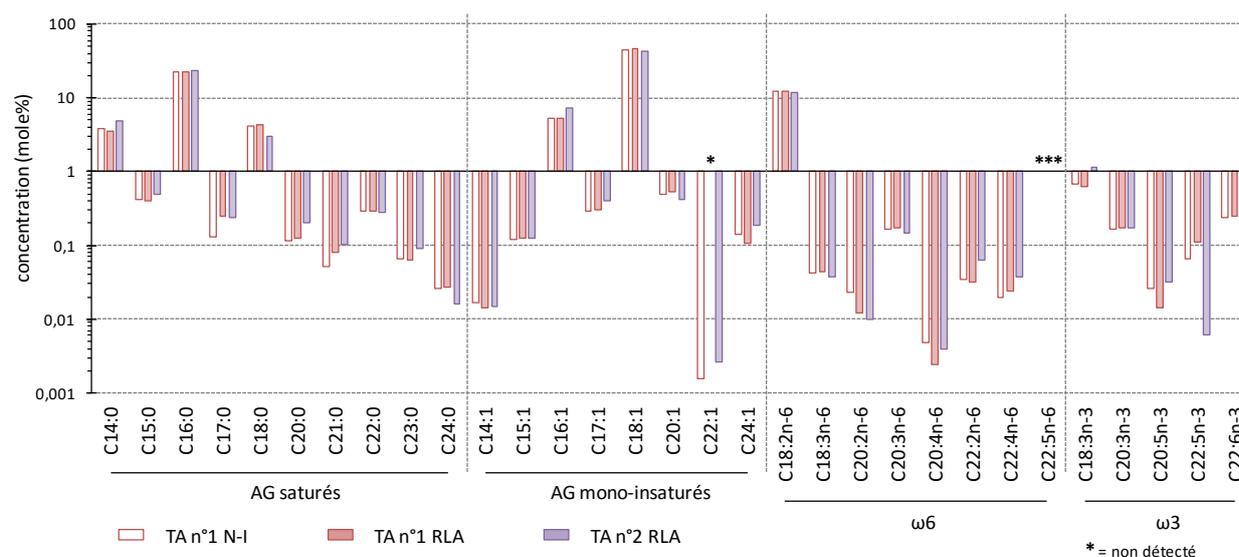


Figure 97 : Dosage des AG dans le TA de 2 patients.

Graphique montrant la concentration relative en AG de différents types : saturés, mono-insaturés, omégas 3 (ω 3) et omégas 6 (ω 6), retrouvée dans le TA de 2 patients (TA n°1 et 2), infiltré au RLA ou non (N-I).

Pour les deux prélèvements (N-I et RLA) provenant du même patient (TA n°1), la composition en AG était très similaire. Néanmoins, les différences ne pourraient être comparées qu'avec l'analyse de plusieurs échantillons par condition. Cependant au vu de ces premiers résultats, il semblerait qu'il y avait plus de différences entre les prélèvements RLA de 2 patients qu'entre les prélèvements N-I et RLA d'un même

patient, particulièrement pour les AG 16:1 (acide palmitoléique), 18:1 (acide oléique) et 18:3n-3 (acide linoléique).

Cette analyse de la composition en triglycérides est toujours en cours et concerne en plus des échantillons non pas de TA, mais de milieux conditionnés par les différents prélèvements de TA, comme utilisés dans les tests de prolifération des cellules tumorales.

Une fraction d'AG extraite de TA péri-prostatique par l'équipe de Tours et décrit comme ayant un effet sur la prolifération de cellules de carcinome prostatique a été ajoutée à du MCTA à des cellules tumorales en culture (figure 98). Aucun effet sur la prolifération des cellules MCF7 n'a été observé suite à leur ajout dans un MCTA non infiltré ou infiltré au RLA (figure 98A). Ce résultat semblait indiquer que l'apport d'AG dans les MCTA n'induirait pas d'augmentation de la prolifération.

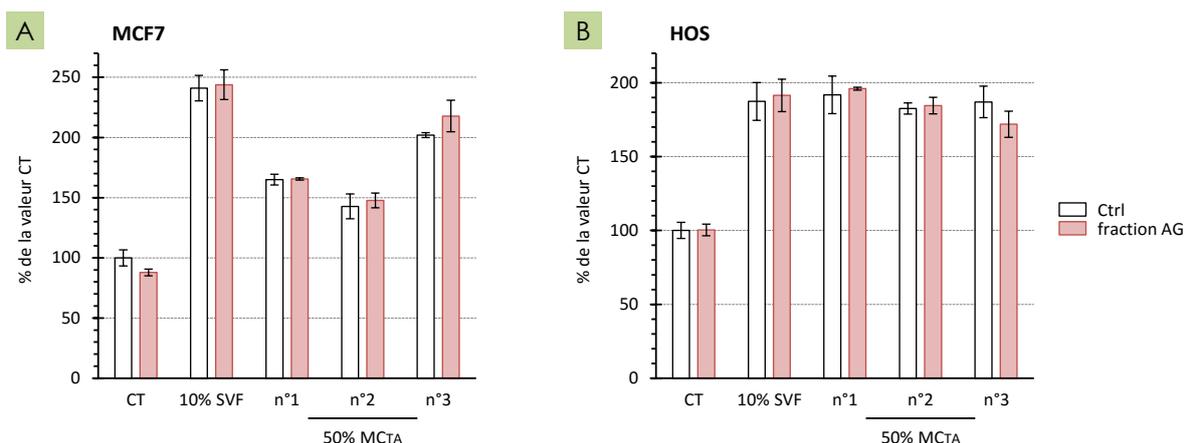


Figure 98 : Effet des AG sur la prolifération des cellules tumorales.

Graphiques montrant la prolifération de cellules MCF7 (A) et HOS (B) cultivées 24 h en présence de SVF ou de MC issu du TA de 3 donneurs différents (MCTA n°1 à n°3), supplémentés ou non avec 30 µM d'une fraction d'AG (série « fraction AG » et « Ctrl », respectivement). Les résultats des graphiques sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 3 manipulations. Les barres représentent les écart-types.

Les mêmes résultats ont été obtenus sur les cellules d'ostéosarcome HOS (figure 98B). L'ajout de 30 µM d'AG n'avait pas d'influence sur la prolifération en présence ou non de MCTA.

L'implication d'un autre composé lipidique, l'acide lysophosphatidique (LPA) sur la prolifération des cellules de carcinome mammaire a été testée. Dans le cas des

cellules d'ostéosarcome HOS, le blocage de la signalisation du LPA par l'ajout d'un inhibiteur, le Ki16425, avait un effet variable sur la prolifération induite par le MCTA. Parmi 3 MCTA, seul un semblait impliquer le LPA dans une partie de son effet pro-prolifératif (figure 47).

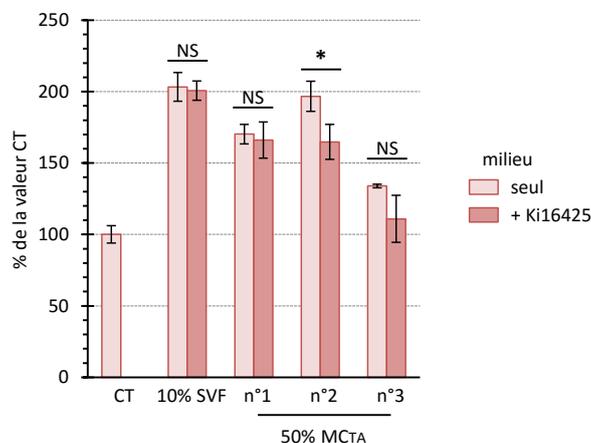


Figure 99 : Implication du LPA dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules MCF7.

Graphique représentant la prolifération des cellules MCF7 cultivées 24 h en présence de SVF ou de MCTA provenant de 3 donneurs (n°1 à n°3), dilué dans du milieu sans facteurs de croissance (CT) seul ou supplémenté par 20 μ M de Ki16425, inhibiteur des récepteurs au LPA. La prolifération des cellules MCF7 est évaluée par analyse de l'activité mitochondriale, observée par test WST-1. Les résultats sont exprimés en % de la valeur CT et sont représentatifs de 4 manipulations. Les barres représentent les écart-types. * : $p < 0,05$; NS : non significatif.

Dans un test de prolifération, de l'inhibiteur du récepteur au LPA, le Ki16425, a été ajouté aux cellules MCF7 en présence des mêmes 3 MCTA que ceux testés sur les HOS (figure 99). La prolifération des cellules MCF7 était augmentée par la présence de SVF (136% de la valeur CT) ou des 3 différents MCTA (de 128 à 148%). L'ajout de Ki16425 n'avait d'effet sur la prolifération qu'en présence du MCTA provenant du donneur n°2 (de 158 à 142%), indiquant que le LPA serait partiellement impliqué dans l'effet pro-prolifératif du MCTA n°2. Or, pour les HOS, l'ajout de Ki16425 bloquait partiellement la prolifération induite par le MCTA n°3, et non par le MCTA n°2.

CONCLUSION

La Greffe de Tissu Adipeux (GTA) dans un contexte post-tumoral étant principalement appliqué suite à un cancer du sein, l'effet du TA sur les cellules de carcinome mammaire a été étudié à travers ses facteurs solubles.

Ainsi, du Milieu Conditionné par le TA (MCTA) activait la prolifération de cellules de carcinome mammaire (MCF7 et MDA-MB-231). Particulièrement sur les cellules MCF7, le MCTA augmentait la part de cellules en phase G_2/M par rapport à des cellules cultivées sans facteurs de croissance.

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses du TA (CSMTA) semblaient contribuer à l'effet pro-prolifératif des facteurs solubles du TA puisque du MC de CSMTA pouvait augmenter fortement la prolifération de cellules MCF7. En revanche, lorsque les CSMTA étaient différenciées dans la voie adipocytaire, leur effet pro-prolifératif n'était pas observable.

L'implication de la leptine, dosée précédemment parmi les cytokines retrouvées dans le MCTA (voir partie I), dans l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les MCF7 a été testée. De la leptine recombinante a été ajoutée aux cellules en culture mais n'induisait pas de hausse de la prolifération.

Bien que les facteurs solubles responsables de l'effet pro-prolifératif du MCTA sur les cellules de carcinome mammaire n'ont pas pu être identifiés, l'activation de la prolifération passe par l'intermédiaire de la voie de signalisation ERK1/2.

Le modèle de culture utilisé précédemment sur les cellules d'ostéosarcome pour obtenir des cellules quiescentes au phénotype de Cellules Souches Cancéreuses (CSC) a été appliqué aux cellules de carcinome mammaire. Les cellules MCF7 cultivées en sphères entraient en quiescence et montraient des caractéristiques de CSC ainsi que l'acquisition de marqueurs de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM).

Dans ces conditions de culture, les facteurs solubles du TA soutenaient l'expression génique des marqueurs de CSC et de la TEM. De plus, l'ajout de MCTA avait pour effet de réduire la part de cellules quiescentes. Le MC-CSMTA favorisait également la sortie de quiescence des cellules MCF7, mais dans une moindre mesure que le MCTA.

Un modèle de carcinome mammaire *in vivo*, induit par l'injection intra-canalair de cellules MCF7, a été mis en place pour observer l'impact du TA et des facteurs solubles du TA sur le développement tumoral. Une injection de TA ne semblait pas avoir d'effet sur la croissance de la tumeur en comparaison avec une injection de PBS, en revanche une injection de MCTA semblait accélérer légèrement le développement tumoral, bien qu'aucune différence de prolifération des cellules MCF7 n'a pu être observée en histologie.

Ces résultats montrent un effet des facteurs solubles du TA et des CSMTA pro-prolifératif sur les cellules de carcinome mammaire, qu'elles soient déjà en prolifération ou en quiescence. Ces observations soutiennent le risque de récurrence tumorale que constitue l'apport de TA, cependant d'autres expérimentations doivent être réalisées pour mieux caractériser l'effet du TA sur les cellules de carcinome mammaire et conclure sur la sécurité de la GTA post-tumorale.

Par ailleurs, la méthode de prélèvement du TA par lipoaspiration préalable à une greffe peut varier fonction des chirurgiens, des zones de prélèvement et du donneur lui-même. En particulier, le TA peut recevoir une injection de solution de Ringer supplémentée en Lactate et en Adrénaline (RLA), susceptible de favoriser la libération d'acides gras (AG) par les adipocytes.

L'ajout du liquide d'infiltration RLA à des cellules MCF7 en culture n'a pas d'effet direct sur leur prolifération. En revanche, l'infiltration au RLA semble avoir un effet sur la composition en facteurs sécrétés du TA. En effet, du MC provenant de TA infiltré au RLA active fortement la prolifération des cellules de carcinome mammaire alors que du MC de TA non infiltré n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire.

Cependant, des résultats préliminaires de dosage des AG n'ont pas mis en évidence de différence de composition en AG causée par l'infiltration au RLA.

Des expériences supplémentaires sont là encore nécessaires pour comprendre l'importance de l'infiltration sur la qualité et la composition du TA.

DISCUSSION GÉNÉRALE

PAR QUEL(S) MÉCANISME(S) LE TA ET LES CSM SOUTIENNENT-ILS LE DÉVELOPPEMENT DE L'OSTÉOSARCOME ?

La croissance de l'ostéosarcome observée *in vivo* dans des modèles préclinique chez la souris est accélérée par l'injection de Tissu Adipeux (TA) dans une tumeur en développement, ainsi que par la présence de Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) lors de l'induction. Néanmoins, l'effet pro-tumoral du TA et des CSM peut s'avérer être différent.

En effet, des lipides issus de l'injection de TA étaient toujours observables à l'issue de l'expérimentation, inclus dans des zones de nécrose. Il est possible que les cellules tumorales alentour soient entrées en sénescence suite à une intense prolifération qu'auraient soutenue les lipides du TA injecté. Cependant, la prolifération des cellules tumorales *in vivo* ne semblait pas différente entre les zones à proximité de lipides et les zones qui en sont plus éloignées.

A l'inverse, les CSM dérivées du TA (CSMTA) co-injectées avec les cellules d'ostéosarcome n'étaient plus détectées 3 semaines après l'induction tumorale, ce qui indique que la promotion de la croissance tumorale par les CSM s'exerce à des temps précoces.

Des expériences *in vitro* ont montré que le TA et les CSM exerçaient un effet pro-prolifératif sur les cellules d'ostéosarcome, par l'intermédiaire de facteurs solubles. Cependant, ces tests *in vitro* ne miment pas les interactions directes des cellules entre elles. Au sein de la tumeur, TA et CSM peuvent promouvoir par contact cellulaire la prolifération des cellules d'ostéosarcome. De plus, le TA et les CSM pourraient également produire du VEGF qui, additionné à celui produit par les cellules tumorales, pourrait renforcer l'angiogenèse dans la tumeur en formation et accélérer sa croissance à un stade précoce de développement. Enfin, les CSM présentes au sein d'une tumeur peuvent présenter des capacités d'immuno-modulation. Cependant, l'utilisation de souris immuno-déficientes dans les modèles précliniques ne permet pas d'évaluer l'implication des lymphocytes T potentiellement modulés par les CSM. Néanmoins, des expériences *in vitro* nous ont amenés à déterminer l'implication de certaines cytokines et chémokines, dont la

production peut être stimulée par les CSM, dans l'établissement d'un environnement favorable au développement de la tumeur. Par exemple, la protéine CXCL12 produite par les CSM peut se complexer à la protéine d'origine nucléaire HMGB1 (High Mobility Group Box 1) pour recruter des fibroblastes, et des cellules leucocytaires pour promouvoir l'inflammation caractérisée notamment par la production d'IL-6 (Schiraldi et al., 2012).

L'effet du TA et des CSM sur le développement de l'ostéosarcome semble se limiter à la croissance tumorale, puisque les atteintes osseuses générées par la tumeur ainsi que la dissémination métastatique n'étaient pas modifiées par l'injection de TA ni par la co-injection de CSM lors de l'induction. Suite à l'injection de pré-ostéoclastes humains, nous n'avons pas observé d'activation de la croissance tumorale ni de l'ostéolyse péri-tumorale, ce qui est contradictoire avec l'idée de leur rôle actif dans le développement de l'ostéosarcome, notamment dans le cercle vicieux (Heymann et al., 2005; Rousseau et al., 2011). Cependant, nous n'avons pas non plus observé de variation du processus métastatique par la présence des pré-ostéoclastes. Or, une précédente étude montrait leur caractéristique anti-métastatique dans l'ostéosarcome (Endo-Munoz et al., 2010). Par ailleurs, la co-injection de pré-ostéoclastes humains avec les cellules d'ostéosarcome n'a pas eu d'impact sur le développement tumoral (primaire ou métastatique), ni sur l'ostéolyse induite par la tumeur.

Ces observations réalisées sur des tumeurs en développement permettent de confirmer que l'usage de CSM dans des stratégies de vectorisation de traitement anti-tumoral, comme suggéré par l'équipe italienne de Grisendi (Grisendi et al., 2015), s'avère dangereux dans le cas de l'ostéosarcome.

QUEL MÉDIATEUR DE L'EFFET PRO-PROLIFÉRATIF DU TA ET DES CSM ?

L'effet pro-prolifératif des facteurs solubles du TA et des CSM a été démontré sur les cellules d'ostéosarcome. Cependant, les molécules responsables de cet effet pro-prolifératif n'ont pas pu être identifiées.

Des dosages ainsi que des blocages de la signalisation de cytokines ont été réalisés sans aboutir à l'identification d'un facteur de nature peptidique. Nous nous sommes focalisés sur des molécules retrouvées en fortes concentrations dans le milieu conditionné par les CSM, et en faibles concentrations dans les milieux conditionnés des cellules d'ostéosarcome. De plus, les molécules ciblées (leptine, IL-6 et IL-8) avaient déjà été décrites comme ayant un effet sur le développement de l'ostéosarcome.

La (ou les molécules) en question peut être de nature lipidique, libérée par les adipocytes du TA par exemple. Les dosages en acide lysophosphatidique (LPA) ainsi qu'en acides gras réalisés à Tours demeurent des résultats très préliminaires, et l'identification des acides gras ainsi que des autres composés solubles de nature lipidique produits par les constituants du TA doit être approfondie.

Par ailleurs, lorsque la signalisation du LPA dans les cellules tumorales était bloquée, l'effet des facteurs solubles du TA sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome n'était réduit que pour un seul des trois TA. Ces résultats suggèrent qu'un effet similaire sur la prolifération peut être dû à l'action de plusieurs molécules présentes simultanément parmi les facteurs solubles du TA en concentrations variables d'un donneur à l'autre. Ces observations soulignent la nécessité de mettre en parallèle l'effet pro-prolifératif d'un TA avec sa composition en cytokines et en lipides.

Cependant, des fractionnements selon le poids moléculaire de milieu conditionné par le TA ont mis en évidence que l'effet pro-prolifératif des facteurs solubles du TA est porté par des molécules ou des complexes moléculaires de haut poids moléculaire (> 50 kDa). Or, le poids moléculaire des cytokines et des lipides non complexés est bas, généralement inférieur à 20 kDa. L'effet pro-prolifératif peut donc être véhiculé par des molécules de structure plus complexe.

Par exemple, la contribution de l'adiponectine à l'effet pro-prolifératif du TA est envisageable puisque cette adipokine peut-être retrouvée sous différentes formes multimériques organisées à partir d'une structure trimérique et atteignant 180 voire 360 kDa (figure 100).

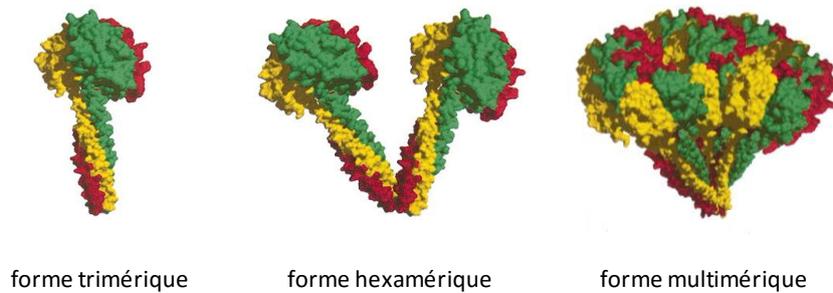


Figure 100 : Schéma de la multimérisation de l'adiponectine.

Extrait de Scherer, 2006.

Les exosomes sont également des complexes de haut poids moléculaire pouvant être produits par les constituants du TA, en particulier les CSM. Ces complexes permettent le transfert de matériel entre deux cellules de protéines ou d'acides nucléiques (Fleury et al., 2014; Martin et al., 2015) et ont montré une implication dans l'effet anti-tumoral de CSM sur des cellules de cancer de la vessie (Wu et al., 2013). Leur propriété de transfert laisse entrevoir une possibilité d'exploitation des exosomes dans des stratégies de thérapie anti-tumorale (Heldring et al., 2015). Par ailleurs, les exosomes expriment potentiellement des protéines à leur surface pouvant stimuler la prolifération de cellules tumorales.

Outre l'effet sur la prolifération, les facteurs solubles produits par le TA peuvent également influencer le métabolisme du glucose au sein de la cellule. Cela a été montré dans les adipocytes (Tréguer et al., 2013) au sein desquels les facteurs solubles du TA modulaient l'entrée de glucose par la modulation de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4. Cet effet sur le métabolisme s'accompagnait d'une promotion de l'inflammation avec une augmentation de l'expression de l'IL-6 et de MCP-1 par les adipocytes. Ces observations étaient plus marquées lorsque les facteurs solubles du TA étaient associés à de l'albumine sérique, qui est une protéine de haut poids moléculaire. Or, dans nos expériences, l'albumine seule pouvait

activer la prolifération des cellules d'ostéosarcome, argument pour étudier plus en détails, l'éventuelle implication de complexes de haut poids moléculaire.

CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES : MODÉLISATION, CARACTÉRISATION ET STIMULATION

Pour se rapprocher du cas clinique de récurrence tumorale, la culture des cellules d'ostéosarcome en sphères s'est révélée concluante puisqu'elle favorisait l'expression génique de marqueurs de Cellules Souches Cancéreuses (CSC) ainsi que la quiescence dans les cellules HOS. Néanmoins, ce modèle mériterait d'être approfondi, par une caractérisation des marqueurs membranaires exprimés (CD133), de transporteurs impliqués dans l'efflux de drogues (ALDH1 ou ABCB5) par les cellules en sphères ou par des tests fonctionnels.

Par exemple, les cellules tumorales peuvent être transduites avec promoteur inducible par l'activité du facteur de transcription POU5F1, surexprimé dans les CSC, associé à un gène rapporteur comme celui codant pour la protéine fluorescente EGFP. Ainsi, les cellules acquérant un phénotype de CSC deviendraient observables en fluorescence comme cela a déjà été réalisé (Levings et al., 2009). Il serait également envisageable d'observer l'activité ALDH1 des cellules cultivées en sphères et de la comparer à celle de cellules tumorales en prolifération ou à celle de CSM.

La capacité de multipotence des cellules d'ostéosarcome cultivées en sphères pourrait également être évaluée par des tests de différenciation dans les voies adipocytaire et ostéoblastique.

La résistance aux drogues de chimiothérapie par les CSC n'a pas été exploitée. Dans le cancer du sein, il a été montré que cette résistance faisait intervenir la voie de signalisation des β -caténines et de Wnt. Or, cette voie de signalisation favorise l'expression des gènes marqueurs de cellules souches *POU5F1*, *NANOG* ou encore *SOX2* et réprime l'expression du marqueur chondrocytaire précoce *SOX9*.

L'implantation des sphères formées par les cellules tumorales en culture chez la souris permettrait d'évaluer une tumorigénicité accrue. Cette méthode d'induction tumorale récemment décrite (Szade et al., 2015) semblerait plus proche de la réalité de la tumorigénèse avec l'utilisation d'un nombre plus restreint de cellules ainsi qu'une nécrose intra-tumorale survenant plus tardivement grâce à une

angiogenèse tumorale précoce. L'implantation de cellules quiescentes chez l'animal constituerait ainsi un nouveau modèle préclinique de récurrence tumorale. La description d'un modèle de récurrence qui resterait proche de la réalité clinique est en effet rare ; celui présenté récemment par Aanstoos étant de surcroît aux limites de l'éthique animale, incluant une amputation et l'utilisation d'un grand nombre d'animaux (Aanstoos et al., 2015).

Les CSC peuvent présenter un métabolisme différent de celui des cellules du reste de la masse tumorale. Ainsi, il a été montré que les cellules d'ostéosarcomes pouvaient favoriser la production de lactate par les CSM, via le transporteur MCT-4, en augmentant leur consommation d'oxygène. Ce lactate serait ensuite capté par les cellules tumorales via le transporteur MCT-1, pour être consommé dans le cycle de Krebs (Bonuccelli et al., 2014).

Enfin, les CSC sont maintenues en quiescence au sein d'un microenvironnement particulier, qui leur est favorable : la niche tumorale. Dans le cas de l'ostéosarcome, cette niche prend place dans l'os, particulièrement dans la moelle osseuse (MO), puisque la plupart des ostéosarcomes sont centraux. Or, il y a des adipocytes blancs et beiges qui pourraient contribuer à l'établissement d'une niche tumorale mais que nous n'avons pas encore étudiés.

La présence de TA médullaire à proximité des CSC, dans le cas clinique de récurrence locale et tardive, n'a pas provoqué l'apparition d'une nouvelle tumeur. Il aura fallu une GTA et donc l'apport de TA d'origine sous-cutanée pour que les CSC soient à nouveau stimulées et forment une nouvelle tumeur.

Le TA, selon sa provenance, n'aurait donc pas le même effet sur les CSC dans l'ostéosarcome. Des travaux récents ont contribué à caractériser le TA de la MO et à le comparer au TA sous-cutané, notamment au niveau des facteurs qu'ils produisent (Ong et al., 2014; Poloni et al., 2013; Rubio et al., 2014). Les effets du TA de la MO ou sous-cutané pourraient s'avérer différents sur l'ostéosarcome. Dans ce cas, en s'appuyant sur une différence de sécrétome, il sera peut-être possible d'identifier enfin les molécules responsables de l'effet pro-prolifératif du TA sur les cellules d'ostéosarcome.

GTA ET CANCER DU SEIN, FAUT-IL CONTINUER ?

L'ouverture des travaux présentés dans cette thèse vers l'effet du TA sur le carcinome mammaire s'est appuyée sur la fréquence d'application de la GTA après un cancer du sein, bien supérieure à son application après une tumeur osseuse, et sur la mise en évidence d'un risque accru de récurrence tumorale après une GTA chez certaines catégories de patientes : jeunes et dont le premier cancer s'était avéré agressif ou de haut grade (Petit et al., 2013).

Notre laboratoire n'étant pas spécialiste du cancer du sein, ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Sophie Barillé. Ils ont montré un effet pro-prolifératif des facteurs solubles du TA sur les cellules de carcinome mammaire, mais sans pouvoir identifier le ou les facteurs responsables, comme dans l'ostéosarcome.

En revanche, les facteurs solubles produits par le TA et par les CSM du TA (CSMTA) pouvaient également favoriser la sortie de quiescence de cellules cultivées en conditions de perte d'adhérence, au phénotype proche de celui de CSC. De plus, les facteurs solubles semblaient promouvoir l'expression de marqueurs de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM) des cellules en sphères. Parmi les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la TEM, l'activation de ERK1/2 serait responsable de la baisse de l'expression de la E-cadhérine (Ichikawa et al., 2015). Or, la voie ERK1/2 était stimulée par les facteurs solubles du TA. La baisse de l'expression de la E-cadhérine peut aussi être influencée par des mécanismes de régulation épigénétique, faisant notamment intervenir la protéine CtBP (C-terminal domain Binding Protein ; Di et al., 2013) qui est également associée à l'expression de marqueurs de CSC et de CSM.

Cependant, malgré la hausse de l'expression des marqueurs de la TEM induite par la culture en sphères et soutenue par l'ajout de facteurs solubles du TA, les cellules de carcinome mammaire n'avaient pas de capacités migratoires accrues, au contraire. Il conviendrait donc de s'intéresser à la régulation d'autres cadhérines comme la N-cadhérine (cadhérine 2) ou la cadhérine 11, qui sont des marqueurs de cellules d'origine mésenchymateuse, impliquées dans la TEM et dans l'intra-vasation (Assefnia et al., 2014; Marie et al., 2014; Ramis-Conde et al., 2009) mécanisme

pouvant être employé par les cellules de carcinome, d'origine épithéliale, lors de la dissémination métastatique.

Une voie de signalisation clef dans la régulation de la TEM, en particulier dans l'expression des cadhérine, est la voie Wnt/ β -caténine. En effet les β -caténines sont impliquées dans la liaison intracellulaire des cadhérines avec le cytosquelette (Marie et al., 2014) ainsi que dans l'activation de l'expression des gènes *MYC* (He et al., 1998) , *CD44* (Wielenga et al., 1999), *SNAIL* (Berge et al., 2008) ou encore *TWIST1* (Howe et al., 2003) et dans la répression de l'expression du gène *CDH1* (Berge et al., 2008).

Pour attester de l'obtention de CSC de carcinome mammaire ayant effectué la TEM, le modèle de culture en sphères mérite donc d'être amélioré, en s'appuyant notamment sur la caractérisation des différences métaboliques entre les CSC et le reste des cellules tumorales récapitulée récemment (Vlashi et al., 2014). En effet, les CSC, qui comporteraient plus de mitochondries que les autres cellules, consommeraient également plus de glucose et d'oxygène en produisant moins de lactate, ce qui indiquerait une phosphorylation oxydative et des réserves en ATP accrues.

Des observations préliminaires ont permis de mettre en évidence que l'infiltration du TA par du liquide de Ringer supplémenté en Lactate et en Adrénaline (RLA) sur le site donneur avant sa lipoaspiration pouvait avoir une influence sur l'effet des facteurs solubles du TA sur la prolifération de cellules de carcinome mammaire. L'action des catécholamines sur la lipolyse au sein des adipocytes pourrait constituer un début d'explication. Avant de conclure trop précipitamment sur le risque d'infiltrer le TA avant d'effectuer une greffe, il conviendrait donc de réaliser des études supplémentaires plus approfondies.

En effet, s'il est possible de recenser les zones de prélèvement du TA ainsi que le type de traitement du TA avant sa lipoaspiration, il serait important de mettre en place une étude rétrospective évaluant le risque de récurrence tumorale chez des patientes ayant reçu une GTA incluant ou non une infiltration préalable du TA.

L'ensemble de ces résultats sur le carcinome mammaire indiquent un effet pro-tumoral des facteurs solubles du TA. L'apport de TA, enrichi ou non en CSM, par

greffe autologue dans un contexte post-tumoral contribuerait donc à accroître le risque de récurrence de cancer du sein.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aanstoos, M.E., Regan, D.P., Rose, R.J., Chubb, L.S., and Ehrhart, N.P. (2015). Do Mesenchymal Stromal Cells Influence Microscopic Residual or Metastatic Osteosarcoma in a Murine Model? *Clin. Orthop. Relat. Res.*
- Allison, D.C., Carney, S.C., Ahlmann, E.R., Hendifar, A., Chawla, S., Fedenko, A., Angeles, C., and Menendez, L.R. (2012). A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012, 704872.
- Amar, O., Bruant-Rodier, C., Lehmann, S., Bollecker, V., and Wilk, A. (2008). Greffe de tissu adipeux : restauration du volume mammaire après traitement conservateur des cancers du sein, aspect clinique et radiologique. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* 53, 169–177.
- Amatangelo, M.D., Goodyear, S., Varma, D., and Stearns, M.E. (2012). c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer. *Carcinogenesis* 33, 1965–1975.
- Assefnia, S., Dakshanamurthy, S., Guidry Auvil, J.M., Hampel, C., Anastasiadis, P.Z., Kallakury, B., Uren, A., Foley, D.W., Brown, M.L., Shapiro, L., et al. (2014). Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget* 5, 1458–1474.
- Bacci, G., Ferrari, S., Bertoni, F., Ruggieri, P., Picci, P., Longhi, A., Casadei, R., Fabbri, N., Forni, C., Versari, M., et al. (2000). Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J. Clin. Oncol.* 18, 4016–4027.
- Bastard, J.-P., and Fève, B. (2013). *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux* (Springer Science & Business Media).
- Basu-Roy, U., Basilico, C., and Mansukhani, A. (2013). Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett.* 338, 158–167.
- Berge, D. ten, Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., and Nusse, R. (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 3, 508–518.
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., et al. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16281–16286.
- Bian, Z.-Y., Fan, Q.-M., Li, G., Xu, W.-T., and Tang, T.-T. (2010). 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, 2554–2560.
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., et al. (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients

treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* 20, 776–790.

Billiau, A., Edy, V.G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J.A., and De Somer, P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12, 11–15.

Bonuccelli, G., Avnet, S., Grisendi, G., Salerno, M., Granchi, D., Dominici, M., Kusuzaki, K., and Baldini, N. (2014). Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* 5, 7575–7588.

Borlado, L.R., and Méndez, J. (2008). CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis* 29, 237–243.

Boucharaba, A., Serre, C.-M., Grès, S., Saulnier-Blache, J.S., Bordet, J.-C., Guglielmi, J., Clézardin, P., and Peyruchaud, O. (2004). Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 114, 1714–1725.

Bourlier, V., Zakaroff-Girard, A., Miranville, A., De Barros, S., Maumus, M., Sengenès, C., Galitzky, J., Lafontan, M., Karpe, F., Frayn, K.N., et al. (2008). Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117, 806–815.

Brennan, M.Á., Renaud, A., Amiaud, J., Rojewski, M.T., Schrezenmeier, H., Heymann, D., Trichet, V., and Layrolle, P. (2014). Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther* 5, 114.

Burguera, B., Brunetto, A., Garcia-Ocana, A., Teijeiro, R., Esplen, J., Thomas, T., Couce, M.E., and Zhao, A. (2006). Leptin increases proliferation of human osteosarcoma cells through activation of PI(3)-K and MAPK pathways. *Med. Sci. Monit.* 12, BR341–BR349.

Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., and Reeves, W.J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 661–674.

Chan, C.W., McCulley, S.J., and Macmillan, R.D. (2008). Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61, 1438–1448.

Chen, H.-S., Bai, M.-H., Zhang, T., Li, G.-D., and Liu, M. (2015). Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-β/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* 46, 1730–1738.

Cho, K.B., Cho, M.K., Lee, W.Y., and Kang, K.W. (2010). Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett.* 293, 230–239.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 9–15.

Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297, E977–E986.

- Coleman, S.R. (1995). Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 19, 421–425.
- Coleman, S.R., and Saboeiro, A.P. (2007). Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast. Reconstr. Surg.* 119, 775–785; discussion 786–787.
- Connell-Crowley, L., Harper, J.W., and Goodrich, D.W. (1997). Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 8, 287–301.
- Cordonnier, T., Langonné, A., Sohier, J., Layrolle, P., Rosset, P., Sensébé, L., and Deschaseaux, F. (2011). Consistent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 249–259.
- Covarrubias, P., Cárdenas-Camarena, L., Guerrerrosantos, J., Valenzuela, L., Espejo, I., Robles, J.A., and Gioia, S. (2013). Evaluation of the Histologic Changes in the Fat-Grafted Facial Skin: Clinical Trial. *Aesth Plast Surg* 37, 778–783.
- Crocker, A.K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B.D., Hess, D.A., and Allan, A.L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2236–2252.
- Curley, M.D., Therrien, V.A., Cummings, C.L., Sergent, P.A., Koulouris, C.R., Friel, A.M., Roberts, D.J., Seiden, M.V., Scadden, D.T., Rueda, B.R., et al. (2009). CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 27, 2875–2883.
- David, E., Tirode, F., Baud'huin, M., Guihard, P., Laud, K., Delattre, O., Heymann, M.F., Heymann, D., Redini, F., and Blanchard, F. (2012). Oncostatin M is a growth factor for Ewing sarcoma. *Am. J. Pathol.* 181, 1782–1795.
- David, M., Wannecq, E., Descotes, F., Jansen, S., Deux, B., Ribeiro, J., Serre, C.-M., Grès, S., Bendriss-Vermare, N., Bollen, M., et al. (2010). Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS ONE* 5, e9741.
- Debnath, J., and Brugge, J.S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat. Rev. Cancer* 5, 675–688.
- Delaporte, T., Delay, E., Toussoun, G., Delbaere, M., and Sinna, R. (2009). [Breast volume reconstruction by lipomodelling technique: about 15 consecutive cases]. *Ann Chir Plast Esthet* 54, 303–316.
- Delay, E., Garson, S., Toussoun, G., and Sinna, R. (2009). Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J* 29, 360–376.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* 13, 4429–4434.

- Di, L.-J., Byun, J.S., Wong, M.M., Wakano, C., Taylor, T., Bilke, S., Baek, S., Hunter, K., Yang, H., Lee, M., et al. (2013). Genome-wide profiles of CtBP link metabolism with genome stability and epithelial reprogramming in breast cancer. *Nat Commun* 4, 1449.
- Dieudonne, M.-N., Machinal-Quelin, F., Serazin-Leroy, V., Leneveu, M.-C., Pecquery, R., and Giudicelli, Y. (2002). Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 622–628.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dujardin, F., Binh, M.B.N., Bouvier, C., Gomez-Brouchet, A., Larousserie, F., Muret, A. de, Louis-Brennetot, C., Aurias, A., Coindre, J.-M., Guillou, L., et al. (2011). 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* 24, 624–637.
- Duplomb, L., Baud'huin, M., Charrier, C., Berreur, M., Trichet, V., Blanchard, F., and Heymann, D. (2008). 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, 3688–3697.
- Endo-Munoz, L., Cumming, A., Sommerville, S., Dickinson, I., and Saunders, N.A. (2010). Osteosarcoma is characterised by reduced expression of markers of osteoclastogenesis and antigen presentation compared with normal bone. *Br. J. Cancer* 103, 73–81.
- Ferrari, S., Briccoli, A., Mercuri, M., Bertoni, F., Cesari, M., Longhi, A., and Bacci, G. (2006). Late relapse in osteosarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 28, 418–422.
- Fleury, A., Martinez, M.C., and Le Lay, S. (2014). Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front Immunol* 5, 370.
- Fogh, J., Wright, W.C., and Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 209–214.
- Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., Yoshitani, K., and Takakura, Y. (2009). Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 34, 1381–1386.
- Gamblin, A.-L., Brennan, M.A., Renaud, A., Yagita, H., Lézot, F., Heymann, D., Trichet, V., and Layrolle, P. (2014). Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials* 35, 9660–9667.
- Geissler, P.J., Davis, K., Roostaeian, J., Unger, J., Huang, J., and Rohrich, R.J. (2014). Improving fat transfer viability: the role of aging, body mass index, and harvest site. *Plast. Reconstr. Surg.* 134, 227–232.

- Giannoudis, P.V., and Pountos, I. (2005). Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury* 36 Suppl 4, S2–S5.
- Gibbs, C.P., Kukekov, V.G., Reith, J.D., Tchigrinova, O., Suslov, O.N., Scott, E.W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7, 967–976.
- Gir, P., Brown, S.A., Oni, G., Kashefi, N., Mojallal, A., and Rohrich, R.J. (2012). Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast. Reconstr. Surg.* 130, 249–258.
- Goodyear, S.M., Amatangelo, M.D., and Stearns, M.E. (2009). Dysplasia of human prostate CD133(hi) sub-population in NOD-SCIDS is blocked by c-myc anti-sense. *Prostate* 69, 689–698.
- Gosset, J., Guerin, N., Toussoun, G., Delaporte, T., and Delay, E. (2008). [Radiological evaluation after lipomodelling for correction of breast conservative treatment sequelae]. *Ann Chir Plast Esthet* 53, 178–189.
- Vander Griend, D.J., Karthaus, W.L., Dalrymple, S., Meeker, A., DeMarzo, A.M., and Isaacs, J.T. (2008). The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 68, 9703–9711.
- Griffith, J.F., Kumta, S.M., Chow, L.T.C., Leung, P.C., and Metreweli, C. (1998). Intracortical osteosarcoma. *Skeletal Radiol* 27, 228–232.
- Grisendi, G., Bussolari, R., Veronesi, E., Piccinno, S., Burns, J.S., De Santis, G., Loschi, P., Pignatti, M., Di Benedetto, F., Ballarin, R., et al. (2011). Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *Am J Cancer Res* 1, 787–805.
- Grisendi, G., Spano, C., D'souza, N., Rasini, V., Veronesi, E., Prapa, M., Petrachi, T., Piccinno, S., Rossignoli, F., Burns, J.S., et al. (2015). Mesenchymal progenitors expressing TRAIL induce apoptosis in sarcomas. *Stem Cells* 33, 859–869.
- Guinebretiere, J., Le Cesne, A., Le Pechoux, C., Missenard, G., Bonvalot, S., Terrier, P., and Vanel, D. (2001). Osteosarcome de forme commune.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3983–3988.
- Hardwick, J.C., Van Den Brink, G.R., Offerhaus, G.J., Van Deventer, S.J., and Peppelenbosch, M.P. (2001). Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 121, 79–90.
- Härmä, V., Knuutila, M., Virtanen, J., Mirtti, T., Kohonen, P., Kovanen, P., Happonen, A., Kaewphan, S., Ahonen, I., Kallioniemi, O., et al. (2012). Lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate promote morphogenesis and block invasion of prostate cancer cells in three-dimensional organotypic models. *Oncogene* 31, 2075–2089.

He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.

Heilbronn, L.K., and Campbell, L.V. (2008). Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1225–1230.

Heldring, N., Mäger, I., Wood, M.J.A., Le Blanc, K., and Andaloussi, S.E.L. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Hum. Gene Ther.* 26, 506–517.

Hernigou, P., and Beaujean, F. (1997). [Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 83, 495–504.

Hernigou, P., and Beaujean, F. (2002). Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 14–23.

Hernigou, P., Flouzat Lachaniette, C.H., Delambre, J., Chevallier, N., and Rouard, H. (2014). 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, 1825–1835.

Hernigou, P., Flouzat-Lachaniette, C.-H., Delambre, J., Poignard, A., Allain, J., Chevallier, N., and Rouard, H. (2015). Osteonecrosis repair with bone marrow cell therapies: state of the clinical art. *Bone* 70, 102–109.

Hess, D.A., Meyerrose, T.E., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Creer, M.H., and Nolte, J.A. (2004). Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 104, 1648–1655.

Heymann, D., Ory, B., Blanchard, F., Heymann, M.-F., Coipeau, P., Charrier, C., Couillaud, S., Thiery, J.P., Gouin, F., and Redini, F. (2005). Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 37, 74–86.

Honma, S., Shimodaira, K., Shimizu, Y., Tsuchiya, N., Saito, H., Yanaihara, T., and Okai, T. (2002). The influence of inflammatory cytokines on estrogen production and cell proliferation in human breast cancer cells. *Endocr. J.* 49, 371–377.

Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A.M.C. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res.* 63, 1906–1913.

Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382–3389.

Hwang, S., and Panicek, D.M. (2007). Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 1. *Skeletal Radiol.* 36, 913–920.

Ichikawa, K., Kubota, Y., Nakamura, T., Weng, J.S., Tomida, T., Saito, H., and Takekawa, M. (2015). MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Mol. Cell* 58, 35–46.

Institut National Du cancer (2015). Les données - Incidence et mortalité estimées des cancers chez la femme en France métropolitaine en 2012.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557–563.

Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., and Tanaka, H. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83–85.

Khakoo, A.Y., Pati, S., Anderson, S.A., Reid, W., Elshal, M.F., Rovira, I.I., Nguyen, A.T., Malide, D., Combs, C.A., Hall, G., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 203, 1235–1247.

Kim, M.S., Cho, W.H., Song, W.S., Lee, S.-Y., and Jeon, D.-G. (2007). time dependency of prognostic factors in patients with stage II osteosarcomas. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 463, 157–165.

Klopp, A.H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., and Marini, F. (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29, 11–19.

Knudsen, E.S., and Wang, J.Y. (1996). Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 271, 8313–8320.

Kosir, M.A. (2013). Breast Cancer - Gynecology and Obstetrics.

Kozak, L., and Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes (Lond)* 32, S32–S38.

Lamoureux, F., Baud'huin, M., Ory, B., Guiho, R., Zoubeidi, A., Gleave, M., Heymann, D., and Rédini, F. (2014). Clusterin inhibition using OGX-011 synergistically enhances zoledronic acid activity in osteosarcoma. *Oncotarget* 5, 7805–7819.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.

Levings, P.P., McGarry, S.V., Currie, T.P., Nickerson, D.M., McClellan, S., Ghivizzani, S.C., Steindler, D.A., and Gibbs, C.P. (2009). Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res.* 69, 5648–5655.

Lindström, P. (2007). The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob Mice]. *The Scientific World Journal* 7, 666–685.

- Lizunov, V.A., Stenkula, K., Troy, A., Cushman, S.W., and Zimmerberg, J. (2013). Insulin regulates Glut4 confinement in plasma membrane clusters in adipose cells. *PLoS ONE* 8, e57559.
- Longaker, M.T., Aston, S.J., Baker, D.C., and Rohrich, R.J. (2014). Fat transfer in 2014: what we do not know. *Plast. Reconstr. Surg.* 133, 1305–1307.
- Lu, F., Li, J., Gao, J., Ogawa, R., Ou, C., Yang, B., and Fu, B. (2009). Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 1437–1446.
- Lugli, A., Iezzi, G., Hostettler, I., Muraro, M.G., Mele, V., Tornillo, L., Carafa, V., Spagnoli, G., Terracciano, L., and Zlobec, I. (2010). Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 103, 382–390.
- Ma, I., and Allan, A.L. (2011). The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 7, 292–306.
- Makino, S. (1959). The role of tumor stem-cells in regrowth of the tumor following drastic applications. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 15(Suppl 1), 196–198.
- Man, T.-K., Lu, X.-Y., Jaeweon, K., Perlaky, L., Harris, C.P., Shah, S., Ladanyi, M., Gorlick, R., Lau, C.C., and Rao, P.H. (2004). Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma. *BMC Cancer* 4, 45.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.
- Mansell, J.P., Nowghani, M., Pabbruwe, M., Paterson, I.C., Smith, A.J., and Blom, A.W. (2011). Lysophosphatidic acid and calcitriol co-operate to promote human osteoblastogenesis: requirement of albumin-bound LPA. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 95, 45–52.
- Marie, P.J., Haÿ, E., Modrowski, D., Revollo, L., Mbalaviele, G., and Civitelli, R. (2014). Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton. *Calcif. Tissue Int.* 94, 46–54.
- Martin, P.J., Haren, N., Ghali, O., Clabaut, A., Chauveau, C., Hardouin, P., and Broux, O. (2015). Adipogenic RNAs are transferred in osteoblasts via bone marrow adipocytes-derived extracellular vesicles (EVs). *BMC Cell Biol.* 16, 10.
- McAllister, R.M., Gardner, M.B., Greene, A.E., Bradt, C., Nichols, W.W., and Landing, B.H. (1971). Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* 27, 397–402.
- Meulmeester, E., and Dijke, P. Ten (2011). The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J. Pathol.* 223, 205–218.
- Miki, J., Furusato, B., Li, H., Gu, Y., Takahashi, H., Egawa, S., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G., Srivastava, S., and Rhim, J.S. (2007). Identification of putative stem cell markers,

CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 67, 3153–3161.

Miki, S., Iwano, M., Miki, Y., Yamamoto, M., Tang, B., Yokokawa, K., Sonoda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.* 250, 607–610.

Miles, S.A., Rezai, A.R., Salazar-González, J.F., Vander Meyden, M., Stevens, R.H., Logan, D.M., Mitsuyasu, R.T., Taga, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990). AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4068–4072.

Miller, B.J., Cram, P., Lynch, C.F., and Buckwalter, J.A. (2013). Risk factors for metastatic disease at presentation with osteosarcoma: an analysis of the SEER database. *J Bone Joint Surg Am* 95, e89.

Moerman, E.J., Teng, K., Lipschitz, D.A., and Lecka-Czernik, B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell* 3, 379–389.

Mohr, A., Lyons, M., Deedigan, L., Harte, T., Shaw, G., Howard, L., Barry, F., O'Brien, T., and Zwacka, R. (2008). Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2628–2643.

Mojallal, A., and Foyatier, J.-L. (2004). [Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery]. *Ann Chir Plast Esthet* 49, 419–425.

Mojallal, A., Lequeux, C., Shipkov, C., Breton, P., Foyatier, J.-L., Braye, F., and Damour, O. (2009). Improvement of skin quality after fat grafting: clinical observation and an animal study. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 765–774.

Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R., and Zondag, G.C. (1997). Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 168–173.

Morak, M., Schmidinger, H., Riesenhuber, G., Rechberger, G.N., Kollroser, M., Haemmerle, G., Zechner, R., Kronenberg, F., and Hermetter, A. (2012). Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) and Hormone-Sensitive Lipase (HSL) Deficiencies Affect Expression of Lipolytic Activities in Mouse Adipose Tissues. *Mol Cell Proteomics* 11, 1777–1789.

Muehlberg, F.L., Song, Y.-H., Krohn, A., Pinilla, S.P., Droll, L.H., Leng, X., Seidensticker, M., Ricke, J., Altman, A.M., Devarajan, E., et al. (2009). Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 30, 589–597.

Odri, G., Kim, P.-P., Lamoureux, F., Charrier, C., Battaglia, S., Amiaud, J., Heymann, D., Gouin, F., and Redini, F. (2014). Zoledronic acid inhibits pulmonary metastasis dissemination in a preclinical model of Ewing's sarcoma via inhibition of cell migration. *BMC Cancer* 14, 169.

- Ohlsson, L.B., Varas, L., Kjellman, C., Edvardsen, K., and Lindvall, M. (2003). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp. Mol. Pathol.* *75*, 248–255.
- Ong, W.K., Tan, C.S., Chan, K.L., Goesantoso, G.G., Chan, X.H.D., Chan, E., Yin, J., Yeo, C.R., Khoo, C.M., So, J.B.Y., et al. (2014). Identification of Specific Cell-Surface Markers of Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Fat Depots. *Stem Cell Reports* *2*, 171–179.
- Ory, B., Heymann, M.-F., Kamijo, A., Gouin, F., Heymann, D., and Redini, F. (2005). Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* *104*, 2522–2529.
- Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin. Chim. Acta* *380*, 24–30.
- Pérez-Cano, R., Vranckx, J.J., Lasso, J.M., Calabrese, C., Merck, B., Milstein, A.M., Sassoon, E., Delay, E., and Weiler-Mithoff, E.M. (2012). Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial. *Eur J Surg Oncol* *38*, 382–389.
- Perrot, P., Rousseau, J., Bouffaut, A.-L., Rédini, F., Cassagnau, E., Deschaseaux, F., Heymann, M.-F., Heymann, D., Duteille, F., Trichet, V., et al. (2010). Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS ONE* *5*, e10999.
- Petit, J.Y., Botteri, E., Lohsiriwat, V., Rietjens, M., De Lorenzi, F., Garusi, C., Rossetto, F., Martella, S., Manconi, A., Bertolini, F., et al. (2012). Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann. Oncol.* *23*, 582–588.
- Petit, J.Y., Rietjens, M., Botteri, E., Rotmensz, N., Bertolini, F., Curigliano, G., Rey, P., Garusi, C., Lorenzi, F.D., Martella, S., et al. (2013). Evaluation of fat grafting safety in patients with intra epithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* *24*, 1479–1484.
- Picci, P., Manfrini, M., Fabbri, N., Gambarotti, M., and Vanel, D. (2014). Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions. The Rizzoli Case Archive.
- Pollock, R., Alcelik, I., Bhatia, C., Chuter, G., Lingutla, K., Budithi, C., and Krishna, M. (2008). Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J* *17*, 845–852.
- Poloni, A., Maurizi, G., Serrani, F., Mancini, S., Zingaretti, M.C., Frontini, A., Cinti, S., Olivieri, A., and Leoni, P. (2013). Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Exp. Hematol.* *41*, 558–566.e2.
- Qiao, L., Xu, Z.-L., Zhao, T.-J., Ye, L.-H., and Zhang, X.-D. (2008). Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* *269*, 67–77.

- Ramis-Conde, I., Chaplain, M.A.J., Anderson, A.R.A., and Drasdo, D. (2009). Multi-scale modelling of cancer cell intravasation: the role of cadherins in metastasis. *Phys Biol* 6, 016008.
- Rastegar, F., Gao, J.-L., Shenq, D., Luo, Q., Shi, Q., Kim, S.H., Jiang, W., Wagner, E.R., Huang, E., Gao, Y., et al. (2010). Lysophosphatidic acid acyltransferase β (LPAAT β) promotes the tumor growth of human osteosarcoma. *PLoS ONE* 5, e14182.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109, 1292–1298.
- Rhim, J.S., Park, D.K., Arnstein, P., Huebner, R.J., Weisburger, E.K., and Nelson-Rees, W.A. (1975). Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 256, 751–753.
- Ricquier, D. (2006). Fundamental mechanisms of thermogenesis. *Comptes Rendus Biologies* 329, 578–586.
- Rietjens, M., De Lorenzi, F., Rossetto, F., Brenelli, F., Manconi, A., Martella, S., Intra, M., Venturino, M., Lohsiriwat, V., Ahmed, Y., et al. (2011). Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 64, 477–483.
- Rodbell, M. (1964). METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J. Biol. Chem.* 239, 375–380.
- Roodhart, J.M.L., Daenen, L.G.M., Stigter, E.C.A., Prins, H.-J., Gerrits, J., Houthuijzen, J.M., Gerritsen, M.G., Schipper, H.S., Backer, M.J.G., van Amersfoort, M., et al. (2011). Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 20, 370–383.
- Rousseau, J., Escriou, V., Perrot, P., Picarda, G., Charrier, C., Scherman, D., Heymann, D., Rédini, F., and Trichet, V. (2010). Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther.* 17, 387–397.
- Rousseau, J., Escriou, V., Lamoureux, F., Brion, R., Chesneau, J., Battaglia, S., Amiaud, J., Scherman, D., Heymann, D., Rédini, F., et al. (2011). Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2452–2462.
- Rubio, R., Abarrategi, A., Garcia-Castro, J., Martinez-Cruzado, L., Suarez, C., Tornin, J., Santos, L., Astudillo, A., Colmenero, I., Mulero, F., et al. (2014). Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32, 1136–1148.
- Sackstein, R., Merzaban, J.S., Cain, D.W., Dagia, N.M., Spencer, J.A., Lin, C.P., and Wohlgemuth, R. (2008). Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 14, 181–187.

- Saulnier-Blache, J.S., Girard, A., Simon, M.-F., Lafontan, M., and Valet, P. (2000). A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J. Lipid Res.* *41*, 1947–1951.
- Saxena, N.K., Vertino, P.M., Anania, F.A., and Sharma, D. (2007). leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J. Biol. Chem.* *282*, 13316–13325.
- Scherer, P.E. (2006). Adipose Tissue From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes* *55*, 1537–1545.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 26746–26749.
- Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L.M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., et al. (2012). HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* *209*, 551–563.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* *138*, 822–829.
- Sheu, Y., and Cauley, J.A. (2011). The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism. *Curr Osteoporos Rep* *9*, 67–75.
- Shimizu, S., Hirano, T., Yoshioka, R., Sugai, S., Matsuda, T., Taga, T., Kishimoto, T., and Konda, S. (1988). Interleukin-6 (B-cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a Lennert's lymphoma-derived T-cell line (KT-3). *Blood* *72*, 1826–1828.
- Shimizu, T., Ishikawa, T., Iwai, S., Ueki, A., Sugihara, E., Onishi, N., Kuninaka, S., Miyamoto, T., Toyama, Y., Ijiri, H., et al. (2012). Fibroblast growth factor-2 is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.* *10*, 454–468.
- Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. (2010). Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int. J. Cancer* *127*, 2323–2333.
- Smit, M.A., Geiger, T.R., Song, J.-Y., Gitelman, I., and Peeper, D.S. (2009). A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3722–3737.
- Smorlesi, A., Frontini, A., Giordano, A., and Cinti, S. (2012). The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* *13*, 83–96.
- Somasundar, P., Frankenberry, K.A., Skinner, H., Vedula, G., McFadden, D.W., Riggs, D., Jackson, B., Vangilder, R., Hileman, S.M., and Vona-Davis, L.C. (2004). Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J. Surg. Res.* *118*, 71–82.

- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.
- Sterodimas, A., de Faria, J., Nicaretta, B., and Boriani, F. (2011). Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study. *Aesthet Surg J* 31, 682–693.
- Strem, B.M., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K., and Hedrick, M.H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54, 132–141.
- Studený, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J., and Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 62, 3603–3608.
- Studený, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B.N., Champlin, R.E., and Andreeff, M. (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1593–1603.
- Szade, K., Zukowska, M., Szade, A., Collet, G., Kloska, D., Kieda, C., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2015). Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo. *Tumour Biol.*
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- The University Of Edinburgh (2009). *Cells Of The Ever Young: Getting Closer To The Truth.*
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 740–746.
- Tirino, V., Desiderio, V., d'Aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., Galderisi, U., Cavaliere, C., De Rosa, A., Papaccio, G., et al. (2008). Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS ONE* 3, e3469.
- Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., Rocco, G., and Pirozzi, G. (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 36, 446–453.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. (2011). Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J.* 25, 2022–2030.

- Tréguer, K., Dusaulcy, R., Grès, S., Wanecq, E., Valet, P., and Saulnier-Blache, J.S. (2013). Influence of secreted factors from human adipose tissue on glucose utilization and proinflammatory reaction. *J. Physiol. Biochem.* *69*, 625–632.
- Trichet, V. (2015). Chapter 13 - Cancer stem cells in representative bone tumors: osteosarcoma, Ewing sarcoma and metastases from breast and prostate carcinomas. In *Bone Cancer (Second Edition)*, D. Heymann, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 139–148.
- Trojahn Kølle, S.-F., Oliveri, R.S., Glovinski, P.V., Elberg, J.J., Fischer-Nielsen, A., and Drzewiecki, K.T. (2012). Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg* *46*, 59–68.
- Trujillo, M.E., and Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* *27*, 762–778.
- Tsukamoto, S., Honoki, K., Fujii, H., Tohma, Y., Kido, A., Mori, T., Tsujiuchi, T., and Tanaka, Y. (2012). Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *Int. J. Oncol.* *40*, 163–169.
- Tu, B., Du, L., Fan, Q.-M., Tang, Z., and Tang, T.-T. (2012). STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Lett.* *325*, 80–88.
- Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 116–129.
- Valet, P., Pagès, C., Jeanneton, O., Daviaud, D., Barbe, P., Record, M., Saulnier-Blache, J.S., and Lafontan, M. (1998). Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J. Clin. Invest.* *101*, 1431–1438.
- Vlashi, E., Lagadec, C., Vergnes, L., Reue, K., Frohnen, P., Chan, M., Alhiyari, Y., Dratver, M.B., and Pajonk, F. (2014). Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res. Treat.* *146*, 525–534.
- Wang, L., Park, P., Zhang, H., La Marca, F., and Lin, C.-Y. (2011). Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int. J. Cancer* *128*, 294–303.
- Waterman, R.S., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2012). Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS ONE* *7*, e45590.
- Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., and Hunter, T. (1999). The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 19)*, 3361–3371.
- Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S.T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol.* *154*, 515–523.

- Wilson, H., Huelsmeyer, M., Chun, R., Young, K.M., Friedrichs, K., and Argyle, D.J. (2008). Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet. J.* 175, 69–75.
- Wu, S., Ju, G.-Q., Du, T., Zhu, Y.-J., and Liu, G.-H. (2013). Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 8, e61366.
- Xiao, W., Mohseny, A.B., Hogendoorn, P.C.W., and Cleton-Jansen, A.-M. (2013). Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin Sarcoma Res* 3, 10.
- Yan, Z., Hang, D., Guo, C., and Chen, Z. (2009). Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J. Orthop. Res.* 27, 442–446.
- Yee, C., Biondi, A., Wang, X.H., Iscove, N.N., de Sousa, J., Aarden, L.A., Wong, G.G., Clark, S.C., Messner, H.A., and Minden, M.D. (1989). A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood* 74, 798–804.
- Yoshida, A., Ushiku, T., Motoi, T., Shibata, T., Fukayama, M., and Tsuda, H. (2010). Well-differentiated liposarcoma with low-grade osteosarcomatous component: an underrecognized variant. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 1361–1366.
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., and Harii, K. (2007). Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *Aesth Plast Surg* 32, 48–55.
- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T., and Harii, K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32, 48–55; discussion 56–57.
- Young, P., Arch, J.R., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett.* 167, 10–14.
- Zeyda, M., and Stulnig, T.M. (2007). Adipose tissue macrophages. *Immunol. Lett.* 112, 61–67.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zheng, D.-N., Li, Q.-F., Lei, H., Zheng, S.-W., Xie, Y.-Z., Xu, Q.-H., Yun, X., and Pu, L.L.Q. (2008). Autologous fat grafting to the breast for cosmetic enhancement: experience in 66 patients with long-term follow up. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61, 792–798.
- Zhu, L., Cheng, X., Ding, Y., Shi, J., Jin, H., Wang, H., Wu, Y., Ye, J., Lu, Y., Wang, T.C., et al. (2014). Bone marrow-derived myofibroblasts promote colon tumorigenesis through the IL-6/JAK2/STAT3 pathway. *Cancer Lett.* 343, 80–89.

ANNEXES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique	GTA : Greffe de Tissu Adipeux
ADNc : ADN complémentaire	H&E : coloration Hématoxyline et Éosine
AG : Acide Gras	HES : coloration Hématoxyline, Éosine et Safran
ALDH : ALdéhyde DéHydrogénase	IL- : InterLeukine-
αMEM : Minimum Eagle Medium alpha	IP : Iodure de Propidium
ARN : Acide RiboNucléique	LPA : Acide LysoPhosphatidique
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	MC : Milieu Conditionné
BSA : Albumine Bovine Sérique	MO : Moelle Osseuse
CAL : <i>Cell-Assisted Lipotransfert</i>	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononucleated Cell</i>
CCL- : Ligand à motif Cys-Cys	PBS : <i>Phosphate-Buffered Solution</i>
CD- : Contingent (<i>Cluster</i>) de Différenciation	Rb : protéine du Rétinoblastome
cdc- : Cycle de Division Cellulaire	RLA : solution de Ringer supplémentée en Lactate et Adrénaline
CSC : Cellule Souche Cancéreuse	rpm : Rotations Par Minute
CSM : Cellule Souche Mésenchymateuse	RT-PCR : Réaction en Chaîne de la Polymérase en Temps Réel
CXCL- : Ligand à motif Cys-X-Cys	STAT : <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
CXCR- : Récepteur de CXCL-	SVF : Sérum de Veau Foetal
DAB : DiAMinoBenzidine	TA : Tissu Adipeux
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	TBS : <i>Tris-Buffered Solution</i>
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
dNTP : désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate	TGF-β : <i>Transforming Growth Factor β</i>
DO : Densité Optique	TRAP : Phosphatase Acide Résistante au Tartrate
EDTA : acide Éthylène Diamine Tétracétique	UCP-1 : <i>UnCoupled Protein 1</i>
ERK : <i>Extra-cellular Regulated Kinase</i>	
FAFA : <i>Fatty Acid-Free Albumin</i>	
FGF : <i>Fibroblast Growth Factor</i>	
FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine	
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase	

SÉQUENCES DES AMORCES ADN UTILISÉES EN RT-PCR

symbole	nom complet	amorce sens (5' - 3') amorce anti-sens (5' - 3')
<i>ACTB</i>	Actin beta	CCAACCGCGAGAAGATGA CCAGAGGCGTACAGGGATAG
<i>ALP</i>	Alkaline phosphatase	AACACCAACCAAGGGGAAAC GTAGCTGTAICTATCTTCATAGGC
<i>CD44</i>	Cluster of Differentiation 44	AGTTTTGGTGGCAGCAGCCT GCGGCCTCCGTCCGAGAGATG
<i>CDH1</i>	Cadherin 1	GGGCGAGTGCCAAGTGGACC CCAGCGGCCCTTCACAGTC
<i>COL1A1</i>	Collagen type I alpha 1	CTGGACCTAAAGGTGCTGCT GCTCCAGCCTCTCCATCTTT
<i>CXCL12</i>	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12 ; <i>SDF1</i> : Stromal-Derived Factor 1	CGATTCCTCGAAGCCATGT CACTGTCTGTTGTTGTTCTCAG
<i>DKK1</i>	Dickkopf 1 homolog	ATAGCACCTTGGATGGGTATCC CACAGTCTGATGACCGGAGA
<i>FABP4</i>	Fatty Acid Binding Protein 4	CCTTAAAAAATACTGAGATTCCTTCA GGACACCCCATCTAAGGTT
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG GGTGCAAGGAGGCAATTGCT
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase 1	TGACCTTGATTTATTTTGCA TACC CGAGCAAGACGTTTCAGTCTCT
<i>IBSP</i>	Integrin-Binding SialoProtein	CGAATACACGGGCGTCAATG GTAGCTGTAICTATCTTCATAGGC
<i>LPL</i>	LipoProtein Lipase	CAGGCCTTTGAGATTTCTCTG GAAGGAGTAGGCTTATTTGTGGAA
<i>MMP2</i>	Matrix MetalloPeptidase 2	ATAACCTGGATGCCGTCGT TCACGCTCTTCAGACTTTGG
<i>MMP13</i>	Matrix MetalloPeptidase 13	GTAGCTGTAICTATCTTCATAGGC GCCGGTGTAGGTGTAGATAGGA
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogene homolog	CACCAGCAGCGACTCTGA GATCCAGACTCTGACCTTTTGC
<i>NANOG</i>	Nanog Homeobox	ATGCCTCACACGGAGACTGT AAGTGGGTTGTTGCCTTTG
<i>OPG</i>	Osteoprotegerin ; <i>TNFRSF11B</i> : Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 11b	CAGCTCAAGAACAGACTTTCC TCGAAGGTGAGGTAGCATGTC
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1 ; <i>OCT4</i> : Octamer-binding transcription factor 4	CAATTTGCCAAGCTCCTGA AGATGGTCGTTTGGCTGAAT
<i>PPARG</i>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma	GACCTGAACTTCAAGATACCAAA TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC
<i>RANKL</i>	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B-Ligand ; <i>TNFSF11</i> : Tumor Necrosis Factor Superfamily 11	GTTGGCCGACAGCAAGAA CGCAGGTACTTGGTGTAGTCTCT
<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2 ; <i>CBFA1</i> : Core-Binding Factor Alpha 1	GTGCCTAGGCGCATTTCA GCTCTTCTACTGAGAGTGGAAGG
<i>SNAI1</i>	Snail family zinc finger 1	GACCCAGTGCCTCGACCACTA CAGCAGGTGGGCTGGTCTGTA
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC
<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	GTACCCGCACTTGACAAC TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC
<i>TWIST1</i>	Twist-related protein 1	GGCGTGGGGCGCACTTTTAA TGCAGAGGTGTGAGGATGGTGC
<i>TWIST2</i>	Twist-related protein 2	TCAGCTACGCTTCTCCGTGTG AGAAGGTCTGGCAATGGCAGCA
<i>VEGFA</i>	Vascular Endothelial Growth Factor A	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC CCACTTCGTGATGATTTCTGC
<i>VIM</i>	Vimentin	CTCCGGGAGAAATTGCAGGA CGTTCAAGGTCAAGACGTGC

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en RT-PCR

ARTICLE 1

Opposite effects of soluble factors secreted by adipose tissue on proliferating and quiescent osteosarcoma cells.

Pierre Avril^{1,2}, Franck Duteille, M.D.^{1,2,3}, Perrine Ridel, M.D.^{1,2,3}, Marie-Françoise Heymann, PhD.^{1,2,4}, Gonzague De Pinieux, M.D., Ph.D.^{1,2,5}, François Gouin, M.D., Ph.D.^{1,2,6}, Françoise Rédini, Ph.D.^{1,2}, Frédéric Blanchard, Ph.D.^{1,2}, Dominique Heymann, Ph.D.^{1,2}, Valérie Trichet, Ph.D.^{1,2}, Pierre Perrot, M.D., Ph.D.^{1,2,3}

1. INSERM, UMR 957, Equipe Labellisée LIGUE 2012, Nantes, F-44035 France
2. Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, F-44035 France
3. University Hospital, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, F-44093 France
4. University Hospital, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, F-44093 France
5. University Hospital, Service d'Anatomie Pathologique, Tours, F-37044 France
6. University Hospital, Clinique Chirurgicale Orthopédique et Traumatologique, Nantes, F-44093 France

Corresponding author:

Pierre PERROT, University Hospital, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, F-44093 France
Tel : (+33)2.40.08.73.02. Fax : (+33)2.40.08.73.04. E-mail : pierre.perrot@chu-nantes.fr

Running title: Oncological safety of adipose tissue transfer.

Abstract

BACKGROUND. Autologous adipose tissue transfer (ATT) may be performed for esthetic needs following resection of osteosarcoma, the most frequent primary malignant tumor of bone, excluding myeloma. The safety of ATT regarding the potential risk of cancer recurrence must be addressed.

METHODS. Adipose tissue (AT) injection was tested in a human osteosarcoma pre-clinical model induced by MNNG-HOS cells. Culture mediums without growth factors from fetal bovin serum were conditioned with AT samples and added to two osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS and MG-63) which were cultured in monolayer or maintained in non-adherent spheres, favouring proliferation or quiescent stage, respectively. Proliferation and cell cycle were analyzed.

RESULTS. AT injection increased local growth of osteosarcoma in mouse, but it was not associated with aggravation of lung metastasis or osteolysis. AT-derived soluble factors increased up to 180% the *in vitro* proliferation of osteosarcoma cells. Interleukine 6 and leptin were measured in higher concentrations in AT-conditioned medium than in osteosarcoma cell-conditioned medium, but our results indicated that they were not implicated alone. Furthermore, AT-derived soluble factors did not favor a G0-to-G1 phase transition of MNNG-HOS cells in non-adherent oncospheres.

CONCLUSION. This study indicates that AT soluble factors activate osteosarcoma cell cycle from G1 to mitosis phases, but do not promote the transition from quiescent G0 to G1 phases. ATT may not be involved in the activation of dormant tumor cells or cancer-stem-cells.

Keywords: adipose tissue transfer; plastic surgery; osteosarcoma; recurrence.

Introduction

Autologous adipose tissue transfer (ATT) is increasingly used in reconstructive surgery. Originally established to correct face defects¹, it is considered a safe procedure because the transplanted autologous adipose tissue is natural-appearing and not expanded in culture², but major disadvantages of this technique remains the unpredictable fat resorption rates and subsequent adverse events.^{3,4}

High-grade osteosarcoma is an aggressive primary bone malignant tumor whose treatment includes polychemotherapy courses combined with wide-margin and limb-sparing surgery. While a poor outcome is still predicted for osteosarcoma patients with lung metastasis at diagnosis or with relapsed disease (30% survival rate at 5 years), current treatments lead to 50-70% survival rate at 5 years for the non metastatic form.^{5, 6}

A complete remission of osteosarcoma is predicted after 10 years of event-free survival as late recurrence occurs for less than 1% of patients.^{7,8} For the past two decades, more young patients are surviving from osteosarcoma. For these young patients with a good outcome, the challenge is to ameliorate their quality of life as they suffer from physical and aesthetic defects due to the tumor resection.

In 2010, we have reported a clinical case of osteosarcoma recurrence following ATT,⁹ and this highly unexpected clinical recurrence has stimulated

discussions towards the safety of ATT.10-15 For osteosarcoma, like for any other rare tumor, the safety of ATT will not be addressed by a retrospective clinical study, but can only be tested through preclinical and in vitro studies. First we have shown that human Saos-2-induced osteosarcoma grew faster in nude mice following a single human adipose tissue (AT) injection.⁹ Such osteosarcoma growth acceleration following an ATT in an experimental model led us to consider the possible relation between autologous AT injection and the local recurrence. Indeed we have hypothesized that ATT may activate some quiescent osteosarcoma cells originating from the first disease. In the present report, the enhancing effect of human ATT on tumor growth was confirmed in another human osteosarcoma pre-clinical model induced by MNNG-HOS cell-injection. Moreover we showed that soluble factors derived from human AT samples increased osteosarcoma cell proliferation in vitro similarly to fetal bovine serum (FBS). However those AT soluble factors did not change the quiescent state of osteosarcoma cells when they formed non-adherent oncospheres. Among these soluble factors secreted by AT, the potential implication of Interleukine-6 (IL-6) or leptin was tested and functional experiments demonstrated that they are not implicated alone on osteosarcoma cell proliferation. This study indicates that AT soluble factors which remain unidentified, activate osteosarcoma cell cycle from G1 to mitosis phases, but do not promote the transition from quiescent G0 to G1 phases. ATT may be not involved in the activation of dormant tumor cells or cancer-stem-cells as previously proposed in regards to the reported osteosarcoma recurrence clinical case.

Materials and Methods

Ethics statement

Surplus of human adipose tissue (AT) was obtained from patients in the course of an aesthetic abdominal liposuction in our plastic surgery department. The donors had no significant medical history. Informed consent of patients for the use of tissue sample for anonymized unlinked research was validated by « Comité de Protection des Personnes des Pays de la Loire » and by « Ministère de la Recherche » in 2008 (reference 2008-402) with declaration to the « Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés ». Experiments involving animals were conducted following the French guidelines ("Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale" of the French ethical committee) and have been approved by the regional committee on animal ethics (CEEA.PdL.06, authorization number 2013.4).

Cell lines and culture conditions:

Osteosarcoma cell lines. MNNG-HOS and MG-63 cells were initially derived from human osteosarcomas and were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC numbers CRL-1547 and CRL-1427

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, Dominique Dutscher, France), at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). For culture under the anchorage-independent condition, medium was supplemented with 1.25% of methylcellulose (R&D Systems, France) and 1% FBS.

Osteosarcoma model

Tumor induction. Four-week-old female athymic mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France). Osteosarcoma was induced by injection of 2x10⁶ MNNG-HOS cells into the tibial anterior muscle of anesthetized mice. Intra-tumor injections of AT sample or Phosphate Buffered Saline (PBS) solution were performed using 18-gauge needles. The tumor volume was calculated with the formula (l²xL)/2 where l and L represent respectively the smallest and the largest diameter.

Histology analysis. Frozen sections were fixed with 10% PFA, rinsed in distilled water, washed in 60% isopropanol and finally stained with Oil Red O solution (3 g/L). Sections of tumors embedded in paraffin were incubated with a mouse monoclonal antibody directed against human Ki-67 protein (Dako, France), with a biotinylated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Dako) and finally with Streptavidin/HRP (horse radish peroxydase, Dako) complexes which were revealed by a short incubation with 3,3'- Diaminobenzidine (DAB, Dako). Nuclei were counterstained with a Gill-Haematoxylin solution. The proportion of Ki67-positive cells was calculated using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) from counting >15000 nuclei in 6 tumor sections from each treated group.

AT conditioned media (AT-CM)

AT samples were collected using a 12-gauge, 12-hole cannula (Khoury Harvester) after infiltration with 0.1% epinephrine lactated Ringer's solution. Samples were filtrated and washed with lactated Ringer through a Puregraft 250 System (Cytori Therapeutics, San Diego, CA, USA). They were placed in cell culture inserts (pore size 3 μm, BD Biosciences, France) with MEM alpha with nucleosides and 1 g/L D-Glucose (Gibco® MEM α; Life technologies) under serum-free conditions. After 24 hours, inserts with AT were removed and AT-CM was collected and frozen at minus 20°C.

Mitochondrial activity:

The mitochondrial activity was determined by a colorimetric assay using 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1; Roche Molecular Biochemicals, France). Three thousand cells per well were seeded into 96-well plates, medium was supplemented with FBS or AT-CM, and after the appropriate culture period, WST-1 reagent was added to

each well and incubated at 37°C for 2 or 3 hours for MNNG-HOS and MG-63 cells, respectively. Absorbance was then read at 490 nm. The mean OD value (<0.2) measured for medium supplemented with FBS or AT-CM without cells was subtracted from the *OD values measured in the presence of cells*.

Cell Cycle Analysis:

Cells were treated fixed in 70% ethanol for 30 min at 4°C. Washed cell pellets were next probed to DNA staining with Phospho-Citrate (PC) buffer (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M citrate pH 7.5) for 30 min at 4°C. Cells were treated with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase-free RNase A (Qiagen; France) for 30 min at 37°C. FITC-coupled mouse anti-human Ki-67 antibody or irrelevant isotype antibody for control (BD Pharmingen, France) was added for 25 min at 4°C. DNA was stained with propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma Aldrich, France) for 20 min at 4°C. Each step was followed by a 3 min centrifugation at 2500 rpm. Cell cycle distribution was studied by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter; France) and 20000 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).

Statistical analysis

Microsoft Excel software (Redmond, WA, USA) was used. *In vivo* experimentation results were analyzed with the unpaired nonparametric method and Dunn's multiple comparisons following the Kruskal-Wallis test. *In vitro* experimentation results were analyzed following the Student's *t* test. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

AT injection accelerates local growth of MNNG-HOS osteosarcoma without aggravation of osteolytic and metastatic lesions.

The potential effect of a single AT injection was tested on osteosarcoma growth induced by MNNG-HOS cell injection in-nude mice. When tumors reached approximately 70 mm^3 in all mice, a group of mice (named MNNG-HOS + AT; $n=8$) received 100 μL of human AT, while two control groups were formed, one (named MNNG-HOS + PBS; $n=8$) received 100 μL of 1X PBS and the other one (named MNNG-HOS; $n=8$) remained untreated. PBS injection did not change the tumor progression (MNNG-HOS + PBS versus MNNG-HOS; Figure 1A), in contrast to AT injection in MNNG-HOS tumors which induced a significant increase in tumor volume between 20-30 days after injection (corresponding to 28-38 days post tumor-induction; MNNG-HOS + AT versus MNNG-HOS). AT samples gave rise to tissue masses of 100 mm^3 maximum when they were injected alone in naïve mice.

Oil Red O staining confirmed the presence of large adipocytes only in AT-treated tumor sections and not in PBS-treated tumor sections (Figure 1B). Such potential human adipocytes identified as large red cells were present in such small quantities to explain the size increase of AT-treated tumors. Histology analysis showed that MNNG-HOS cells have induced undifferentiated sarcoma and that PBS- and AT-treated tumors remained undifferentiated. Detection of proliferating cells by Ki-67 immunohistochemistry was performed within tumor samples at days 10 and 47 after AT injection (corresponding to days 18 and 55 after tumor induction). A similar proportion of cells in division (37% to 46%) was observed within osteosarcoma samples injected with AT or PBS (Figure 1C). At day 10 after AT injection, we did not observe a significantly higher proportion of proliferating cells near adipocytes than far from them (44.6% +/- 14.6 versus 37.1% +/- 8.9). At a late time point after AT injection (day 47 corresponding to day 55 after tumor induction), pyknotic nuclei and necrotic tissue were observed around the large adipocytes, while a high proportion of proliferating cells were still detected in other parts of the tumors.

In this preclinical model, AT injection exacerbated neither the tumor-induced bone-remodelling (Figure 1D) nor the metastasis process (2 to 4 tumor nodules per mouse lung) despite inducing a greater tumor growth at the primary tumor induction site. These results support the notion that ATT may have an early effect on osteosarcoma growth, however this ATT effect may be transient without aggravating the phenotype of tumor cells.

Soluble factors from adipose tissue accelerate the proliferation of osteosarcoma cells *in vitro*, but do not change their quiescent state in oncospheres.

Given the observation that osteosarcoma grew faster with ATT but ended up without a major change in their biological features in mouse models, we hypothesized that the overgrowth of the tumor is due to early paracrine interaction through secreted factors from AT. Culture medium without growth factors from FBS were conditioned with AT samples (figure 2A and B) and next added to cells in culture after an overnight starving (0% FBS). An increase of cell number with constant cell death proportion assessed by trypan blue counting, combined with an increase in the mitochondrial activity measured by WST-1 assay was obtained for two osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS and MG-63). As shown in Figure 2C, media which was enriched with soluble factors from AT promoted a significant increase in the cell proliferation in comparison with medium without FBS. This proliferative effect of AT-CM on MNNG-HOS cells was higher than that observed with 10% FBS (>150% versus 130%), while AT-CM and 10% FBS had similar proliferative effects (170% versus 180%) on MG-63 cells.

Investigations on 29 cytokines and growth factors (supplemental figure 1A), showed only IL-6 and leptin concentrations were greater in AT-CM than in medium conditioned by MNNG-HOS cells (60-fold and >2000-fold,

respectively). Given that leptin and IL-6 were once shown to increase the proliferation of Saos-2 osteosarcoma cells, we wondered whether they may cause the pro-proliferative effect of AT-CM on MNNG-HOS and MG-63 cells. As expected for IL-6 and leptin signal transduction, the STAT pathway was activated by adding AT-CM or human recombinant leptin (supplemental figure 1B). However the AT-induced pro-proliferative activity was not recovered by adding recombinant human leptin and was not inhibited by blocking receptor of IL-6-family cytokines as previously described (supplemental figure 1C). These results indicated that IL-6 and leptin are not implicated alone.

However, regarding the clinical case of the osteosarcoma recurrence following ATT, AT-derived soluble factors may not increase proliferation of tumor cells but they could be more likely implicated in the activation of quiescent/dormant tumor cells. We compared the effect of AT-derived soluble factors on proliferating or quiescent osteosarcoma cells *in vitro*, by cultivating cells either on plastic dishes or in oncospheres under anchorage-independent growth condition, respectively. As expected from cell counting or mitochondrial activity assay results which were described above on proliferating cells, cell cycle analysis revealed that AT-derived soluble factors decreased the proportion of cells in G₁ phase, while they increased the proportion of cells in the S/G₂/M phases similarly to growth factors of FBS, compared with 0% FBS medium (Figure 3A). In contrast FBS or AT factors did not increase the proportion of cells in the S/G₂/M phases when osteosarcoma cells were cultured in oncospheres (figure 3B). Ki-67 staining was used to distinguish the non-dividing cells corresponding to cells in G₀ cell cycle phase. In proliferating culture condition, a low proportion (4%) of cells in G₀ phase were observed after 24h in 0% FBS. Addition of 10% FBS did not change the G₀ cell proportion, while the addition of 25% AT-CM slightly decreased the proportion of cells in G₀ (4% to 2.5%). However in oncospheres, for which a high proportion (30.5%) of G₀ cells were detected with 0% FBS, the addition of FBS enabled part of G₀ cells to enter G₁ phase (19.5% and 67.8% respectively), whereas 25% of AT-CM did not initiate a G₀-to-G₁ phase transition. In contrast we observed an increase of G₀ cell proportion with AT-CM compared to 0% FBS (38.3% versus 30.5%).

These results indicate that AT-derived soluble factors that remain undetermined may accelerate cell cycle of proliferating osteosarcoma cells, but may not change the quiescent state of dormant tumor cells.

Discussion

Considering a rare and unexpected case of osteosarcoma recurrence in a patient who was in remission for 10 years and had undergone ATT for esthetic improvement, we addressed concerns on the effects of ATT on proliferating and quiescent osteosarcoma cells.

Our results confirm that AT injections enabled a local increase of osteosarcoma growth, as previously observed for the xenograft Saos-2 model.⁹ However AT injections were not associated with an aggravation of lung metastasis or osteolysis. AT-derived soluble and secreted factors increased the *in vitro* proliferation of two different osteosarcoma cell lines (MMG-HOS and MG-63) up to 180%. However these experiments were performed on proliferating tumor cells that may be absent in patients who received ATT for esthetic improvement following a cancer-free period. To clarify whether ATT may contribute to osteosarcoma recurrence, the AT effects on non-proliferating osteosarcoma cells were tested. Non-oncosphere culture was used to induce a quiescent stage in 30% of MNNG-HOS cells, while only 4% of MNNG-HOS cells were in G₀ stage in adherent culture condition. We observed that AT-derived soluble factors did not favor a G₀-to-G₁ phase transition of MNNG-HOS cells in non-adherent oncospheres, in contrast to FBS.

Besides the modulating effects on dividing osteosarcoma cells, the AT effects on cancer stem cells (CSCs) must be considered because CSCs are chemotherapy-resistant. For patients with a good response to chemotherapy the theory that CSCs remain present after treatment may explain cancer recurrence in bone sarcoma¹⁶⁻²¹. Moreover, oncosphere culture using an anchorage-free condition with serum privation has been used to isolate CSCs from osteosarcoma biopsies²² or to induce a CSC-like phenotype to osteosarcoma cell lines.¹⁸ Modulation of the microenvironment induced by the ATT may re-activate cell cycle progression in CSCs. Unfortunately, only a few *in vivo* models of CSCs have been reported for osteosarcoma and their use is limited.²³

Our results demonstrated a boosting effect of AT-derived soluble factors only on proliferating osteosarcoma cells, whereas they were unable to change the quiescent stage of those immortalized tumor cells in nonadherent oncospheres. These opposite effects of AT on proliferating or quiescent cells may explain the different results that were observed between *in vitro* and preclinical studies and retrospective clinical studies which investigated the safety of ATT after breast cancers. Indeed several *in vitro* and preclinical studies have shown that AT-derived stem cells and cancer-associated adipocytes contribute to breast carcinoma progression.^{17,24,25} In contrast, two large retrospective clinical studies, including 646 and 321 patients demonstrated that lipofilling (ATT) was not associated with a higher risk of recurrence.^{13,26} As discussed by Pearl et al.,¹⁵ the results from studies using immortalized tumor cells do not reflect the clinical context where reconstructive surgery is not considered in case of growing and therapy-unresponsive tumors. Donnenberg et al. suggested that AT-derived stem cells may have non-contributory effects on local recurrence, until an effect on dormant to active tumorigenic transition is demonstrated.²⁷

Beside the large retrospective clinical studies which are reassuring, there is still an ongoing debate on the

oncological safety of ATT for breast cancer patients for who a high level of inherent recurrence risk is observed. Three clinical cases of breast cancer recurrence after ATT procedure have been reported to date²⁸⁻³¹ and Petit et al. also showed that a subgroup of young breast-cancer patients with high tumor grade have a potentially higher risk of local recurrence.³²

In vitro and *in vivo* murine studies showing that ATT promotes osteosarcoma proliferation cannot directly be translated to the clinical setting. In order to answer the safety question of ATT after cancer, randomized controlled trials with a longer follow-up are required. As no suitable cohort of osteosarcoma patients can be constituted to answer this question, the development of a mouse model of quiescent osteosarcoma would be of major interest since it would permit the better understanding of the survival and activation of CSCs and the rare cases of late relapse of osteosarcoma.

Grant Support

This work was supported by INSERM, the “Ligue Contre le Cancer” (Equipe Labellisée LIGUE 2012). P.A. was a recipient of 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”. P.R. was a recipient of the “Institut national du Cancer” (InCA).

Conflict of interest statement

The authors state that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank Hamery G. and Allain Y. from the Experimental Therapy Unit platform of the Faculty of Medicine (Nantes, France) for their technical assistance. We thank Battaglia S., Brion R., Charrier C. and Amiaud J. for their kind technical assistances.

References

1. Coleman, S. R. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 1995;19:421-425.
2. Gir, P., Brown, S. A., Oni, G., Kashefi, N., Mojallal, A., Rohrich, R. J. Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast Reconstr Surg* 2012;130:249-258.
3. Geissler, P. J., Davis, K., Roostaeian, J., Unger, J., Huang, J., Rohrich, R. J. Improving fat transfer viability: the role of aging, body mass index, and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:227-232.
4. Longaker, M. T., Aston, S. J., Baker, D. C., Rohrich, R. J. Fat transfer in 2014: what we do not know. *Plast Reconstr Surg* 2014;133:1305-1307.
5. Bacci, G., Forni, C., Longhi, A., et al. Local recurrence and local control of non-metastatic osteosarcoma of the extremities: a 27-year experience in a single institution. *J Surg Oncol* 2007;96:118-123.
6. Marina, N., Gebhardt, M., Teot, L., Gorlick, R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 2004;9:422-441.
7. Ferrari, S., Bacci, G., Picci, P., 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* 1997;8:765-771.
8. Bielack, S. S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., 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* 2002;20:776-790.
9. Perrot, P., Rousseau, J., Bouffaut, A. L., et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One* 2010;5:e10999.
10. Eterno, V., Zambelli, A., Pavesi, L., et al. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget* 2014;5:613-633.
11. Lohsiriwat, V., Curigliano, G., Rietjens, M., Goldhirsch, A., Petit, J. Y. Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: "silencing" or "fueling" cancer recurrence? *Breast* 2011;20:351-357.
12. Petit, J. Y., Rietjens, M., Botteri, E., et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intraepithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* 2013;24:1479-1484.
13. Petit, J. Y., Botteri, E., Lohsiriwat, V., et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012;23:582-588.
14. Brenelli, F., Rietjens, M., De Lorenzi, F., et al. Oncological safety of autologous fat grafting after breast conservative treatment: a prospective evaluation. *Breast J* 2014;20:159-165.
15. Pearl, R. A., Leedham, S. J., Pacifico, M. D. The safety of autologous fat transfer in breast cancer: lessons from stem cell biology. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2012;65:283-288.
16. Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:2022-2030.
17. Wang, Y. Y., Lehuède, C., Laurent, V., et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett* 2012;324:142-151.
18. Wilson, H., Huelsmeyer, M., Chun, R., Young, K. M., Friedrichs, K., Argyle, D. J. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Veterinary journal* 2008;175:69-75.
19. Murase, M., Kano, M., Tsukahara, T., et al. Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *Br J Cancer* 2009;101:1425-1432.

20. Wang, L., Park, P., Zhang, H., La Marca, F., Lin, C. Y. Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer* 2011;128:294-303.

21. Saini, V., Hose, C. D., Monks, A., et al. Identification of CBX3 and ABCA5 as putative biomarkers for tumor stem cells in osteosarcoma. *PLoS One* 2012;7:e41401.

22. Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 2005;7:967-976.

23. Basu-Roy, U., Basilico, C., Mansukhani, A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett* 2012.

24. Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 2011;71:2455-2465.

25. Kuhbier, J. W., Bucan, V., Reimers, K., et al. Observed changes in the morphology and phenotype of breast cancer cells in direct co-culture with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:414-423.

26. Petit, J. Y., Lohsiriwat, V., Clough, K. B., et al. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study--Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:341-346.

27. Donnenberg, V. S., Zimmerlin, L., Rubin, J. P., Donnenberg, A. D. Regenerative therapy after cancer: what are the risks? *Tissue engineering Part B, Reviews* 2010;16:567-575.

28. Chaput, B., Foucras, L., Le Guellec, S., Grolleau, J. L., Garrido, I. Recurrence of an invasive ductal breast carcinoma 4 months after autologous fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 2013;131:123e-124e.

29. Chaput, B., Grolleau, J. L., Bertheuil, N., Ebudery, H., Chavoïn, J. P., Garrido, I. Another suspected case of breast cancer recurrence after lipofilling? Remain cautious. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014.

30. Smit, J. M., Tielemans, H. J., de Vries, B., Tuinder, S. M. Recurrence of invasive ductal breast carcinoma 10 months after autologous fat grafting. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67:e127-128.

31. Alharbi, M., Garrido, I., Vaysse, C., Chavoïn, J. P., Grolleau, J. L., Chaput, B. Latissimus dorsi flap invasion by ductal breast carcinoma after lipofilling. *Plastic and reconstructive surgery Global open* 2013;1:e68.

32. Petit, J. Y., Rietjens, M., Botteri, E., et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intra epithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol* 2013;24:1479-1484.

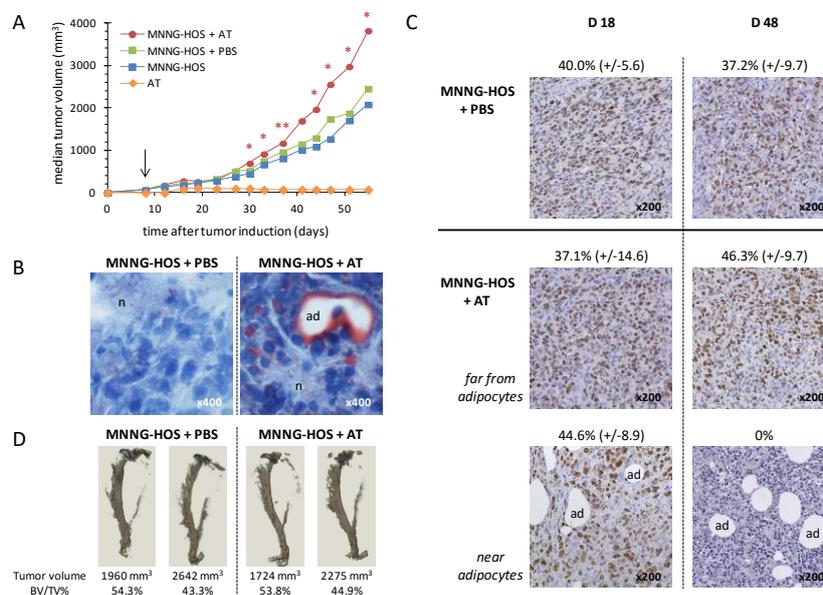


Figure 1: AT injection in MNNG-HOS osteosarcoma in athymic mouse.

(A) Evolution of median tumor volume for each group of MNNG-HOS-induced osteosarcomas ($n=8$). The group MNNG-HOS was not treated and the groups MNNG-HOS+PBS and MNNG-HOS+AT were injected at day 10 post-induction with PBS or AT, respectively (arrow). Significant differences are shown between MNNG-HOS and MNNG-HOS+AT groups (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$). Results are representative of 3 different donors. **(B)** Observation of lipids in MNNG-HOS tumor sections. Oil Red O staining identified small red lipid droplets in necrotic areas (n) and large ones between some tumor cells which were located in the vicinity of adipocytes (ad). Original magnifications are indicated. **(C)** Detection of proliferating cells in MNNG-HOS tumor sections. At day 20 post-tumor induction, human Ki-67 stained by immunohistochemistry revealed mitosis in both MNNG-HOS + PBS and MNNG-HOS + AT groups. In the MNNG-HOS + AT group, 2 areas were distinguished: one "far from adipocytes" (middle panel) and one "near adipocytes" (bottom panel) with tumor cells in the vicinity of adipocytes (ad). Percentages indicate the rate of human Ki-67-stained nuclei based on 6 representative regions for each described areas. Original magnifications are indicated. **(D)** Micro-computed tomography of tibias adjacent to tumors. Two representative tibias are presented for the PBS and AT treated groups. Specific bone volumes (bone/total volume BV/TV %) at day 48 are indicated.

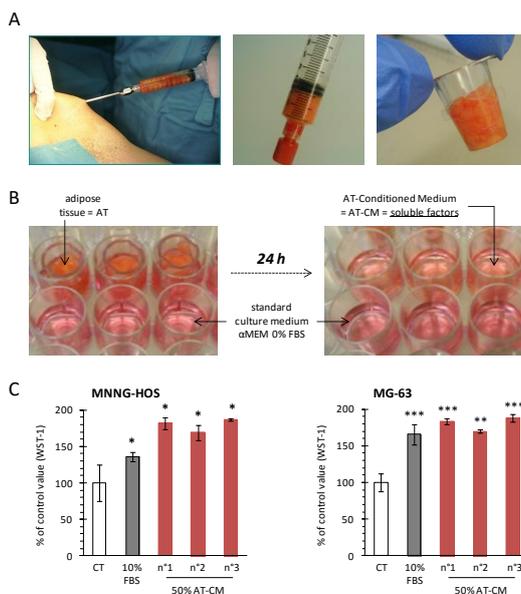


Figure 2: AT secreted factors increase osteosarcoma cell proliferation.

(A) Photographs of an AT sample from a patient and an AT deposit in a cell culture insert. (B) Photographs of AT conditioned medium (AT-CM) harvest. AT samples were placed in cell culture inserts (pore size 3 μm) with MEM alpha under serum-free conditions (0% FBS) for 24 hours, before AT-CM harvest. (C) Mitochondrial activity of MNNG-HOS and MG-63 cells. Control medium without FBS was supplemented with 10% of FBS or with AT-CM from 3 different donors (1 to 3) representing 50% of the total volume (50% AT-CM). Results are representative of 20 different donors. Means of three wells are presented as percentages of control corresponding to medium with 0% FBS. Error bars represent standard deviations. All the conditions were significantly different from 0% FBS (*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.005).

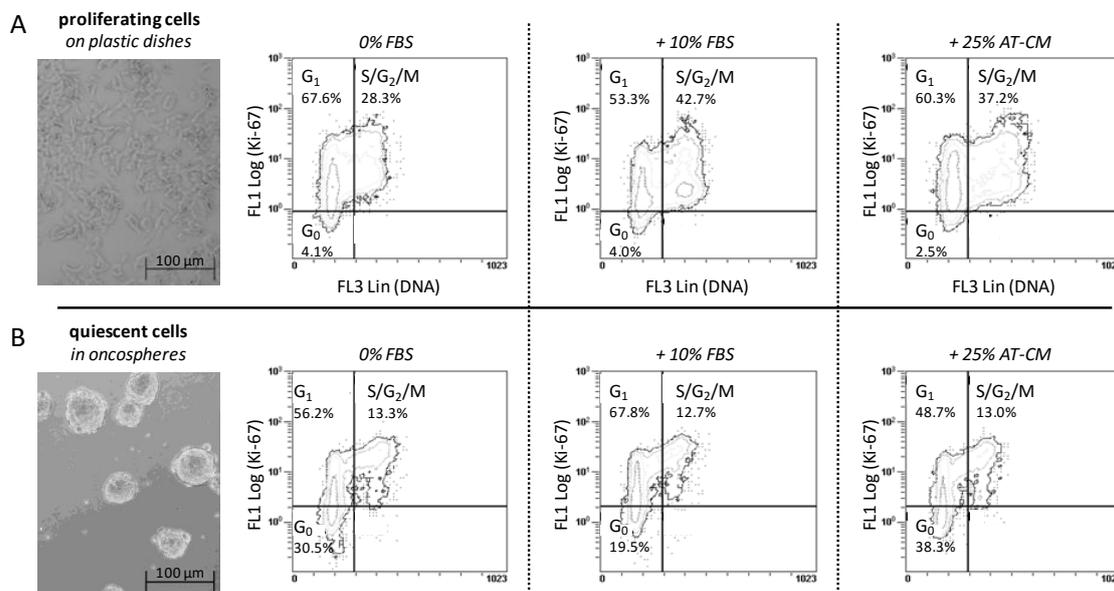
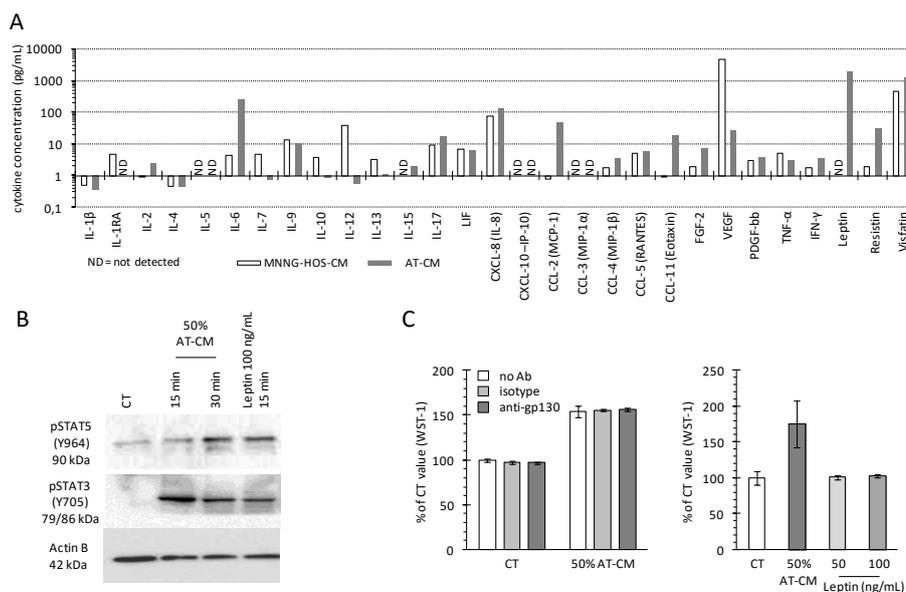


Figure 3: AT soluble factors modulate cell cycle of proliferating MNNG-HOS cells, but not the quiescent state of MNNG-HOS cells in oncospheres.

After 12 hours in control medium without FBS, proliferating MNNG-HOS cells on plastic dishes were incubated for 24 hours in medium not supplemented (0% FBS) or supplemented with 10 % FBS or 25%AT-CM. MNNG-HOS cells cultured in oncosphere were incubated for 48 hours in medium not supplemented (0% FBS) or supplemented with 10% FBS (10%) or 25%AT-CM. Cells were analyzed by flow cytometry after DNA and Ki-67 staining (respectively by propidium iodide and a specific FITC-coupled antibody). Dot plots represent MNNG-HOS cell repartition in cell cycle phases following DNA and Ki-67 detection. Because only 2-3% of cells were identified in subG₀ phase, only the proportion of cells in G₀, G₁, and S/G₂/M phases are indicated. Results are representative of 4 independent experiments.



Supplemental figure 1: AT secreted factors increase osteosarcoma cell proliferation.

(A). Representative quantification of different cytokines and growth factors. Quantification of 29 cytokines and growth factors was performed in AT-CM using the Luminex technology (Bio-Plex Pro Assays, Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions. 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 in medium conditioned by MNNG-HOS cells or AT (MNNG-HOS-CM and AT-CM). ND: not detected. **(B)** Western blot. Whole-cell protein extracts were obtained and analyzed as previously described. Primary antibodies to phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling Technologies; Beverly, MA, USA), phospho-STAT5 (Tyr694) (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) or β -actin (Sigma Aldrich) were tested. **(C)** Mitochondrial activity of MNNG-HOS. After an overnight starving (0% FBS), control medium (0% FBS) was supplemented with AT-CM (50% of the total volume) and combined with gp130-antibody (anti-gp130) or relevant IgG (isotype) as controls or not combined with antibody (no Ab). Recombinant human leptin was added to control medium (0% FBS) to indicated concentrations and was compared to 50% AT-CM. Results are means of 3 wells and are presented as percentage of control (CT) with SD. MNNG-HOS proliferation was not increased by the addition of recombinant human leptin, although this recombinant leptin, like the AT-CM, enabled the activation of the STAT pathway in MNNG-HOS cells. IL-6 signaling was inhibited with an antibody directed against the gp130 subunit of the IL-6-family receptors as previously described. The neutralizing antibody targeting gp130 did not prevent osteosarcoma cell proliferation induced by AT-CM. These results indicate that AT produce soluble mediators that activate osteosarcoma cell proliferation but that leptin, IL-6 and other IL-6-family cytokines are not implicated alone.

ARTICLE 2

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

Pierre Avril^{1,2}, Louis-Romée Le Nail^{1,2,3}, Meadhbh Á Brennan^{1,2}, Philippe Rosset^{1,2,3}, Gonzague De Pinieux^{1,2,5}, Pierre Layrolle^{1,2}, Dominique Heymann^{1,2}, Pierre Perrot^{1,2,4}, Valérie Trichet^{1,2}

1. INSERM, UMR 957, Equipe Labellisée LIGUE 2012, Nantes, F-44035 France

2. 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

3. University Hospital, Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, Tours, F-37044 France

4. University Hospital, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, F-44093 France

5. University Hospital, Service d'Anatomie Pathologique, Tours, F-37044 France

Corresponding author:

Valérie TRICHET, University of Nantes, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44093 France.

Tel : (+33)2.40.41.29.93. Fax : (+33)2.40.41.28.60. E-mail : valerie.trichet@univ-nantes.fr

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 folds 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.

Keywords : mesenchymal stem cell, osteosarcoma, adipose tissue transfer, cell cycle, quiescence

1. Introduction

High-grade osteosarcoma is an aggressive primary malignant bone tumor that is associated with a relatively good outcome since polychemotherapy courses have been introduced (50-70% survival rate at 5 years for the non metastatic form at diagnosis [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 allograft is mainly used [4]. Otherwise, different conservative techniques are described: massive autograft [5], vascularized autograft sometimes associated with allograft or isolated allograft [6-8].

A complete remission from osteosarcoma is predicted 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 due to 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 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 [10, 12]. Moreover, the use of MSCs cultured from bone marrow to supplement 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 alternate 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 as shown in recent studies [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, we started to investigate the interactions between osteosarcoma and adipose tissue by using pre-clinical experiments [30]. 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 the 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 n° 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.PdL.06, with project authorization number 2013.4.

2.2. Cell lines and culture conditions

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].

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].

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.

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

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.

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 μ m-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 μ g/mL Salmon sperm DNA, for 19 hours at 56°C. Finally, the *Alu* probe was detected by peroxidase-based immunohistochemical 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).

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 MNNG-HOS cells. The animals were placed individually in an induction chamber, and anaesthesia was induced with 3% *isoflurane in oxygene*. Then, mice were intra-peritoneally injected with 3 mg D-Luciferin (Interchim, Montluçon, France) in 250 μ l 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.

Micro-computed tomography (μ CT). 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 μ m, 50 kV, 0.5 mm Al filter, for 15 minutes. 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 hours 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 μ g/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 20000 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 figure 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 μ g 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.

2.7. 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 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 (Fig. 1c). 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 Figure 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 (Fig. 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 aggravation of the 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).

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. Interleukine-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, 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 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 G₀ cell cycle phase in oncospheres. However, FBS complementation enabled part of G₀ cells to enter G₁ phase (2-fold decrease of G₀ cells). In contrast ADSC- or MSC-CM did not decrease the proportion of cells in G₀. 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. Presently, 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 (MMNG-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 [Avril PRS 2015]. 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/MS-C conditioned medium but in concentrations similar to MMNG-HOS/Saos-2 cell-conditioned medium. In samples of MNNG-HOS-induced tumors which have otherwise 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, the 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 of 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 can favor tumor progression such as metalloproteinase 11 and collagen VI whose implication was described for the breast cancer-adipocyte interaction [53] and lysophosphatidic acids implicated in bone metastases [54]. All these factors may be implicated, not solely, but likely 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 its microenvironment which includes 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 metastasis potential of osteosarcoma cells. 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 (M-CSF 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]. Beyond speculation, the reasons for the discrepant actions of MSCs on tumor growth are under investigation and 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-MSC injection; however MSC intra-venous injection induced a faster development of pulmonary metastasis. More than 20 years ago, Hernigou *et al.* supplemented bone allograft with autologous bone marrow from the iliac crest and then started to use nucleated cells concentrated from bone marrow aspirate. By implanting autologous concentrated bone marrow cells including MSCs in 1,873 patients not bearing sarcoma, they did not observe more neoplastic events than the 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 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.

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.

Grant Support

This work was supported by INSERM, the “Ligue Contre le Cancer” (Equipe Labellisée LIGUE 2012), 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”.

References

- [1] Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*. 9 (2004) 422-41.
- [2] Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis*. 2 (2007) 6.
- [3] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer treatment reviews*. 40 (2014) 523-32.
- [4] Donati D, Colangeli M, Colangeli S, Di Bella C, Mercuri M. Allograft-prosthetic composite in the proximal tibia after bone tumor resection. *Clinical orthopaedics and related research*. 466 (2008) 459-65.
- [5] Hernigou P, Delepine G, Goutallier D, Julieron A. Massive allografts sterilised by irradiation. Clinical results. *J Bone Joint Surg Br*. 75 (1993) 904-13.
- [6] Bus MP, Dijkstra PD, van de Sande MA, Taminiau AH, Schreuder HW, Jutte PC, et al. Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study. *J Bone Joint Surg Am*. 96 (2014) e26.
- [7] Hilven PH, Bayliss L, Cosker T, Dijkstra PD, Jutte PC, Lahoda LU, et al. The vascularised fibular graft for limb salvage after bone tumour surgery: a multicentre study. *The bone & joint journal*. 97 (2015) 853-61.
- [8] Zimel MN, Cizik AM, Rapp TB, Weisstein JS, Conrad EU, 3rd. Megaprosthesis versus Condyle-sparing intercalary allograft: distal femoral sarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*. 467 (2009) 2813-24.
- [9] Bielack SS, Kempf-Bielack B, Dellling 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*. 20 (2002) 776-90.
- [10] Brennan MA, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem cell research & therapy*. 5 (2014) 114.
- [11] Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, Pinto D, 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) 765-71.
- [12] Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lezot 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*. 35 (2014) 9660-7.
- [13] Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the

- Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol.* 10 (1992) 5-15.
- [14] Grisendi G, Spano C, D'Souza N, Rasini V, Veronesi E, Prapa M, et al. Mesenchymal progenitors expressing TRAIL induce apoptosis in sarcomas. *Stem Cells.* 33 (2015) 859-69.
- [15] Mohr A, Lyons M, Deedigan L, Harte T, Shaw G, Howard L, et al. Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *J Cell Mol Med.* 12 (2008) 2628-43.
- [16] Grisendi G, Bussolari R, Veronesi E, Piccinno S, Burns JS, De Santis G, 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] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13 (2002) 4279-95.
- [18] Lu F, Li J, Gao J, Ogawa R, Ou C, Yang B, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 124 (2009) 1437-46.
- [19] Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 32 (2008) 48-55.
- [20] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Boriani F. Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study. *Aesthet Surg J.* 31 (2011) 682-93.
- [21] Perez-Cano R, Vranckx JJ, Lasso JM, Calabrese C, Merck B, Milstein AM, 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) 382-9.
- [22] Trojahn Kolle SF, Oliveri RS, Glovinski PV, Elberg JJ, Fischer-Nielsen A, Drzewiecki KT. 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] Yingbo Z, Daping Y. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg.* 68 (2012) 111.
- [24] Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenke L, Zuk PA, Hedrick MH, et al. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am.* 90 (2008) 1043-52.
- [25] Burns JS, Safwat A, Grisendi G, Kassem M, Dominici M. Sarcomas as a mise en abyme of mesenchymal stem cells: exploiting interrelationships for cell mediated anticancer therapy. *Cancer Lett.* 325 (2012) 1-10.
- [26] Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells.* 29 (2011) 11-9.
- [27] Bian ZY, Fan QM, Li G, Xu WT, Tang TT. 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) 2554-60.
- [28] 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.* 40 (2012) 163-9.
- [29] Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 281 (2009) 32-41.
- [30] Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Redini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One.* 5 (2010) e10999.
- [31] 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.* 70 (2010) 7063-72.
- [32] Endo-Munoz L, Evdokiou A, Saunders NA. The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 1826 (2012) 434-42.
- [33] Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, et al. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone.* 37 (2005) 74-86.
- [34] Rousseau J, Escriou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scherman D, et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther.* 17 (2010) 387-97.
- [35] Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 19 (1995) 421-5.
- [36] Covarrubias P, Cardenas-Camarena L, Guerrerrosantos J, Valenzuela L, Espejo I, Robles JA, et al. Evaluation of the histologic changes in the fat-grafted facial skin: clinical trial. *Aesthetic Plast Surg.* 37 (2013) 778-83.
- [37] Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J.* 29 (2009) 360-76.
- [38] Cordonnier T, Langonne A, Sohier J, Layrolle P, Rosset P, Sensebe L, et al. Consistent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum. *Tissue engineering Part C, Methods.* 17 (2011) 249-59.
- [39] Brennan MA, Renaud A, Gamblin AL, 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.* 10 (2015) 045019.
- [40] Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, 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) 3688-97.
- [41] Chevalier S, Fourcin M, Robledo O, Wijdenes J, Poupard-Barthelaix A, Gascan H. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem.* 271 (1996) 14764-72.

- [42] Gobin B, Moriceau G, Ory B, Charrier C, Brion R, Blanchard F, et al. Imatinib mesylate exerts anti-proliferative effects on osteosarcoma cells and inhibits the tumour growth in immunocompetent murine models. *PLoS One*. 9 (2014) e90795.
- [43] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25 (2001) 402-8.
- [44] 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*. 8 (2006) 315-7.
- [45] Rousseau J, Escriou V, Lamoureux F, Brion R, Chesneau J, Battaglia S, et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 26 (2011) 2452-62.
- [46] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 7 (2005) 967-76.
- [47] Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Veterinary journal*. 175 (2008) 69-75.
- [48] Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, et al. Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res*. 69 (2009) 5648-55.
- [49] Bochet L, Lehuede C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res*. 73 (2013) 5657-68.
- [50] Carriere A, Ebrahimian TG, Dehez S, Auge N, Joffre C, Andre M, et al. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29 (2009) 1093-9.
- [51] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 109 (2004) 1292-8.
- [52] Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, 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) 454-68.
- [53] Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard MP, Stoll I, et al. Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene*. 27 (2008) 6347-55.
- [54] David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, 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.
- [55] Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 71 (2011) 2455-65.
- [56] Nguyen-Ngoc KV, Cheung KJ, Brenot A, Shamir ER, Gray RS, Hines WC, et al. ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (2012) E2595-604.
- [57] Zhang P, Dong L, Yan K, Long H, Yang TT, Dong MQ, et al. CXCR4-mediated osteosarcoma growth and pulmonary metastasis is promoted by mesenchymal stem cells through VEGF. *Oncol Rep*. 30 (2013) 1753-61.
- [58] Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, 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) 7308-18.
- [59] Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*. 7 (2012) e45590.
- [60] Aanstoos ME, Regan DP, Rose RJ, Chubb LS, Ehrhart NP. Do Mesenchymal Stromal Cells Influence Microscopic Residual or Metastatic Osteosarcoma in a Murine Model? *Clinical orthopaedics and related research*. (2015).
- [61] Hernigou P, Homma Y, Flouzat-Lachaniette CH, Poignard A, Chevallier N, Rouard H. Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *J Bone Joint Surg Am*. 95 (2013) 2215-21.
- [62] Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Freeman M, Faulkner S, Robinson B, et al. Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Current stem cell research & therapy*. 6 (2011) 368-78.
- [63] Hernigou P, Flouzat Lachaniette CH, Delambre J, Chevallier N, Rouard H. 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? *International orthopaedics*. 38 (2014) 1825-35.

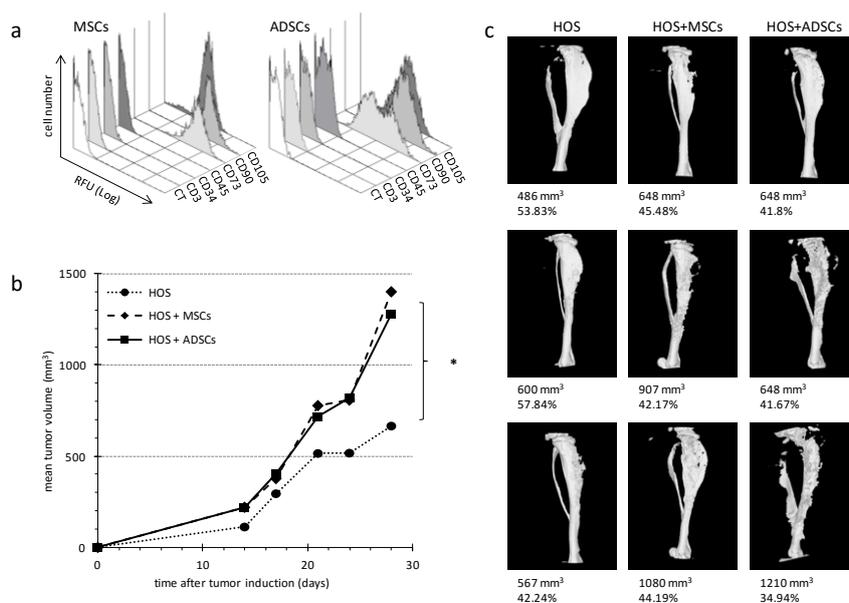


Figure 1: Co-injection of MNNG-HOS cells with ADSCs and MSCs in athymic mouse.

(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 (CRT). (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.

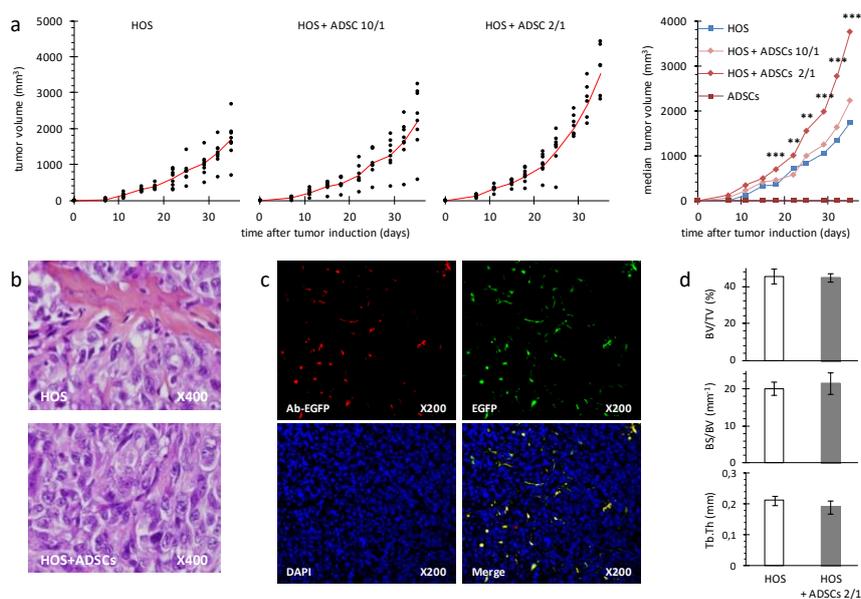


Figure 2: Co-injection of MNNG-HOS cells with ADSCs at ratio 10/1 or 2/1 in athymic mouse.

(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).

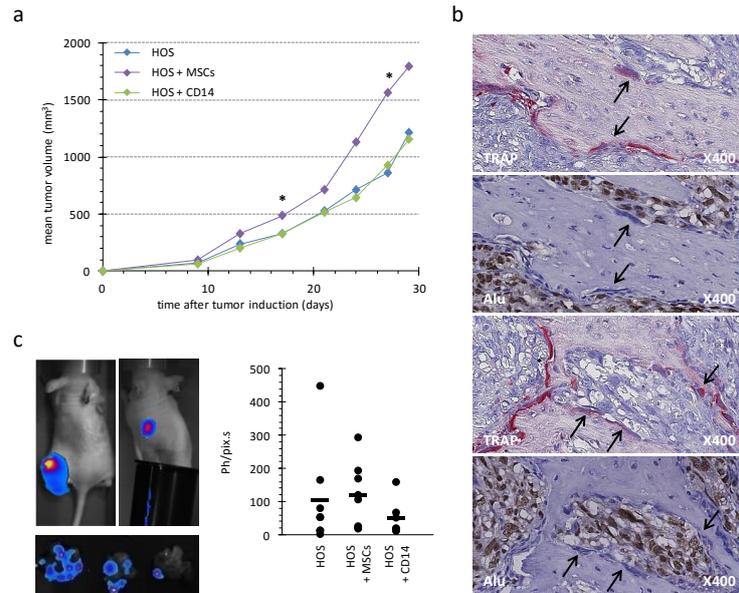


Figure 3: Co-injection of MNNG-HOS cells with MSCs or pre-osteoclasts in athymic mouse.

(a) Evolution of median tumor volumes is reported for each group of mice (n=6). The HOS groups were injected with $2 \cdot 10^6$ MNNG-HOS cells, while the groups HOS+MSCs and HOS+CD14 were injected with $2 \cdot 10^6$ 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.

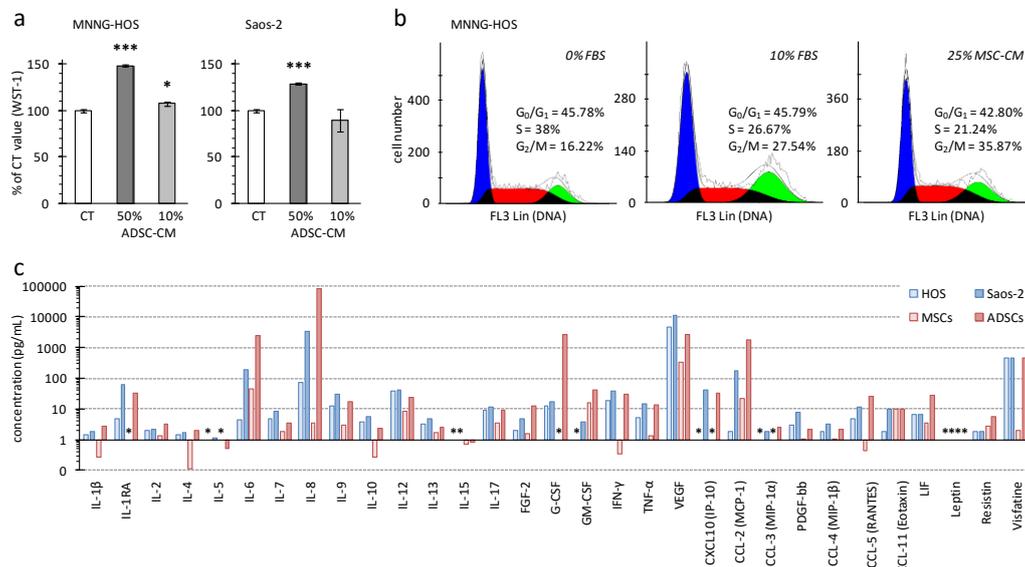


Figure 4: MSC-like cell secreted factors on proliferation of osteosarcoma cells *in vitro*.

(a) Mitochondrial activity of MNNG-HOS or Saos-2 cells was measured after 24 hours 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 hours in medium not supplemented (CT) 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.

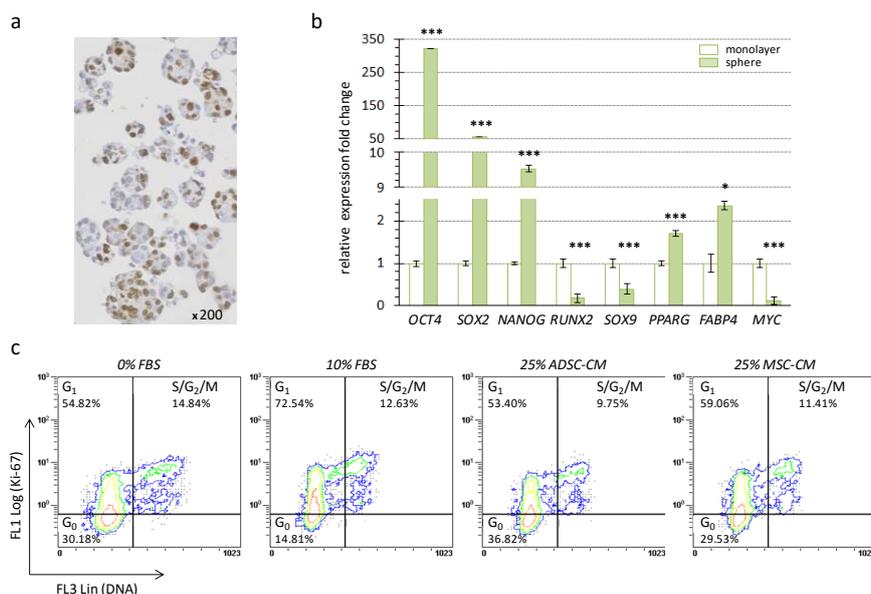


Figure 5: MSC-like cell secreted factors on quiescent osteosarcoma cells *in vitro*.

(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 hours in medium not supplemented (0% FBS) or supplemented with 10% FBS (10%) or 25% ADSC/MS-CM. Results are representative of 3 independent experiments.

Official Symbol	Official full name; Other name	Sense primer Antisense primer
<i>ACTB</i>	Actin beta	CCAACCGGAGAAGATGA CCAGAGGCGTACAGGGATAG
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG GGTGCAAGGAGCATTGCT
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1; OCT4	CAATTTGCCAAGCTCCTGA AGATGGTCGTTGGCTGAAT
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC
<i>NANOG</i>	Nanog Homeobox	ATGCCTCACCGGAGACTGT AAGTGGGTTGTTGCCTTTG
<i>RUNX2</i>	Runt-related transcription factor 2; CBFA1	GTGCCTAGGCGATTTC GCTCTTCTACTGAGATGGAAGG
<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	GTACCCGCACTTGACAAC TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	GACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAA TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC
<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4	CCTTTAAAAATACTGAGATTCCTTCA GGACACCCCATCTAAGGTT
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogene homolog	CACCAGCAGGACTCTGA GATCCAGACTCTGACCTTTTGC

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.

Thèse de Doctorat

Pierre AVRIL

IMPACT DU TRANSFERT DE TISSU ADIPEUX ET DE CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES SUR LE RISQUE CARCINOLOGIQUE

IMPACT OF ADIPOSE TISSUE AND MESENCHYMAL STEM CELL TRANSFER
ON CARCINOLOGICAL RISK

La Greffe de Tissu Adipeux (GTA) est une technique de reconstruction tissulaire couramment utilisée en chirurgie plastique. Cependant, l'innocuité de la GTA dans un contexte post-tumoral demeure incertaine. Suite à l'observation au CHU de Nantes d'un cas de récurrence locale et tardive d'un ostéosarcome 13 ans après la première tumeur et 18 mois après une GTA, des études précliniques ont été réalisées, identifiant un effet pro-tumoral du TA sur l'ostéosarcome. Le TA contient de nombreux éléments pouvant interagir avec des cellules tumorales : adipocytes, Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) ou encore cytokines. Les travaux présentés dans cette thèse montrent un effet pro-prolifératif des facteurs solubles du TA sur les cellules d'ostéosarcome ainsi qu'un effet pro-tumoral exercé in vivo et in vitro par les CSM. Après une GTA, la récurrence tumorale peut s'expliquer par la réactivation de cellules souches cancéreuses (CSC) résiduelles quiescentes. Un modèle in vitro de culture en sphères a permis d'obtenir des cellules d'ostéosarcome quiescentes au phénotype de CSC. Dans ces conditions, les facteurs solubles produits par le TA et les CSM n'induisaient pas de reprise de la prolifération des cellules tumorales. La GTA post-tumorale étant principalement utilisée après un cancer du sein, les travaux ont été étendus aux cellules de carcinome mammaire. Ainsi les facteurs solubles du TA exercent un effet pro-prolifératif sur les cellules de carcinome mammaire et favorisent la reprise de la prolifération et la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM) des cellules tumorales quiescentes.

Mots Clefs : Ostéosarcome, Cancer du Sein, Tissu Adipeux, Greffe de Tissu Adipeux, Cellules Souches Mésoenchymateuses, Cellules Souches Cancéreuses, Facteurs Solubles

Lipofiling or Adipose Tissue Transfer (ATT) is a commonly used procedure in plastic surgery to correct tissue defects. However, the safety of lipofilling used in a post-neoplastic context remains still unclear. Facing an unexpected case of a late and local osteosarcoma recurrence reported by Nantes University Hospital, 13 years after the first tumor treatment and 18 months after the patient received a lipofilling, preclinical studies have been established. Previous experiments performed in our laboratory showed a pro-tumor effect of AT on osteosarcoma. Many components of the AT are known to interact with cancer cells: adipocytes, Mesenchymal Stem Cells (MSC), cytokines and other soluble factors. The work presented here focused on the pro-proliferation effect of soluble factors produced by AT on osteosarcoma cells and on the pro-tumor effect of MSC on osteosarcoma, both in vivo and in vitro. In the case of a recurrence following lipofilling, tumor formation can be explained by quiescent Cancer Stem Cells (CSC) being stimulated by AT injection. Quiescent osteosarcoma cells with CSC characteristics have been obtained with an in vitro model of oncosphere culturing. In this model, AT and MSC soluble components were not able to make cells proliferate again. As lipofilling procedure is mainly used after a breast cancer, experiments have been performed on mammary carcinoma cells. Thus, AT soluble factors exhibited a pro-proliferation effect on growing cells and could promote the proliferation and Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) of quiescent cells.

Keywords: Osteosarcoma, Breast Cancer, Adipose Tissue, Lipofilling, Mesenchymal Stem Cells, Cancer Stem Cells, Soluble Factors.