

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE
Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTÉ

ONCOSTATINE M:
CIBLE OU MOLÉCULE THÉRAPEUTIQUE
DANS LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES

THÈSE DE DOCTORAT
Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

Emmanuelle DAVID

le 30 mars 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M. TAUPIN Jean-Luc Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Bordeaux
M. MARIE Pierre Directeur de Recherche CNRS, Paris

Examineurs

M. DE PINIEUX Gonzague Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Tours
M. TIRODE Franck Chargé de Recherche INSERM, Paris
Mme DUTOUR Aurélie Cadre biologiste CRCL, Lyon

Directeurs de thèse

M. BLANCHARD Frédéric Chargé de Recherche INSERM, Nantes
Mme RÉDINI Françoise Directrice de Recherche INSERM, Nantes

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives - INSERM UMR 957 - EA 3822, grâce à une bourse du ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur et notamment au soutien financier de la Ligue contre le cancer.



Sommaire

INTRODUCTION.....	1
1 ^{ère} Partie : Physiologie de l'os et du cartilage	4
2 ^{ème} Partie : Les tumeurs osseuses primitives.....	34
3 ^{ème} Partie : Thérapies anticancéreuses	64
4 ^{ème} Partie : OSM et LIF, 2 cytokines de la famille de l'IL-6 impliquées dans la prolifération tumorale et la physiopathologie osseuse.....	76
5 ^{ème} Partie : Objectifs de la thèse.....	109
RÉSULTATS.....	111
1 ^{ère} partie : Effet antitumoral de l'OSM sur les chondrosarcomes.....	112
I. Introduction.....	113
II. Article 1	117
III. Complément de discussion.....	118
2 ^{ème} partie : Effet protumoral de l'OSM et du LIF sur les sarcomes d'Ewing : implication des récepteurs	126
I. Introduction.....	127
II. Article 2	130
III. Complément de discussion.....	132
3 ^{ème} partie : Effet protumoral de l'OSM sur les sarcomes d'Ewing : implication de JAK1	145
I. Introduction.....	146
II. Matériel et méthodes.....	149
III. Résultats.....	152
IV. Discussion	157
CONCLUSION GENERALE	160
ANNEXES.....	175
Annexe 1 : La niche osseuse des chondrosarcomes.....	176
Annexe 2 : Généralités sur les thérapies anti-tumorales	178
Annexe 3 : Spécificités de la thérapie des tumeurs en site osseux.....	185
Annexe 4 : Historique de découverte de l'OSM, du LIF et de l'IL-6	192
Annexe 5 : Induction de la différenciation ostéocytaire par l'OSM	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Organisation du tissu osseux	8
Figure 2: Organisation du tissu cartilagineux.....	12
Figure 3: Etapes de l'embryogenèse chez l'homme.....	15
Figure 4: Différenciation des cellules souches	19
Figure 5: Différenciation des MSC.....	21
Figure 6: Différenciation ostéoblastique.....	23
Figure 7: Différenciation chondrocytaire.....	24
Figure 8 : Différenciation ostéoclastique	27
Figure 9: Ossification endochondrale	30
Figure 10 : Les étapes du remodelage osseux	32
Figure 11: La triade RANK/RANKL/OPG.....	33
Figure 12: Mécanismes de prolifération, différenciation et apoptose	37
Figure 13: Les étapes du processus de tumorigenèse.....	41
Figure 14: Genèse d'un ostéosarcome et niveaux de différenciation	44
Figure 15: Origine des ostéosarcomes, chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing.....	45
Figure 16: Taux d'incidence des tumeurs osseuses primitives.....	46
Figure 17: Caractéristiques des ostéosarcomes	49
Figure 18: Caractéristiques et développement des chondrosarcomes	52
Figure 19: Caractéristiques des sarcomes d'Ewing.....	54
Figure 20: Translocation EWS-FLI1	59
Figure 21: La niche osseuse	63
Figure 22: Protocole EURO-E.W.I.N.G.99.....	67
Figure 23: Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6.....	78
Figure 24 : Structure et activation des JAK.....	80
Figure 25: Structure et activation des STAT.....	83
Figure 26: Voies de signalisation activées par les cytokines de type IL-6	87
Figure 27: Inhibition de la signalisation par les SOCS	89
Figure 28: Le récepteur de l'IL-6.....	95
Figure 29: L'OSM et ses récepteurs.....	99
Figure 30: Le récepteur du LIF	105
Figure 31: Implication des cytokines OSM/LIF/IL-6 sur le processus de tumorigenèse	108
Figure 32: Caractéristiques du modèle de chondrosarcome de Swarm.....	115
Figure 33: Principe du transfert de gène par technique adénovirale	116
Figure 34: L'OSM bloque les cellules SRC en phase S/G2/M	119
Figure 35: Adhésion des cellules SRC.....	121
Figure 36: Mécanisme d'action du ShEWS-FLI1 inducible par la doxycycline	129
Figure 37: Adhésion de cellules de sarcome d'Ewing.....	133
Figure 38: Effets de l'OSM et du LIF sur la prolifération	134

Figure 39: Régulation de l'expression du LIF par la TSA	135
Figure 40: Expression du LIFR et de l'OSMR dans les TOP	136
Figure 41: Phosphorylation de STAT3 dans les lignées	137
Figure 42: Phosphorylation d'Akt dans les lignées	138
Figure 43: Effet de l'OSM sur la prolifération de cellules normales	140
Figure 44: Suivi des volumes tumoraux lors d'un traitement par OSM ou LIF dans des modèles d'ES	142
Figure 45: Développement tumoral dans le modèle A673 1c.....	143
Figure 46: JAK1 est surexprimé dans les lignées de sarcome d'Ewing.....	152
Figure 47: JAK1 est surexprimé dans les tumeurs de sarcome d'Ewing	153
Figure 48: Expression de JAK2 et JAK3 dans les lignées et les tumeurs.....	154
Figure 49: L'inhibition d'EWS-FLI1 diminue l'expression de JAK1	155
Figure 50: L'inhibition de JAK1 prévient l'effet proprolifératif de l'OSM sur les ES	156
Figure 51: Récepteurs capables d'activer les JAK	159
Figure 52: Mécanismes d'action proposés de l'OSM dans les tumeurs osseuses primitives	174
Figure 53: Protocoles de traitement des ostéosarcomes	189
Figure 54: Historique des découvertes concernant l'OSM, le LIF et l'IL-6.....	196
Tableau 1: Caractéristiques des lignées de chondrosarcome	113
Tableau 2: Caractéristiques des lignées de sarcome d'Ewing.....	127
Tableau 3: Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative	150
Tableau 4: Récapitulatif des effets de l'OSM observés sur les principales fonctions cellulaires des ES et CS ...	165
Tableau 5: Effets de cytokines de type IL-6 sur la prolifération des lignées de TOP in-vitro.....	167
Tableau 6: Principaux agents de chimiothérapie conventionnelle	184
Tableau 7: Différentes dénominations des cytokines et leurs récepteurs	195

Liste des abréviations

CS : chondrosarcome	IGFBP3: insulin-like growth factor binding protein 3
CSC : cellule souche cancéreuse	IHH: Indian Hedgehog
ES : sarcome d'Ewing	IL- : interleukine
ESC: cellule souche embryonnaire	IL-6Rs: forme soluble du récepteur à l'IL-6
HSC: cellule souche hématopoïétique	JAK : janus kinase
iPS: cellule souche pluripotente induite	LIF : leukemia inhibitory factor
MEF : fibroblaste embryonnaire murin	LIFR : LIF récepteur
MSC : cellule souche mésenchymateuse	LPL: lipoprotéine lipase
NSC: cellules souche neurale	MAPK : mitogen activated protein kinase
OS: ostéosarcome	MEC: matrice extracellulaire
TAM: macrophage associé à la tumeur	M-CSF : macrophage monocyte-colony stimulating factor
TIL: lymphocyte infiltrant la tumeur	MMP : matrix metalloproteinase
TOP: tumeur osseuse primitive	NP : neuropoïétine
ACAN : aggrécane	OC : ostéocalcine
ADN : acide désoxyribonucléique	OCT3/4 : octamer-binding transcription factor 4
ALP : phosphatase alcaline	OP : ostéopontine
AP-1 : activator protein 1	OPG : ostéoprotégérine
ARN : acide ribonucléique	OSM : oncostatine M
APP : acute phase plasma protein	OSMR : OSM récepteur
Bad : Bcl-xL/bcl-2 associated death promoter homolog	OSMRs : forme courte de l'OSMR
Bax : Bcl-2 associated X protein	PDGF: Platelet Derived Growth Factor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
Bcl-xL : B-cell lymphoma like X long	PIAS : protein inhibitory of activated STAT
bFGF : basic fibroblast growth factor	PKC δ : protéine kinase C δ
BMP: bone morphogenic protein	PPAR γ 2 : proliferator activated receptor gamma 2
BSP : bone sialoprotein	PR: polyarthrite rhumatoïde
CBD : cytokine binding domain	PTH : hormone parathyroïdienne
CBFA1: core binding factor A1	PTHrP: para-thyroïde hormone-like hormone
CDK : cyclin dependant kinase	PTHrP: para-thyroïde hormone related protein
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein	RANK : receptor activator of nuclear factor κ B
CLC : cardiotrophin-like cytokine	RANKL : RANK ligand
CNTF : ciliary neurotrophic factor	Rb : retinoblastoma susceptibility tumor-suppressor
COLLn : collagène de type n	RUNX2: Runt-related transcription factor 2
COMP : cartilage oligomeric matrix protein	SH2 : Src homology 2
CREB/p300: cAMP response element-binding protein/E1A binding protein p300	SHP: Src homology containing tyrosine phosphatase
CT-1 : cardiotrophine-1	SiRNA: small interfering RNA
CTR : récepteur à la calcitonine	SOCS: suppressor of cytokine signalling
EGF: Epidermal Growth Factor	sOSMR : forme soluble de l'OSMR
Erk : extra-cellular regulated kinase	SOX: SRY-related high-mobility group box
FABP4 : fatty acid-binding protein-4	SRC: Swarm rat chondrosarcoma
FGF:Fibroblast Growth Factor	STAT : signal transducer and activator of transcription
gp130 : glycoprotéine 130	Sts : Staurosporine
gpl : gp130 like	TGF β : transforming growth factor β
Grb2 : growth-factor-receptor-bound protein 2	TNF: Tumor necrosis factor
HDAC : histone deacétylase	TRAIL: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
HIF: hypoxia inducible factor	TRAP : tartrate resistant acidic phosphatase
IFN : interferon	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
IGF : insulin-like growth factor	

INTRODUCTION

Plan détaillé de l'introduction

1^{ère} Partie : Physiologie de l'os et du cartilage.....	4
I. Le tissu osseux.....	5
A. Rôles et organisation macroscopique	5
B. Composition.....	6
II. Le tissu cartilagineux	9
A. Un type cellulaire unique : le chondrocyte	9
B. La matrice extracellulaire.....	10
C. Le périchondre	10
D. Classification et localisation des cartilages	11
III. Cellules souches et tissus squelettiques	13
A. Développement de l'embryon.....	13
B. Les cellules souches embryonnaires, adultes et iPS	16
C. Les cellules souches mésenchymateuses	20
D. Les cellules souches hématopoïétiques	26
IV. Croissance et remodelage de l'os	28
A. La croissance osseuse.....	28
B. Le remodelage osseux	31
2^{ème} Partie : Les tumeurs osseuses primitives.....	34
I. Généralités	35
A. Processus de tumorigenèse	35
B. Classification des tumeurs osseuses.....	42
C. Origine cellulaire et niveaux de différenciation des TOP	43
II. Les ostéosarcomes	46
A. Epidémiologie.....	46
B. Localisations	46
C. Caractéristiques et classification histologique	47
D. Etiologie.....	47
E. Diagnostic.....	49
III. Les chondrosarcomes.....	50
A. Epidémiologie.....	50
B. Localisation.....	50
C. Caractéristiques et classifications.....	50
D. Etiologie.....	51
E. Diagnostic.....	51
IV. Les sarcomes d'Ewing.....	53
A. Epidémiologie.....	53
B. Localisation.....	53
C. Caractéristiques	53
D. Etiologie.....	54
E. Diagnostic.....	55
F. EWS-FLI1 : Facteur clé du développement des ES	55
V. Rôle de la niche osseuse dans le développement des TOP	60

A.	Notion de niche et cellules souches cancéreuses	60
B.	Application aux tumeurs osseuses	61
3^{ème}	Partie : Thérapies anticancéreuses	64
I.	Généralités	65
II.	Protocoles thérapeutiques actuels des TOP	65
A.	Traitement des ostéosarcomes	65
B.	Traitement des chondrosarcomes	66
C.	Traitement des sarcomes d'Ewing.....	67
III.	Développement de nouvelles thérapies	68
A.	Nouvelles thérapies des chondrosarcomes	68
B.	Nouvelles thérapies des sarcomes d'Ewing	70
C.	Développement des thérapies cytokiniques en cancérologie	72
4^{ème}	Partie : OSM et LIF, 2 cytokines de la famille de l'IL-6 impliquées dans la prolifération tumorale et la physiopathologie osseuse	76
I.	Caractéristiques communes des cytokines de la famille de l'IL-6.....	77
A.	Définitions	77
B.	Récepteurs	77
C.	Voies de signalisation	79
D.	Activités biologiques	90
E.	Historique des découvertes	92
II.	Modèles murins transgéniques ou KO.....	93
III.	IL-6.....	95
A.	Structure	95
B.	Cellules productrices	95
C.	Récepteur	95
D.	Activités biologiques	96
IV.	OSM.....	97
A.	Structure	97
B.	Cellules productrices	97
C.	Récepteurs	97
D.	Activités biologiques générales	100
E.	Effets sur le développement tumoral.....	102
V.	LIF.....	104
A.	Structure	104
B.	Cellules productrices	104
C.	Récepteur	104
D.	Activités biologiques	105
VI.	Résumé : Cytokines et tumorigenèse	107

**1^{ère} Partie : Physiologie de l'os et du
cartilage**

I. Le tissu osseux

A. Rôles et organisation macroscopique

Le tissu osseux se caractérise par la nature solide de sa matrice extracellulaire (MEC) qui a la particularité de se calcifier. Le tissu osseux a 3 fonctions.

- **Fonction mécanique.** Le tissu osseux est un tissu très résistant capable de supporter de fortes contraintes mécaniques. L'os a un rôle de soutien du corps et de protection des organes.
- **Fonction métabolique.** Le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé notamment sous l'effet des pressions mécaniques. Le remodelage osseux entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux, permettant ainsi le contrôle du métabolisme phosphocalcique.
- **Fonction hématopoïétique.** Les os renferment dans leurs espaces médullaires la moelle hématopoïétique à l'origine des cellules du sang. Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques.

Le squelette humain contient 3 types d'os selon leur forme générale : les os longs (humérus, fémur, tibia), les os courts (vertèbres, phalanges) et les os plats (sternum).

Un os long typique chez l'adulte est constitué de plusieurs parties (figure 1).

- **La diaphyse** est la partie centrale cylindrique.
- **Les épiphyses** correspondent aux deux extrémités recouvertes de cartilage articulaire.
- **Les métaphyses** connectent la diaphyse à chaque épiphyse.

Au sein de ces différentes parties, on distingue plusieurs types de tissus osseux [1] (figure 1).

L'os compact ou cortical. Il s'agit d'os dense (5 à 30 % de porosité) présent dans la couche externe des os qui représente jusqu'à 80% de la masse squelettique. Son architecture est faite d'un grand nombre d'ostéons contigus. L'ostéon est un cylindre de 200 à 250 micromètres de largeur, parallèle à l'axe longitudinal de la corticale de l'os. Il est formé par empilement de lamelles concentriques de fibres de collagène autour d'un canal de Havers. Ce canal permet le passage de vaisseaux, de fibres nerveuses amyéliniques et de la connexion intercellulaire [2].

L'os spongieux ou trabéculaire. Avec un degré de porosité de 30 à 90 %, il est localisé principalement dans les régions métaphysaires des os longs, ainsi que dans les os courts et plats. Il est constitué de trabécules qui s'entremêlent dans la moelle osseuse. L'os spongieux a un rôle hématopoïétique en permettant le développement des progéniteurs des différentes lignées sanguines.

Le périoste. Il s'agit de l'enveloppe externe qui entoure l'os sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion de tendons et de ligaments.

L'endoste. Il s'agit de l'enveloppe interne qui entoure les cavités osseuses.

B. Composition

Le tissu osseux est un tissu conjonctif formé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité.

- La fraction organique contient les cellules de la lignée ostéoblastique (qui comprend les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes), les cellules de la lignée ostéoclastique (qui comprend les préostéoclastes et les ostéoclastes) et la matrice extracellulaire.
- La fraction minérale est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite.

1. Les cellules osseuses

Le préostéoblaste est directement issu de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les préostéoblastes sont des cellules allongées capables de se diviser et d'exprimer l'enzyme phosphatase alcaline.

L'ostéoblaste correspond au stade de différenciation suivant le préostéoblaste. Les ostéoblastes permettent la synthèse et la minéralisation de la MEC osseuse au cours de la croissance ainsi que son renouvellement chez l'adulte [3]. Les ostéoblastes ont une disposition pseudo-épithéliale et communiquent entre eux par des jonctions gap. Le noyau est situé au pôle basal et la partie apicale du cytoplasme contient de nombreux organites permettant une activité de synthèse importante. Les ostéoblastes reposent sur une couche de tissu non encore minéralisé appelé tissu ostéoïde constitué de collagène, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes. Les ostéoblastes libèrent la phosphatase alcaline (ALP), une enzyme hydrolysant les esters phosphoriques qui sont des inhibiteurs de la minéralisation. Cette enzyme, dosable dans le sérum, est donc un index de la formation osseuse. Les ostéoblastes synthétisent également des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme et des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines et notamment stimuler la formation ou l'activité des ostéoclastes [4]. Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et seront libérés quand l'os sera résorbé.

L'ostéocyte apparaît quand l'ostéoblaste est emmuré dans la matrice minéralisée. 10 à 20% des ostéoblastes deviennent des ostéocytes. L'ostéocyte, situé dans une logette appelée ostéoplaste, est relié aux autres cellules par un réseau de canalicules dans lesquels l'ostéocyte émet de fins prolongements [5]. L'ostéocyte a un niveau d'activité métabolique bien inférieur à celui de l'ostéoblaste, mais du fait de sa localisation, il joue un rôle dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux et qui influencent son métabolisme.

La cellule bordante apparaît quand l'ostéoblaste s'aplatit et a une activité métabolique très réduite. Les cellules bordantes recouvrent les surfaces trabéculaires et sont capables de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs.

L'ostéoclaste est une grande cellule (100µm) plurinucléée (10-20 noyaux en moyenne), formée par la fusion de cellules mononucléées d'origine hématopoïétique dérivées des cellules de la lignée monocyte macrophage [6]. Les ostéoclastes sont responsables, par la production d'enzymes protéolytiques, de la dégradation de la matrice organique osseuse, et par acidification du milieu, de la solubilisation de la fraction minérale de l'os. Le pôle basal de la cellule en contact avec l'os présente une membrane plissée permettant des échanges métaboliques nombreux. La zone de contact proprement dite est dénuée de tout organite (zone claire) alors que par ailleurs le cytoplasme est chargé de très nombreuses vacuoles, vésicules et lysosomes. Les ostéoclastes sont des cellules hautement mobiles.

2. La matrice extracellulaire

La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme l'ostéoïde. Les macromolécules qui la composent sont classées en 2 catégories.

- la substance fibrillaire (90 %) contient des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine).
- la substance interfibrillaire (10 %) englobe les glycosaminoglycanes et protéoglycanes, des petites protéines non collagéniques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités.

Le collagène de type 1 (COLL1), constituant majoritaire de l'ostéoïde, est une glycoprotéine fibreuse rigide. Il est formé de l'assemblage de trois chaînes alpha de polypeptides, synthétisées par l'ostéoblaste, qui s'associent pour former des fibrilles. C'est l'orientation des fibrilles de collagène qui confère à l'os la capacité de résister aux forces de tension.

L'ostéopontine (OP) est une glycoprotéine riche en acide sialique ayant une grande affinité pour le calcium. Au niveau osseux, l'OP permet la régulation de l'adhésion des cellules osseuses, de la fonction des ostéoclastes et de la minéralisation de la MEC [7].

La sialoprotéine osseuse (BSP) est une glycoprotéine riche en acide sialique [8] impliquée dans la minéralisation initiale de l'os en se déposant sur la MEC et facilitant la formation des cristaux d'hydroxyapatite [9].

L'ostéocalcine (OC), synthétisée par les ostéoblastes, active les ostéoclastes et joue ainsi un rôle dans le renouvellement osseux. Elle capte des ions Ca^{2+} extracellulaires dont la concentration locale augmente. Le dosage de cette protéine dans le sérum est le reflet du métabolisme osseux [10].

3. La fraction minérale

Le squelette représente la principale réserve minérale de l'organisme. Environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et 40 à 60% du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Ces minéraux sont rapidement mobilisables grâce à l'activation des ostéoclastes par certaines hormones et cytokines telles que RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) [11]. La minéralisation se déroule en 2 étapes :

- la sécrétion de la matrice ostéoïde sous forme de « bandes ». L'ostéoblaste produit les fibres de collagène qui sont orientées en fonction des contraintes mécaniques [12].
- la minéralisation proprement dite. Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27 %) et le phosphore (12 %) dans un ratio égal à 1,66. Les taux de calcium et d'hydroxyde de phosphate augmentent progressivement grâce à l'OC et à l'activité ALP de l'ostéoblaste. Ces ions précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite qui se fixent sur les fibres de collagène conférant à l'os sa solidité [13].

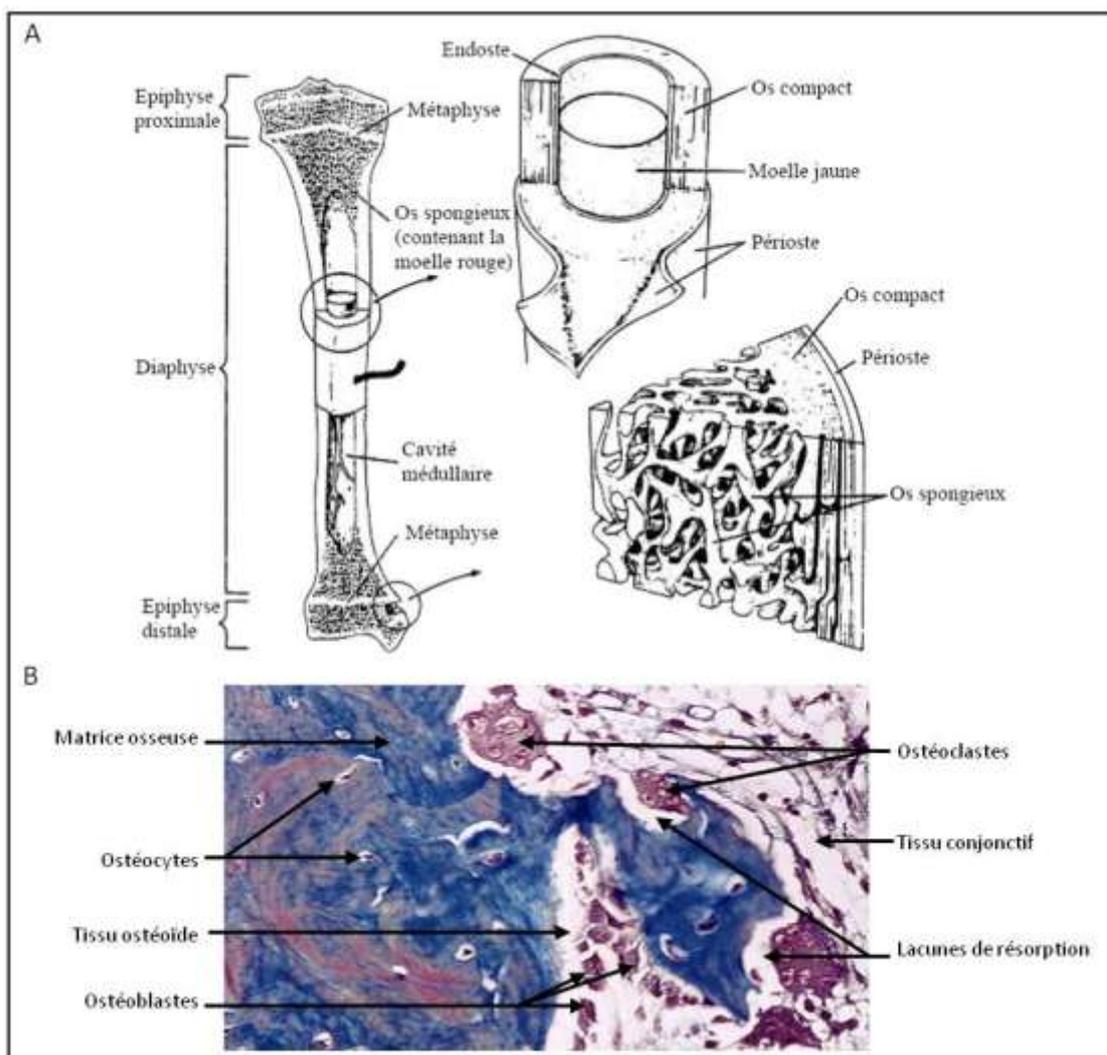


Figure 1: Organisation du tissu osseux

A-Organisation macroscopique d'un os long. B- Coupe histologique de tissu osseux x100

II. Le tissu cartilagineux

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes inclus dans des chondroplastes, au sein d'une MEC abondante. Comme pour le tissu osseux, le tissu cartilagineux a une consistance dure, mais contrairement à l'os, le cartilage n'est pas minéralisé et est totalement dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que de nerfs. Le tissu cartilagineux est un tissu élastique et solide qui présente 3 fonctions principales :

- Il exerce un rôle de support structural
- Il facilite les mouvements
- Il joue un rôle primordial dans l'ossification

A. Un type cellulaire unique : le chondrocyte

1. Prolifération / différenciation

Les chondrocytes proviennent des MSC qui se sont différenciées notamment sous l'effet du facteur de transcription SOX9 [14]. Différents stades de différenciation peuvent être observés : le chondroblaste, le chondrocyte mature, le chondrocyte hypertrophique.

Il existe 2 mécanismes de croissance du cartilage.

La croissance par apposition a lieu à partir du périchondre (décrit page 10). Les MSC de la couche interne du périchondre se différencient en chondroblastes puis en chondrocytes pour produire le collagène de type 2 (COLL2) ainsi que la matrice cartilagineuse au sein de laquelle ils finissent par être emprisonnés.

La croissance interstitielle est rare chez l'adulte. Les chondrocytes réalisent des mitoses successives pour aboutir à un groupe de chondrocytes (groupe isogénique). L'axe des mitoses régit la disposition des cellules filles dans le tissu cartilagineux. Les cellules peuvent être alignées en file droite, constituant un groupement isogénique axial, ou être disposées en cercle, formant un groupement isogénique coronaire. Les cellules d'un même groupement isogénique correspondent à un clone cellulaire.

A l'âge adulte, les chondrocytes sont des cellules qui se divisent peu. La régénération du tissu cartilagineux après un traumatisme est de ce fait peu efficace et nécessite le recours à des techniques chirurgicales telles que la microfracture, la mosaïcoplastie ou la greffe autologue de chondrocytes. Les recherches actuelles dans ce domaine s'orientent sur l'implantation de biomatériaux associés à des MSC [15].

2. Fonctions

Les chondrocytes assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants de la MEC cartilagineuse afin de maintenir son intégrité. Ils produisent des cytokines, facteurs de croissance, collagènes, protéoglycanes, enzymes protéolytiques...

Les chondrocytes possèdent des récepteurs pour l'hormone de croissance, les vitamines A et D, la parathormone, les glucocorticoïdes et les œstrogènes [16].

Le cartilage étant un tissu non vascularisé, la nutrition des chondrocytes s'effectue à partir du périchondre ou à partir du liquide synovial et de l'os sous-chondral (pour les cartilages articulaires), par diffusion ou via des canaux cartilagineux.

B. La matrice extracellulaire

La MEC est composée de substance fondamentale et de fibres conférant ses caractéristiques.

La substance fondamentale, compacte et translucide, contient diverses molécules :

- L'eau représente 70 à 80 % du poids de la MEC et permet la déformabilité des cartilages.
- Les protéoglycanes et glycosaminoglycanes tels que l'aggrécane (ACAN) et les chaînes constitutrices de chondroïtine-sulfate ou kératane-sulfate favorisent la teneur élevée en eau et donnent au cartilage ses propriétés mécaniques de compressibilité et d'élasticité.
- D'autres protéoglycanes sont aussi exprimés (decorine, annexine II, V et VI).
- L'acide hyaluronique est associé aux glycosaminoglycanes sulfatés.
- La chondronectine est une protéine non collagénique.
- Les métalloprotéinases matricielles et aggrécanasés sont des enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement.

Les fibres sont associées à la substance fondamentale et assurent la résistance mécanique du tissu cartilagineux. Il s'agit essentiellement de fibres de collagène, et parmi celles-ci, COLL2 est le collagène le plus abondant dans la MEC. Les collagènes de type 9, 10 et 11 (COLL9, COLL10 et COLL11) sont également présents au sein de la matrice. Les fibres peuvent être disposées au hasard mais dans certaines localisations leur orientation réalise un renforcement destiné à résister aux pressions.

C. Le périchondre

Tous les cartilages de l'organisme sont recouverts de périchondre à l'exception des cartilages articulaires et des cartilages nasaux, costaux et épiphysaires.

Le périchondre est un tissu conjonctif d'épaisseur variable (en moyenne 300 µm) formé de fibroblastes et d'un réseau dense de fibres de collagène qui adhère fortement au cartilage. Contrairement au cartilage, le périchondre est un tissu vascularisé qui joue un rôle dans la nutrition, la croissance (par apposition périphérique) et la réparation du cartilage. Histologiquement, il comporte une couche fibreuse externe richement vascularisée "nourricière" et une couche cellulaire interne peu vascularisée "chondrogène".

D. Classification et localisation des cartilages

On distingue 3 variétés histologiques de cartilages selon la richesse de la MEC en fibres de collagènes ou élastiques (Figure 2).

Le cartilage hyalin est le cartilage le plus répandu dans le corps humain. Les chondrocytes y sont volumineux et la matrice extracellulaire abondante. Les microfibrilles de COLL2 et COLL11, de petite taille et peu nombreuses, sont disposées en un réseau à mailles larges. Le cartilage hyalin peut être localisé au niveau articulaire (à la surface des articulations mobiles de type synoviale en continuité du périoste de l'os) ou non articulaire (cloison nasale, cartilage thyroïde, côtes flottantes).

Le cartilage fibreux ou fibrocartilage est formé de MEC contenant d'épais faisceaux de fibres de collagène orientés le long des lignes de force, le rendant très résistant aux tractions et aux compressions. Les chondrocytes, plus ou moins fusiformes et dépourvus d'inclusions lipidiques, sont entourés d'une zone péricellulaire de substance fondamentale dépourvue de fibres. Ce type de cartilage est retrouvé dans les disques intervertébraux, les ménisques du genou, la symphyse pubienne et l'insertion de certains tendons (tendon d'Achille).

Le cartilage élastique présente une densité cellulaire très importante avec des chondrocytes contenant souvent de volumineuses inclusions lipidiques. La matrice contient quelques fibres de collagène et surtout de nombreuses fibres élastiques disposées en un réseau tridimensionnel dense autour de chaque chondrocyte. Ceci permet de maintenir la forme de la structure cartilagineuse en lui conférant une grande flexibilité. On retrouve le cartilage élastique notamment dans l'oreille externe, l'épiglotte et le larynx.

La localisation des cartilages dépend de l'âge : s'il constitue la plus grande partie du squelette du fœtus, son importance diminue chez l'enfant pour n'être retrouvé chez l'adulte qu'au niveau des articulations, des côtes, des pièces de l'appareil respiratoire et de la face.

Le cartilage de conjugaison ou cartilage de croissance est un cartilage hyalin situé entre la métaphyse et l'épiphyse de l'os assurant la croissance en longueur de celui-ci. Ce cartilage n'est donc pas présent chez l'adulte.

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin recouvrant les cavités articulaires, permettant de supporter les forces et les mouvements réguliers des pièces osseuses les unes par rapport aux autres. Dans certaines articulations peu mobiles (comme les synchondroses des disques intervertébraux), il peut être remplacé par un cartilage fibreux.

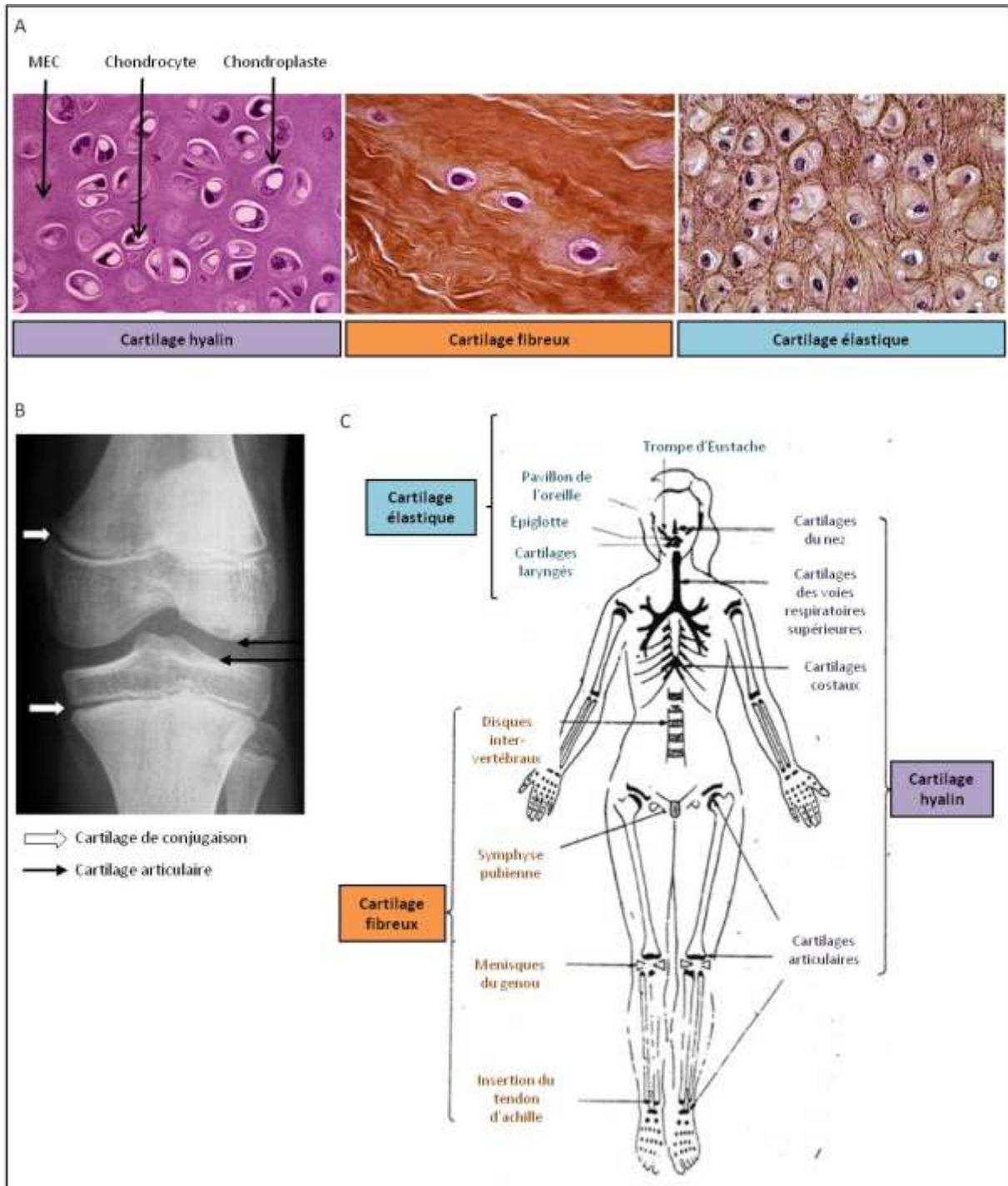


Figure 2: Organisation du tissu cartilagineux

A- Coupe histologique des 3 types de cartilages. B-radiographie du genou chez un enfant (adapté de <http://www.genou.com/LCAenfant/lcaenfant.htm>). C-Localisation anatomique des différents cartilages humains (D'après http://umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/wiki/docvideos/Grenoble_1011/seigneurin_daniel)

III. Cellules souches et tissus squelettiques

A. Développement de l'embryon

Dès la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde (J1), le développement de l'œuf débute et se déroule en plusieurs phases [17][18] (Figure 3).

La segmentation et la blastulation

La segmentation correspond à la première phase du développement embryonnaire. De J1 à J5 chez l'homme, cette étape est caractérisée par une suite de mitoses rapides et successives fragmentant l'œuf en un ensemble de cellules (blastomères) dont la taille diminue à mesure des divisions puisque la segmentation n'engendre pas l'accroissement du diamètre de l'œuf.

Jusqu'au stade 8 blastomères (J3), les cellules sont dites totipotentes, c'est à dire capables de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de se structurer en formant un être vivant.

A J4, le stade morula correspond à un œuf formé de 16 cellules (macromères et micromères de taille inégale). Au cours de la blastulation, le phénomène de compaction initie les premiers événements de la différenciation embryonnaire en générant une nouvelle répartition des cellules dans la morula.

A J5, le dernier stade de la fragmentation correspond au blastocyste. Celui-ci est composé de 2 parties.

- Le trophoblaste correspond aux cellules périphériques à l'origine des structures extra-embryonnaires (placenta, cordon ombilical).
- L'embryoblaste (ou bouton embryonnaire) correspond aux cellules de la masse interne qui donnent naissance à l'embryon et à quelques annexes embryonnaires (sac amniotique, liquide amniotique). Le blastocyste contient une centaine de cellules constituant la masse interne. Ces cellules sont dites pluripotentes : elles sont capables de se différencier dans n'importe quel type cellulaire de l'organisme mais ne peuvent à elles seules aboutir à la création d'un individu complet.

A J5, l'embryon a généralement gagné la partie supérieure de l'utérus, où il devra s'apposer, puis s'implanter (phénomène de nidation) vers J7.

La gastrulation

La gastrulation correspond à la mise en place des trois feuilletts fondamentaux (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) ainsi que de la corde vers J21 dans l'embryon humain. A partir du blastocyste :

- le trophoblaste se scinde en syncytiotrophoblaste et en cytotrophoblaste.

- l'embryoblaste se scinde en hypoblaste et en épiblaste pour former le disque embryonnaire. Des cellules de l'épiblaste se différencient en amnioblastes et recouvrent la paroi intérieure de la cavité amniotique.

Plusieurs étapes complexes de migration et différenciation des groupes cellulaires précédemment cités aboutiront à l'embryon tridermique comprenant un ectoderme (feuille externe), un endoderme (feuille interne) et un mésoderme (feuille intermédiaire), tous trois formés à partir de l'épiblaste. Chacun de ces feuillets a pour rôle de constituer les organes du futur individu.

La neurulation et la métamérisation

La neurulation correspond à la mise en place des ébauches neurales et se déroule en 2 étapes. La neurulation primaire est la transformation de l'ectoderme de la région sus-chordale en un tube neural primitif, première ébauche du système nerveux central. La neurulation secondaire concerne le développement de la partie terminale de la moelle épinière.

La métamérisation correspond à la fragmentation et au bourgeonnement du mésoderme en lames mésodermiques gauche et droite découpées en une série de segments successifs pour former les somites et les vertèbres.

L'histogenèse

L'histogenèse caractérise la formation des divers tissus de l'organisme à partir des cellules souches des ébauches embryonnaires :

- L'ectoderme est à l'origine du système nerveux (neurectoderme), de l'épiderme, de la cornée, du cristallin, des cheveux, des ongles, de l'hypophyse...
- L'endoderme produit le système respiratoire (larynx, trachée, poumons), le tube digestif, le foie, le pancréas, la thyroïde, le thymus, ...
- Le mésoderme est à l'origine des muscles, des os, des cartilages, du système cardiovasculaire (cœur, vaisseaux sanguins), du système immunitaire, du système reproducteur (en excluant les cellules germinales, qui proviennent de l'épiblaste)...
- Une partie des muscles et du squelette de la tête provient de l'ectoderme (via les cellules de la crête neurale) : on parle alors de méssectoderme.

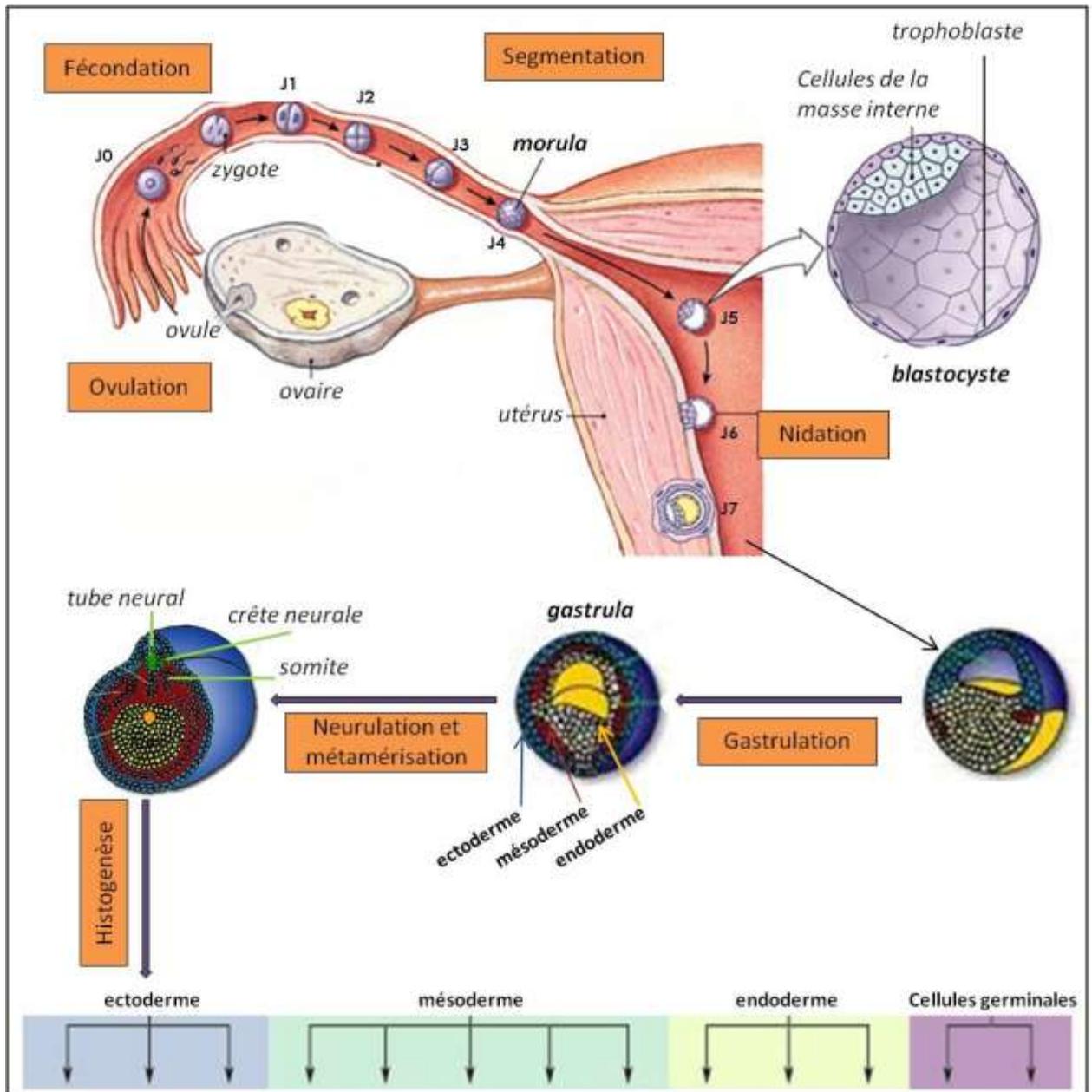


Figure 3: Etapes de l'embryogenèse chez l'homme

5 jours après la fécondation, l'œuf se présente sous forme de blastocyste. C'est à ce stade que sont prélevées les cellules permettant la création de lignées de cellules souches embryonnaires (ESC). Après la nidation de cet œuf, la gastrulation donne naissance aux trois feuillets embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme. Ces feuillets sont ensuite à l'origine des différents tissus de l'organisme.

B. Les cellules souches embryonnaires, adultes et iPS

1. Les cellules souches embryonnaires murines

Des cellules souches embryonnaires (ESC) ont été isolées à partir d'embryons de souris et cultivées dès le début des années 1980 [19]. Le terme ESC a été introduit pour distinguer ces cellules embryonnaires des cellules de carcinomes embryonnaires, également pluripotentes dérivés de tératocarcinomes, les cellules EC [20].

Les ESC doivent regrouper les 3 propriétés suivantes :

- Dériver d'un embryon avant son implantation.
- Proliférer de façon illimitée in-vitro sans se différencier (autorenouvellement).
- Pouvoir former tous les types cellulaires dérivés des 3 feuillets embryonnaires dans des conditions de culture prolongées (pluripotence).

Les ESC ont rapidement été utilisées pour la production de souris chimériques [21]. Ces cellules ont permis de mettre au point la technique d'inactivation de gène par recombinaison homologue (ou *knock-out*) consistant à muter des ESC puis à les réintroduire dans un embryon receveur, pour obtenir, après plusieurs croisements, des souris homozygotes pour une mutation dans un gène donné [22].

De nombreux protocoles ont été testés pour améliorer les conditions de culture des ESC de souris in-vitro afin qu'elles conservent leur statut de cellules pluripotentes [23]. A ce jour, ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu contenant la cytokine LIF (leukaemia inhibitory factor) et de la BMP4 (bone morphogenetic protein 4) permettant d'induire des protéines inhibant la différenciation [24].

2. Les cellules souches embryonnaires humaines

Origine des cellules

En 1998, une lignée d'ESC humaine était réalisée pour la première fois au monde par une équipe américaine [25]. La recherche sur ce type de cellule reste toutefois limitée par la législation et les problèmes éthiques. En effet, ces cellules sont prélevées sur des embryons humains surnuméraires issus de la fécondation in-vitro et voués à la destruction. En France, seuls quelques laboratoires ont obtenus en 2004 une dérogation pour travailler sur ces cellules embryonnaires humaines.

Maintien de la pluripotence

Au stade blastocyste, les cellules de la masse interne peuvent être prélevées et cultivées in-vitro. Des conditions de culture très spécifiques permettent de maintenir la pluripotence de ces ESC et leur capacité d'autorenouvellement infini. Ces cellules doivent être cultivées sur un tapis de

fibroblastes embryonnaires murins (MEF) en présence notamment de bFGF (basic fibroblast growth factor) recombinant humain [26]. Les ESC prolifèrent alors en formant des amas de cellules très serrées.

Induction de la différenciation in-vitro

Les ESC sont théoriquement capables de se différencier dans n'importe quel type cellulaire provenant des 3 feuillets embryonnaires y compris les cellules germinales (Figure 4). Les ESC représentent un enjeu thérapeutique considérable puisqu'elles pourraient permettre de régénérer n'importe quel tissu de l'organisme par thérapie cellulaire.

L'induction de cette différenciation peut être initiée in-vitro dans des conditions de culture spécifiques à chaque type cellulaire (mise en suspension, facteurs de croissance particuliers...).

- La différenciation dans la voie de l'ectoderme, notamment en cellules neuronales [27] est assez bien maîtrisée, probablement parce qu'il s'agit de la voie par défaut.
- Pour le mésoderme, il est désormais possible de différencier les ESC en cardiomyocytes [28], cellules endothéliales [29] ou cellules lymphoïdes [30] par exemple.
- En revanche les résultats sont très pauvres pour l'endoderme : la différenciation en cellules pancréatiques ou hépatiques apparaît compliquée à mettre en œuvre [31].

Une meilleure compréhension des gènes utilisés par les ESC pour orienter leur différenciation permettra de mieux contrôler ce processus de différenciation in-vitro. Par exemple l'activation de la voie Wnt semble importante lors de la différenciation dans la voie de l'endoderme [32].

3. Les cellules souches adultes

Les problèmes législatifs et d'obtention des ESC humaines ainsi que les difficultés de différenciation dans certains lignages ont mis en avant l'utilisation des cellules souches adultes. Ces cellules multipotentes sont présentes dans la majorité de nos tissus à tous les âges de la vie. Les cellules souches adultes permettent le maintien de l'intégrité et de la fonction d'un organe via le remplacement des cellules différenciées continuellement détruites. Comme les ESC, les cellules souches adultes sont capables d'autorenouvellement mais en revanche elles ne peuvent se différencier que dans un nombre restreint de types cellulaires car elles sont déjà engagées dans un processus de différenciation (Figure 4).

- Les cellules souches mésenchymateuses peuvent par exemple se différencier en ostéoblastes ou en adipocytes.
- Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux érythrocytes, aux macrophages, aux plaquettes.
- Les cellules souches neurales peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales du système nerveux périphérique.

Toutefois l'utilisation de ces cellules apparaît limitée. Outre les capacités de différenciation restreintes, l'efficacité des cellules souches adultes dans les essais de thérapie cellulaire s'est révélée plus faible qu'avec les ESC, et ces cellules ne sont pas toujours très accessibles au sein de l'organisme.

4. Les iPS

Les limites de l'utilisation des ESC ou des cellules souches adultes pourraient être contournées en utilisant directement des cellules somatiques du patient qui pourraient être reprogrammées pour devenir pluripotentes d'où le terme iPS (induced pluripotent stem cell).

En effet, le processus de différenciation n'est pas un phénomène irréversible, et ceci a tout d'abord été mis en évidence par la capacité d'un oocyte à reprogrammer un noyau de cellule adulte vers un statut embryonnaire [33], puis par d'autres mécanismes de reprogrammation par transfert nucléaire, par fusion cellulaire ou par des extraits cellulaires d'ESC [34].

Plusieurs facteurs de transcription ont démontré leur capacité à maintenir la pluripotence des cellules ES : OCT3/4 [35], SOX2 [36] et NANOG [37]. Certains gènes fréquemment surexprimés dans les tumeurs peuvent également contribuer au maintien du phénotype des ESC et à leur prolifération rapide en culture : STAT3 [38], C-MYC [39], KLF4 [40] et la β -CATENIN [41]

Pour la première fois en 2006, des iPS ont été obtenus à partir de fibroblastes de souris en introduisant dans ces cellules 4 gènes : OCT3/4, SOX2, C-MYC, et KLF4 [42].

Fin 2007, 2 équipes sont parvenues à créer des cellules souches pluripotentes humaines à partir de fibroblastes en introduisant les gènes OCT4, SOX2, NANOG, et LIN28 [43] ou OCT3/4, SOX2, KLF4, et C-MYC [44].

Les iPS sont des cellules pluripotentes, dotées d'une capacité d'autorenouvellement. De plus, elles sont immunocompatibles avec le patient puisqu'elles dérivent de ses propres cellules et sont beaucoup plus accessibles que les cellules souches embryonnaires ou adultes. Les iPS ne posent pas de problèmes éthiques, toutefois la sécurité sanitaire reste à démontrer puisque ce sont des cellules génétiquement modifiées en utilisant des vecteurs viraux.

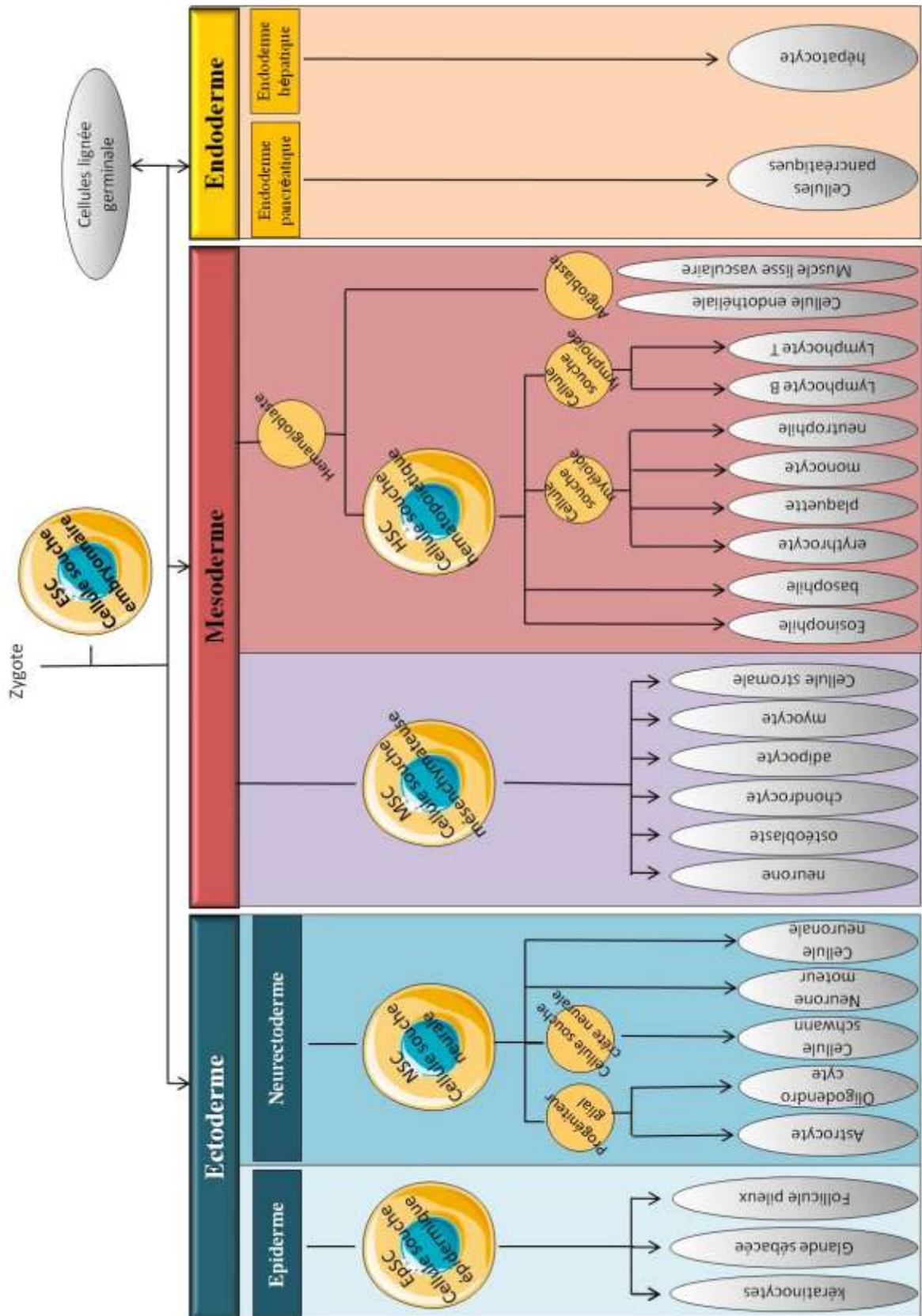


Figure 4: Différenciation des cellules souches

Les cellules souches embryonnaires peuvent donner naissance à l'intégralité des types cellulaires de l'organisme alors que les cellules souches adultes (EpSC, NSC, MSC, HSC) ne peuvent se différencier que dans un nombre limité de types cellulaires. Adapté de <http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/osteogenesis.html>

C. Les cellules souches mésenchymateuses

1. Caractéristiques

La moelle osseuse chez l'homme adulte est composée de tissu hématopoïétique associé à un tissu de soutien, le stroma, formé de fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales, adipocytes, macrophages et d'un panel de cellules multipotentes regroupées sous le nom de MSC. La moelle osseuse contient en réalité une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques (HSC) (1 à 2 %) et de MSC (moins de 0,5%) par rapport aux cellules totales [45]{Strauer, 2003 #90} .

Les MSC sont localisées principalement dans le stroma de la moelle osseuse [46], mais on peut les retrouver au niveau du périoste, de l'endoste, du tissu musculaire [47], du tissu adipeux [48], de la membrane synoviale [49], du sang de cordon [50] et du sang périphérique [51]. Leur nombre diminue avec l'âge [52].

Ces cellules immatures sont caractérisées par :

- un potentiel d'auto-renouvellement.
- un potentiel immunorégulateur en inhibant la prolifération des lymphocytes T [53].
- une capacité de migration vers les tissus inflammés.
- l'expression de divers marqueurs membranaires (dépendant de l'espèce) qui peuvent être utilisés pour les sélectionner in-vitro [54]. Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD90 (cluster de différenciation 90 ; tyrosine kinase), CD105 (endoglin), CD29 (B1 intégrine), CD44 (récepteur acide hyaluronique), CD73, CD166, CD49 et l'absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques, érythrocytaires, plaquettaires et endothéliaux [55].
- une capacité de différenciation en plusieurs lignées cellulaires (Figure 5).
 - La différenciation dans la voie mésodermique est la voie la plus classique puisque les MSC sont originaires du mésoderme. Elle concerne la différenciation dans la voie ostéoblastique, chondrocytaire, adipocytaire [56], myocytaire et endothéliale.
 - La différenciation dans la voie ectodermique est possible puisque les MSC sont capables de se différencier en neurones [57].
 - Une différenciation dans la voie endodermique a également été décrite plus récemment avec la possibilité de former des cellules pancréatiques ou hépatiques in-vitro.

La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être cultivées ex-vivo et leur différenciation peut être induite dans des conditions de cultures particulières utilisant des facteurs de croissance, des inducteurs chimiques ou des biomatériaux. L'origine tissulaire des MSC ainsi que l'âge du donneur sont également des paramètres influençant la capacité de différenciation de ces cellules [58]. Ces propriétés en font des candidats intéressants pour diverses applications thérapeutiques et notamment pour la régénération tissulaire [59].

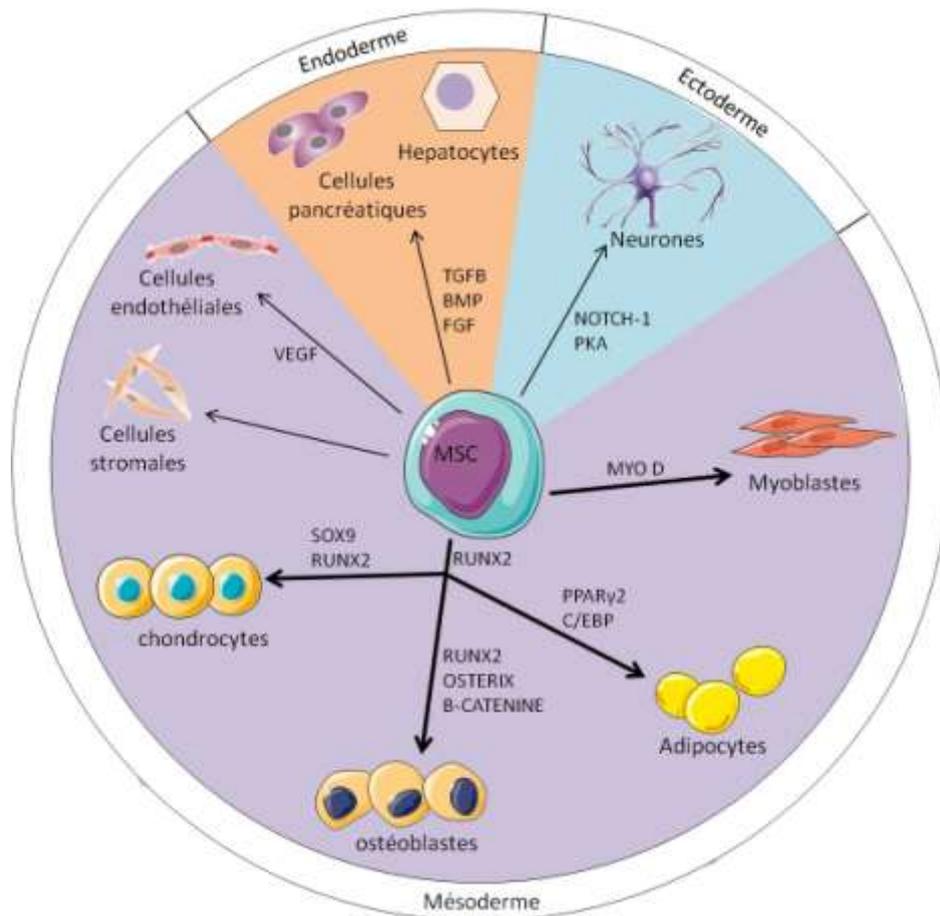


Figure 5: Différenciation des MSC

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en différents types cellulaires sous l'influence de divers facteurs. Adapté de [60][61]

2. La différenciation ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont des cellules mononucléées d'origine mésenchymateuse [62] différenciées notamment grâce aux facteurs de transcription RUNX2 (également appelé CBFA-1) et OSTERIX (Figure 6). La différenciation ostéoblastique est également sous le contrôle de multiples régulations hormonales, ainsi que de facteurs locaux autocrines/paracrines.

RUNX2 est capable de se lier à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont le *COLL1*, la *BSP*, l'*OC* et l'*OP*, induisant ainsi leur expression par les ostéoblastes matures [63]. Ce facteur de transcription est nécessaire à l'ostéof ormation in-vivo et au maintien de la fonction ostéoblastique lors de la croissance. Il est fortement exprimé dans les structures squelettiques dès le stade de condensation mésenchymateuse qui précède la formation des ébauches cartilagineuses des os longs et la première formation osseuse dans les os plats. La délétion génique de *RUNX2* chez la souris (knock-out) entraîne l'absence de tissu osseux: les maquettes des os sont présentes et de forme normale mais elles ne sont constituées que de cartilage [64]. La délétion génique restreinte aux ostéoblastes (sous la dépendance du promoteur de l'*OC*) montre un développement osseux normal

chez les souris mais leurs ostéoblastes ont une activité de dépôt de matrice réduite, qui se traduit par une formation osseuse très faible [65]. RUNX2 est donc nécessaire à la différenciation des ostéoblastes mais aussi au maintien de leur phénotype tout au long de leur vie.

OSTERIX est également impliqué dans la différenciation ostéoblastique [66] mais intervient en aval de RUNX2 en permettant la différenciation de préostéoblastes en ostéoblastes matures fonctionnels. Sa surexpression dans des ESC murines est suffisante pour orienter leur différenciation vers la lignée ostéoblastique in-vitro [67].

B-CATENINE. Des études génétiques ont révélé un rôle important de la voie canonique Wnt dans le contrôle de la formation osseuse et de la masse osseuse [68] résultant en l'accumulation de la β -CATENINE, sa translocation au noyau et l'activation de divers gènes. L'inactivation de la β -CATENINE empêche la différenciation ostéoblastique à partir des MSC, indiquant que cette protéine joue un rôle essentiel dans la différenciation des ostéoblastes in-vivo [69]. Une des cibles de la signalisation Wnt est RUNX2 : en effet le complexe β -CATENINE/TCF1 induit l'expression et l'activité de RUNX2 [70].

BMP 2 à 13 (bone morphogenetic proteins) sont des membres de la superfamille du TGF-beta jouant un rôle majeur dans cette différenciation [71] : elles sont en effet capables d'induire la formation ectopique d'os lorsqu'elles sont injectées dans un autre tissu conjonctif.

AP-1 est un complexe, constitué de dimères de facteurs de transcription de la famille JUN, FOS ou ATF, dont l'activité est très intense chez les préostéoblastes et diminue lors de la différenciation terminale en ostéoblastes. JUN D est le constituant quasi exclusif des ostéoblastes différenciés. L'expression de l'OC apparaît réprimée par AP-1 chez les progéniteurs proliférant, mais cette inhibition est levée lors de la différenciation terminale [72].

MSX2 est fortement exprimé par les précurseurs ostéoblastiques. In-vitro, la surexpression de MSX2 stimule la prolifération et retarde la différenciation des ostéoblastes, alors que son inhibition induit une différenciation précoce des ostéoblastes et stimule l'expression de l'OC [73].

DLX5, au contraire, induit la différenciation. Il est exprimé dans les ostéoblastes matures et stimule l'expression de l'OC notamment en levant l'inhibition par MSX2 [74].

Lors de leur différenciation en ostéoblastes, les MSC passent d'une morphologie fibroblastique à une morphologie plus cuboïde. Elles produisent une MEC principalement composée de COLL1 qui sera ensuite minéralisée (accumulation de calcium) pour former des nodules pouvant être mis en évidence par la coloration au rouge Alizarine ou la technique de Von Kossa. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par plusieurs vagues d'expression de gènes ostéoblastiques (Figure 6). Les gènes précoces sont l'ALP, le COLL1 et l'OP. Les gènes tardifs sont la BSP et l'OC. L'expression de ces gènes peut être suivie par des techniques de RT-PCR. L'activité enzymatique de l'ALP peut être quantifiée par des essais colorimétriques. In-vitro, le milieu de différenciation ostéogénique utilise l'association de Dexaméthasone, Bglycerophosphate, acide ascorbique et vitamine D3.

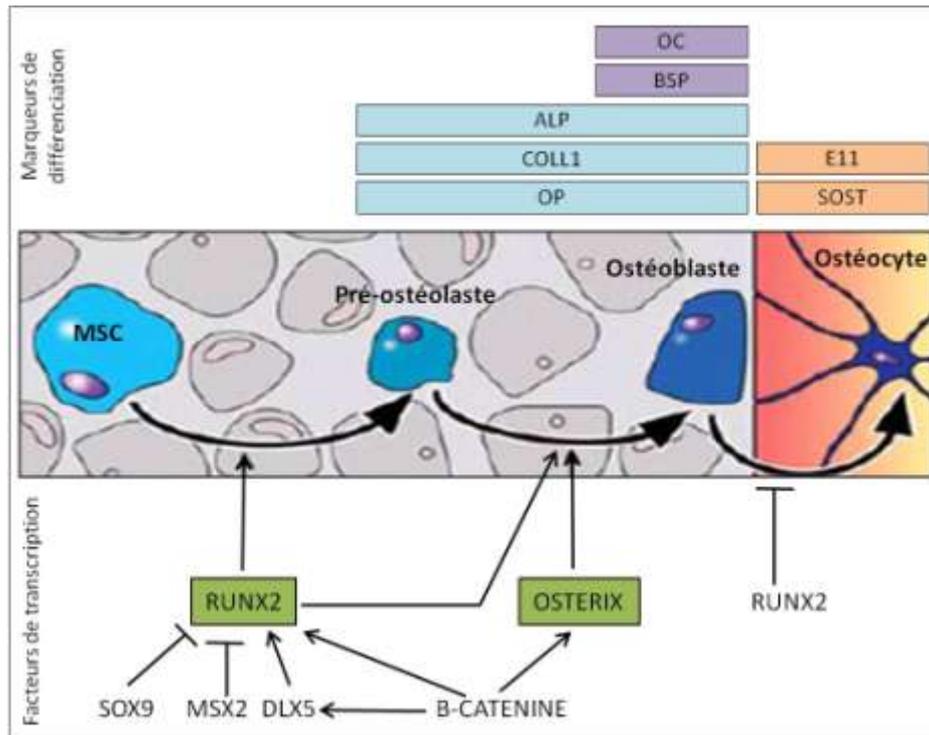


Figure 6: Différenciation ostéoblastique

Les ostéoblastes proviennent de la différenciation des MSC sous l'influence des facteurs de transcription RUNX2 et CBFA1. Au cours de leur différenciation en ostéoblaste mature puis en ostéocytes, les cellules expriment séquentiellement différents gènes ostéoblastiques. Adapté de [60][75]

3. La différenciation chondrocytaire

Les étapes de la différenciation des chondroprogéniteurs vers les chondrocytes hypertrophiques sont régulées par des facteurs de transcription et des facteurs de croissance tels que les gènes SOX (SRY-related high-mobility group box), le facteur de transcription Scleraxis (Scx), le bHLH (basix helix-loop-helix), les gènes RUNX et la superfamille du TGFbeta [76].

SOX9 a été identifié comme le facteur de transcription précoce principal dans la chondrogenèse. Il induit la différenciation dans la voie chondroblastique en contrôlant l'expression des gènes *COLL2* [77], *COLL9*, *COLL10*, *COLL11*, *ACAN* [78] et *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein). SOX9 se fixe au promoteur de ces gènes en formant des complexes de transactivation avec d'autres protéines comme SOX6 [14], CREB/p300 (cAMP response element-binding protein/E1A binding protein p300)[79] ou C-MAF (c-musculoaponeurotic fibrosarcoma)[80].

RUNX2 est un facteur également important dans la chondrogenèse et l'invasion vasculaire se produisant au niveau de la plaque de croissance. En effet, l'inactivation sélective de *RUNX2* dans les chondrocytes chez la souris entraîne une sévère réduction de la taille des membres liée à des défauts de différenciation chondrogénique, d'invasion vasculaire, de différenciation ostéoclastique et de formation d'os périostique [81].

Au cours de la différenciation, les MSC passent d'une morphologie fibroblastique à une morphologie de grosses cellules rondes étalées. Les cellules sont entourées d'une MEC abondante constituée de collagène (principalement le COLL2) ainsi que de protéoglycanes et glycosaminoglycanes de haut poids moléculaires qui peuvent être détectés par coloration au bleu alcian, bleu de toluidine ou safranine O. In-vitro, la différenciation chondrogénique est favorisée par d'importants contacts entre les cellules dans un environnement en 3 dimensions (pellet, culture en hydrogel...) et l'ajout de facteurs chondrogéniques [dexaméthasone, acide ascorbique TGF- β , BMPs, FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor)] [82][83].

Lors de leur différenciation, les cellules expriment d'abord l'ACAN et le COLL2 puis le COLL10, marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire [84]. Cependant cette théorie est controversée puisque certains chondrocytes expriment le COLL10 mais pas le COLL2 [85] et il semblerait donc que les chondrocytes hypertrophiques perdent l'expression du COLL2. Au niveau des cartilages de croissance, les chondrocytes hypertrophiques produisent le COLL10 [86] puis recrutent des ostéoblastes pour permettre une ossification endochondrale [87].

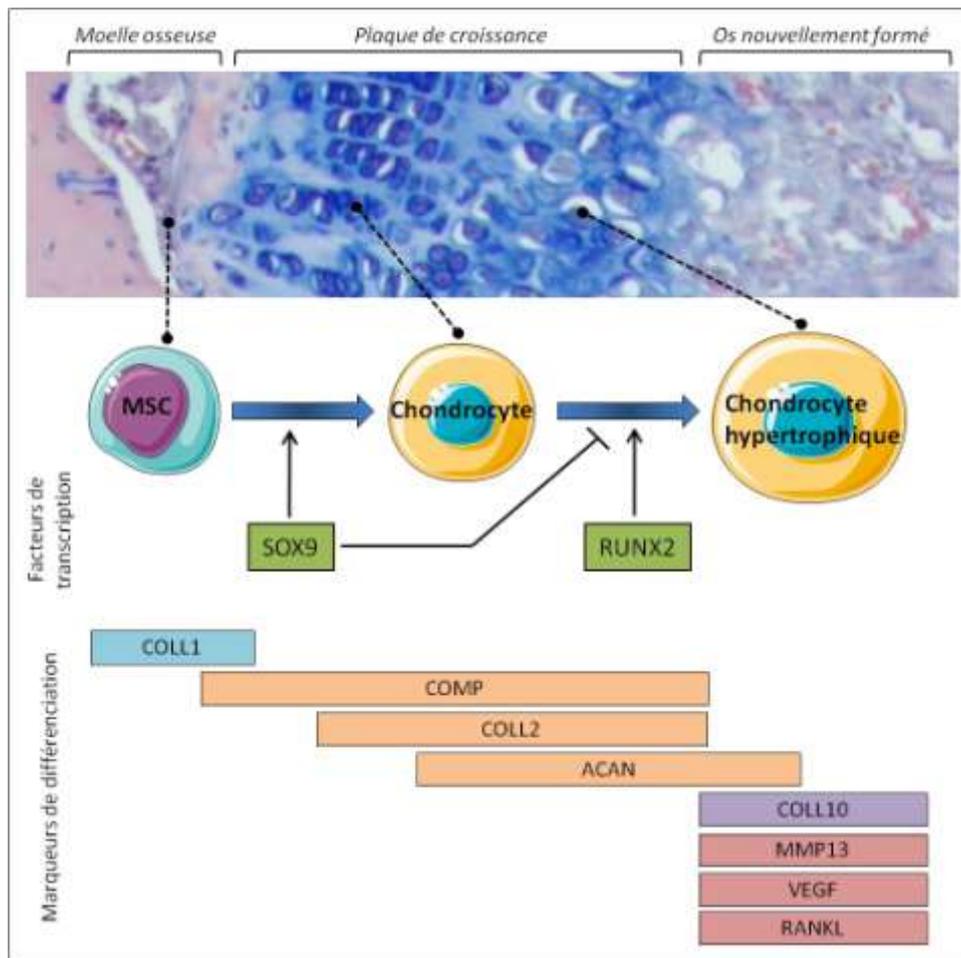


Figure 7: Différenciation chondrocytaire

Les MSC se différencient en chondrocytes puis en chondrocytes hypertrophiques sous l'influence des facteurs de transcription SOX9 et RUNX2. Au cours de cette différenciation, les cellules expriment séquentiellement différents gènes caractéristiques. Adapté de [88]. Partie supérieure : coupe histologique de plaque de croissance chez un rat Sprague Dawley de 6 semaines, coloration au bleu alcian.

4. Autres voies de différenciation des MSC

Adipocyte. L'expression du peroxytosome **PPAR γ 2** (proliferator activated receptor gamma 2) induit la différenciation adipocytaire [89] et entraîne une répression de l'expression de RUNX2, ce qui inhibe la différenciation ostéogénique [90]. C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein) est également impliqué dans cette adipogenèse [91]. In-vitro la différenciation adipocytaire peut être induite par l'association de dexaméthasone, insuline et indométacine et est vérifiée par l'apparition de gouttes lipidiques visualisées par la coloration Oil Red O. La LPL (lipoprotéine lipase) est un marqueur précoce de la différenciation adipocytaire alors que la leptine, FABP4 (fatty acid-binding protein-4) et l'adiponectine sont exprimés dans les stades plus tardifs de cette différenciation.

Myocyte. L'expression du facteur de transcription **MYOD** induit la voie myoblastique. Cette différenciation peut être engagée in-vitro par l'exposition des MSC à la 5-azacytidine [92]. In-vivo, l'injection de MSC humaines chez la souris mdx atteinte de la myopathie de Duchenne a permis au muscle de réexprimer la dystrophine [93].

Cellule endothéliale. La méthode classique de différenciation de MSC en cellule endothéliale consiste à les cultiver dans un milieu semi-solide (type Matrigel) en présence de VEGF ainsi que de FGF et PDGF (platelet-derived growth factor) [94]. Les cellules différenciées se réarrangent en structures tubulaires et sont capables d'incorporer les LDL. Dans les premiers stades de différenciation, les cellules expriment le VEGF récepteur 2 alors que les marqueurs plus tardifs incluent le facteur de Von Willebrand, le CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1) et le plasminogène [95].

Neurone. La différenciation des MSC dans la voie neuronale implique le facteur NOTCH-1 et la voie de la protéine kinase A (PKA) [96][97]. Différents milieux de culture peuvent être utilisés pour induire cette différenciation [98].

Cellule pancréatique. La différenciation de MSC de rat en cellules β -pancréatiques peut être initiée in-vitro par l'utilisation de nicotinamide et β -mercaptoéthanol ; ces cellules sont alors capables de synthétiser l'insuline et la nestine [99]. Plus récemment, des MSC de souris ont pu être différenciées dans cette voie de manière plus efficace en réalisant 3 étapes successives de différenciation : tout d'abord la différenciation vers l'endoderme (caractérisé par l'expression de Sox17, Foxa2, GATA-4 et CK-19), puis vers l'endoderme pancréatique (exprimant PDX1, Ngn2, NeuroD, PAX4 et Glut-2) et finalement vers des cellules β -pancréatiques capables d'exprimer les hormones telles que l'insuline, le glucagon et la somatostatine [100].

Hépatocyte. La différenciation des MSC humaines en hépatocytes a pu être réalisée in-vitro par l'utilisation de HGF (hepatocyte growth factor) et d'oncostatine M. Les cellules hépatocytaires sont alors caractérisées par leur morphologie cuboïde, par l'expression de marqueurs caractéristiques (α -fetoprotéine, glucose 6-phosphatase, tyrosine aminotransférase et cytokératine-18) ainsi que par la production d'albumine [101].

D. Les cellules souches hématopoïétiques

1. Généralités

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) humaines sont physiologiquement localisées dans la moelle osseuse, toutefois les HSC sont également présentes dans le sang de cordon ou encore dans la circulation sanguine après induction cytokinique.

Les principales caractéristiques des HSC sont :

- La multipotence. Les HSC sont capables de donner naissance aux cellules sanguines et immunitaires.
- La quiescence et le potentiel d'auto-renouvellement.
- La dépendance à la niche et la capacité à maintenir un statut indifférencié au sein de cette niche.
- La capacité de reconstituer le tissu hématopoïétique après transplantation.
- L'expression de différents marqueurs de surface. Les HSC expriment le CD34, le CD133 [102], le CD143 [103] et n'expriment pas CD2, CD14, CD16, CD19, CD24 et CD56 [104].

2. La différenciation ostéoclastique

Parmi les différents types cellulaires formés, les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Ces cellules peuvent alors se différencier en ostéoclaste mononucléé après chimiotactisme vers un site de résorption, puis fusionnent pour former un ostéoclaste multinucléé [6]. La différenciation des précurseurs de la lignée monocyte-macrophage colonisant la moelle osseuse en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription (*PU-1*, *C-FOS*, *NFκB*, *NFATc1*) [105] et de facteurs de croissance dont les principaux sont le M-CSF et RANKL (Figure 8).

Le M-CSF (macrophage colony stimulating factor) en se liant à son récepteur c-fms stimule la prolifération et la survie des précurseurs monocytaires. Le M-CSF est produit par l'ostéoblaste, notamment en réponse à la vitamine D3 [106].

RANKL, exprimé à la membrane des ostéoblastes et des cellules stromales ou libéré sous forme soluble dans le compartiment extracellulaire, se lie à son récepteur RANK exprimé par les cellules de la lignée ostéoclastique [107]. Ceci a pour conséquence d'activer la survie et la différenciation des progéniteurs en préostéoclastes mononucléés ainsi que leur fusion pour former des ostéoclastes matures multinucléés capables de résorber la matrice osseuse. In-vitro, la différenciation des précurseurs en ostéoclaste peut être réalisée en présence de M-CSF et RANKL [108].

L'OPG (ostéoprotégérine), synthétisée par les ostéoblastes, agit comme un récepteur leurre de RANKL inhibant ainsi la liaison du facteur pro-résorptif à son récepteur. L'OPG prévient donc la naissance et la maturation des ostéoclastes.

L'ostéoclaste mature est caractérisé par :

- la présence de phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) contenue dans ses nombreux lysosomes. TRAP est le marqueur enzymatique le plus couramment utilisé pour caractériser les ostéoclastes même si ce n'est pas un marqueur spécifique.

- l'expression d'anhydrase carbonique et de cathepsine K, qui sont des enzymes participant à l'activité de résorption.

- l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Cette molécule d'adhérence favorise la fusion des précurseurs ostéoclastiques [109] puis est exprimée au niveau des podosomes pour assurer l'étalement et la migration des ostéoclastes sur l'os [110].

- l'expression du CTR (récepteur à la calcitonine)[111]. La fixation de la calcitonine sur son récepteur induit une contraction transitoire de la membrane plasmique des cellules et bloque l'activité de résorption.

- sa capacité à résorber la matrice osseuse minéralisée (qui peut être quantifiée en réalisant des tests de résorption sur dentine).

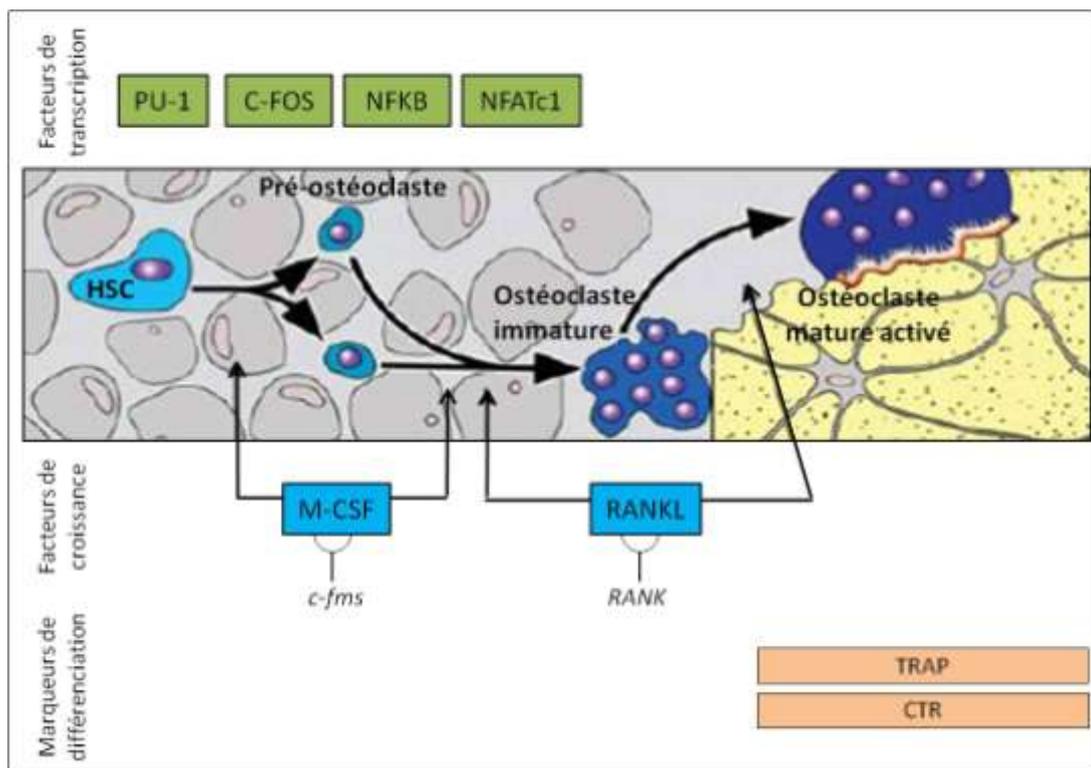


Figure 8 : Différenciation ostéoclastique

Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en ostéoclastes grâce aux facteurs de croissance M-CSF et RANKL. Les ostéoclastes matures capables de résorber l'os sont caractérisés par l'expression de TRAP et CTR. Adapté de [75] et [105].

IV. Croissance et remodelage de l'os

A. La croissance osseuse

L'os se développe toujours par le remplacement du tissu conjonctif préexistant par du tissu osseux. Cependant on distingue 4 modes d'ostéogenèse.

1. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le processus survenant au cours du développement en longueur des os longs. Dans ce cas, la formation osseuse est réalisée à partir d'une ébauche cartilagineuse (tissu cartilagineux hyalin) et aboutit essentiellement à la formation d'os spongieux : le cartilage préexistant est détruit puis remplacé par de l'os. Le développement du tissu osseux s'effectue schématiquement en 2 phases.

L'ossification primaire caractérise la formation initiale du tissu osseux chez le fœtus permettant de former l'os primaire endochondral (os immature, non lamellaire). L'ossification primaire endochondrale débute au centre de la diaphyse par un phénomène d'hypertrophie des chondrocytes accompagné par l'élargissement des chondroplastes, la synthèse de facteurs angiogéniques dont le VEGF (vascular endothelial growth factor) induisant la vascularisation locale du tissu cartilagineux et la calcification du tissu cartilagineux. Puis les chondrocytes meurent par apoptose, laissant des chondroplastes vides séparés par des travées de tissu cartilagineux calcifié et vascularisé. La vascularisation permet l'arrivée de MSC, qui vont se différencier en ostéoblastes, permettre l'ossification des travées de tissu cartilagineux et conduire à la formation d'un point d'ossification primaire au centre de la diaphyse. L'ossification primaire endochondrale se poursuit de la même manière au niveau des épiphyses pour former un point d'ossification centro-épiphysaire. Cette ossification préserve une zone de cartilage articulaire en regard de la cavité synoviale et une zone de cartilage immature (le cartilage de conjugaison) au niveau de la métaphyse, qui sera remplacé par de l'os à l'âge adulte [88] (Figure 9a).

L'ossification secondaire définit la croissance et la maturation osseuse qui s'achèvent à la fin de la puberté. Il s'agit du remplacement complet de cet os immature par un os mature dit lamellaire, et d'autre part de la croissance en longueur des os. La croissance en longueur des os longs fait intervenir le cartilage de conjugaison (localisée entre l'épiphyse cartilagineuse et l'os nouvellement formé dans la métaphyse), organisé en colonnes et couches successives (Figure 9b) :

- La zone de cartilage au repos est la zone de cartilage hyalin la plus éloignée du front d'ossification et constitue une réserve de chondrocytes. La zone de réserve est responsable de la synthèse protéique et du maintien de la structure germinale.

- La zone de cartilage sérié correspond aux chondrocytes qui prolifèrent et s'aplatissent. Dans la zone proliférative, les cellules se dupliquent rapidement.
- La zone de cartilage hypertrophié est constituée de chondrocytes très volumineux à proximité du front d'ossification. Le réel changement morphologique des chondrocytes est observé dans cette zone de transformation, divisée en couche préhypertrophique et hypertrophique. Les chondrocytes hypertrophiés permettent :
 - La calcification de la matrice cartilagineuse
 - La vascularisation du tissu cartilagineux
 - Le recrutement de MSC à partir de l'endoste, du périoste ou du tissu conjonctif associé à la moelle osseuse, puis leur différenciation ostéoblastique
- La zone dégénérative est composée de chondrocytes entrant en apoptose. Le processus de minéralisation est engagé et devient intensif suite au relargage accru de phosphatase alcaline, calcium et vésicules matricielles par les chondrocytes au stade terminal de leur différenciation.

La prolifération et la différenciation des chondrocytes est régulée par différents facteurs endocrines, paracrines et autocrines tels que des hormones de croissance, hormones thyroïdiennes, hormones sexuelles, B-CATENINE, BMP, IGF (insulin-like growth factor), leptine, oxyde nitrique, TGFbeta et vitamine D.

L'IGF-1 et les hormones sexuelles (œstrogènes / androgènes) sont les principaux facteurs hormonaux agissant sur les cartilages de conjugaison pendant toute la période de croissance. A la fin de la puberté, le stock de chondrocytes contenus dans le cartilage de conjugaison est épuisé, le cartilage de conjugaison est totalement remplacé par du tissu osseux et la taille définitive de l'individu est atteinte.

Le VEGF est un agent pro-angiogénique, synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques, permettant la neovascularisation. L'activité de chimiotactisme du VEGF favorise la migration des MSC et ostéoblastes vers la zone d'ossification.

La PTHLH (parathyroïde hormone-like hormone) ou PTHrP (para thyroïde hormone related protein) et l'IHH (Indian Hedgehog) sont 2 facteurs importants pour inhiber la différenciation des chondrocytes en prolifération de la plaque de croissance. La PTHLH est synthétisée par les cellules périchondrales et agit sur les chondrocytes en inhibant leur apoptose, en maintenant leur prolifération et en retardant leur différenciation en chondrocytes hypertrophiques [112]. Quand la prolifération est terminée, l'IHH est produit par les chondrocytes préhypertrophiques et stimule la synthèse de PTHLH via une boucle de rétrocontrôle. La PTHLH à son tour inhibe la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance ainsi que l'expression de l'IHH [113] [114].

Les FGF peuvent diminuer la prolifération des chondrocytes, augmenter la production d'IHH et accélérer la différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques. A l'inverse, les BMP augmentent la prolifération et diminuent la différenciation des chondrocytes [115].

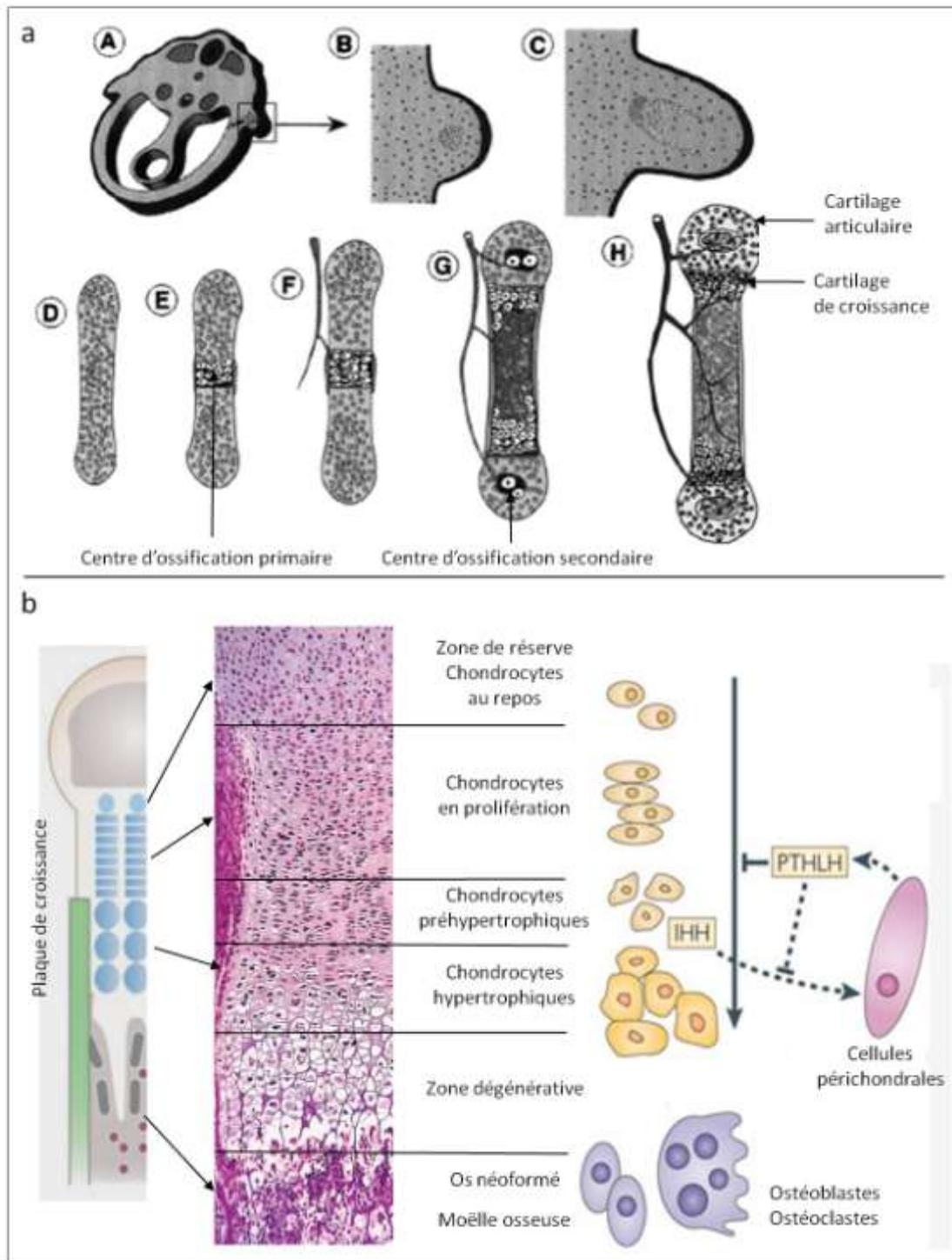


Figure 9: Ossification endochondrale

a : Représentation des étapes de l'ossification endochondrale [88]. Chez l'embryon, les MSC migrent (A), se condensent (B) et se différencient en chondrocytes (C) pour former l'ébauche d'un membre qui va s'individualiser (D). Dans la partie centrale des maquettes de cartilages, les cellules s'hypertrophient et la matrice se calcifie (E). Les vaisseaux (F) acheminent les ostéoblastes permettant l'allongement de l'os et les ostéoclastes résorbant l'os pour créer l'espace contenant la moelle osseuse hématopoïétique (G). La croissance continue alors au niveau des cartilages de croissance jusqu'à l'âge adulte (H).

b : Représentation de la plaque de croissance adapté de [115] [112] [114]. Coupe longitudinale de l'épiphyse proximale de fémur de rats de 21 jours (HE x100) montrant la différenciation progressive des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques permettant la néoformation d'os. Cette différenciation est régulée par l'expression d'IHH et PTHLH.

2. Autres types d'ossification

L'ossification membranaire a lieu lors du développement des os plats. Les MSC se différencient progressivement en fibroblastes qui déposent des fibres de collagène. Les fibres se condensent en une lame où des ostéoblastes viennent ensuite se fixer. Ceux-ci sécrètent alors de l'ostéoïde qui sera par la suite minéralisé. L'ossification progresse de proche en proche formant le réseau de travées osseuses de l'os spongieux. Il s'agit d'abord d'os fibreux qui sera résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire.

L'ossification périostique ou péri-chondrale permet la croissance en épaisseur de l'os et assure une augmentation du diamètre de la diaphyse osseuse ainsi que la formation des apophyses. Il s'agit d'une croissance endoconjonctive : les MSC du périoste se différencient en ostéoblastes, (sans intervention des chondrocytes et sans migration par voie sanguine) et l'ossification se fait par apposition de couches successives de lamelles osseuses à partir du périoste.

L'ossification haversienne est une ossification tertiaire survenant suite au remaniement d'un tissu osseux déjà élaboré pour lui permettre de mieux résister aux contraintes mécaniques : c'est la formation des ostéons. L'ossification haversienne survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs. Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire qui sont ensuite colonisés par des ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent une matrice dans laquelle ils se retrouvent emmurés, jusqu'à la formation d'étroits canaux que sont les canaux de Havers et de Volkmann. L'os haversien va entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique. Les ostéons eux-mêmes subissent le processus de remaniement. Les plus anciens sont attaqués et érodés par des ostéoclastes, tandis qu'un nouvel ostéon se met en place. Ceci joue un rôle dans le maintien de la calcémie.

B. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant renouvellement, appelé remodelage osseux, grâce à un équilibre entre les phases de production par les ostéoblastes et les phases de résorption par les ostéoclastes [3]. Le remodelage osseux peut être divisé en 5 phases (Figure 10).

Phase de quiescence. Au niveau des surfaces quiescentes, on ne trouve ni ostéoblaste, ni ostéoclaste. Les surfaces osseuses sont recouvertes par une couche ostéoïde de 1 μm d'épaisseur et des cellules bordantes au repos. Chez l'adulte, la plupart des surfaces osseuses sont à l'état quiescent.

Phase d'activation. Le long de la surface osseuse inactive d'une travée, recouverte de cellules bordantes, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes ou préostéoclastes.

Phase de résorption. Les surfaces osseuses en phase de résorption présentent de petites zones concaves, les lacunes de Howship, sur lesquelles se trouvent des ostéoclastes différenciés. En plusieurs étapes, grâce à l'action de pompes à protons et la libération d'enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K, l'ostéoclaste est capable de détruire la matrice organique [11].

Phase d'inversion. Elle correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont lisser le fond de la lacune.

Phase de formation. Elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes qui comblent la lacune en produisant une matrice collagénique qui sera secondairement minéralisée.

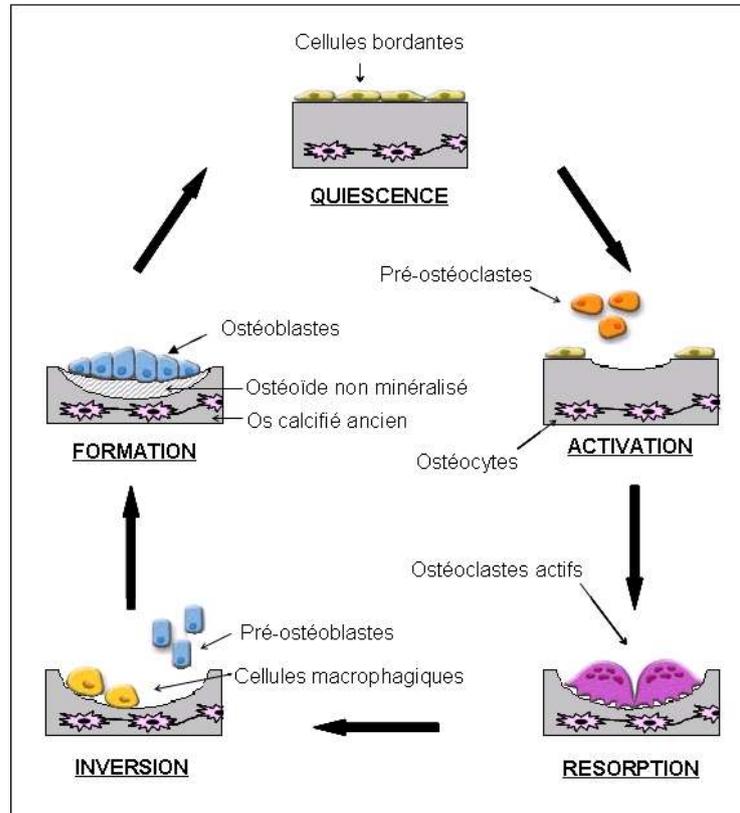


Figure 10 : Les étapes du remodelage osseux

Le renouvellement du tissu osseux est permis par la résorption du tissu préexistant par les ostéoclastes, puis par le comblement de la lacune ainsi formée par les ostéoblastes synthétisant le tissu ostéoïde qui sera secondairement minéralisé.

De manière générale l'homéostasie du tissu osseux repose sur 2 types cellulaires aux actions antagonistes : l'ostéoblaste et l'ostéoclaste. Mais ces deux types cellulaires ne sont pas totalement indépendants puisque les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes. En culture cellulaire, les ostéoclastes sont incapables de détruire l'os en l'absence d'ostéoblastes ou de leurs produits de sécrétion [116]. L'ostéoblaste est donc impliqué à la fois dans l'ostéogénèse et dans l'ostéolyse. Il sécrète des facteurs solubles régulateurs de l'ostéoclastogénèse: OPG, RANKL, M-CSF), le tumor necrosis factor (TNF) ou des interleukines (IL-1, IL-6, IL-11) [117][118].

Le système RANK/RANKL/OPG, médiateur de cette communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce un rôle fondamental dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse. RANKL est une cytokine transmembranaire pouvant être clivée par des protéases de manière à générer une forme soluble. RANKL se lie avec une forte affinité à son récepteur RANK exprimé à la surface des ostéoclastes. L'interaction RANK/RANKL est essentielle à la différenciation et à la survie des

ostéoclastes [119] par l'activation des voies de signalisation PI3K, p38, ERK, JNK, Akt ou NFκB. Chez les souris invalidées pour les gènes RANKL ou RANK, l'activation des ostéoclastes est défectueuse, entraînant une ostéopétrose. L'OPG est une glycoprotéine soluble, produite notamment par les ostéoblastes, qui agit comme un récepteur leurre de RANKL. Le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et d'OPG par les ostéoblastes permet donc le contrôle la résorption osseuse [120]. En effet, il a été montré que la délétion génique d'OPG entraînait une ostéoporose sévère caractérisée par une résorption excessive [121], alors qu'une surexpression d'OPG entraîne une ostéopétrose [122]. Différents facteurs sont capables de réguler l'homéostasie du tissu osseux en agissant sur la triade RANK/RANKL/OPG :

- RUNX2 régule directement l'expression des gènes de RANKL et de l'OPG par les ostéoblastes, constituant ainsi un lien moléculaire entre formation et résorption osseuse.
- La PTH inhibe la sécrétion de l'OPG et active l'expression de RANKL par les ostéoblastes [123]
- L'IL-1 et le TNF-α stimulent la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques [124].
- L'IL-6 et les glucocorticoïdes stimulent également l'expression de RANKL
- La vitamine D à dose physiologique, inhibe la stimulation de l'expression de RANKL par la PTH
- Le TGF-β, les œstrogènes et les BMPs augmentent l'expression de l'OPG. La chute du taux d'œstrogène lors de la ménopause favorise de ce fait le développement de l'ostéoporose.

Cette triade moléculaire contribue au bon déroulement du remodelage osseux (Figure 11). Tout dérèglement de cet équilibre entre les phases d'apposition et de résorption osseuse est susceptible d'induire l'apparition de pathologies ostéocondensantes ou ostéolytiques. Des modifications du ratio RANKL / OPG ont notamment été décrites dans des pathologies d'origine tumorale associées à un fort remodelage osseux [125].

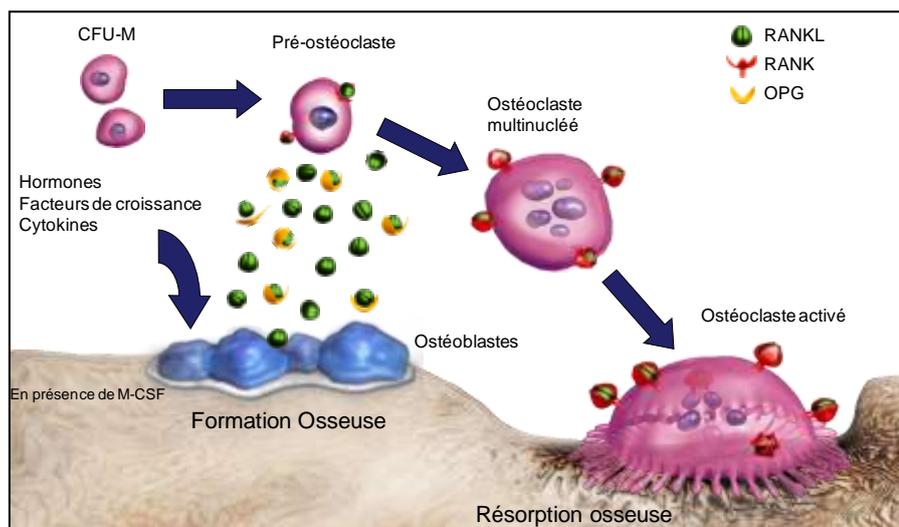


Figure 11: La triade RANK/RANKL/OPG

Implication de la triade moléculaire dans la différenciation ostéoclastique, d'après Amgen et adapté de [126]. Les ostéoblastes synthétisent RANKL qui pourra induire la différenciation ostéoclastique via le récepteur RANK présent à la surface des cellules ostéoclastique. L'OPG régule ce mécanisme en inhibant la liaison de RANKL à RANK.

2^{ème} Partie : Les tumeurs osseuses

primitives

I. Généralités

A. Processus de tumorigenèse

Un cancer est défini comme la multiplication anarchique de cellules échappant aux mécanismes normaux de prolifération. Ces cellules ont la capacité d'envahir le tissu normal, de le détruire puis de migrer à distance pour former des métastases. Les mécanismes de l'oncogenèse sont multifactoriels et dépendent de chaque type de tumeur. De manière générale, les facteurs initiaux sont intrinsèques à la cellule (dérégulations de l'apoptose, de la différenciation et de la prolifération) alors que les facteurs permettant de soutenir cette prolifération tumorale et d'induire les métastases dépendent plus de l'environnement (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales vasculaires...). L'environnement peut ainsi favoriser la croissance tumorale via l'expression de protéases extracellulaires, de facteurs de croissance, de facteurs angiogéniques ou encore de chimiokines mais également limiter le développement tumoral via la réponse immunitaire antitumorale.

1. Dérégulations initiales au sein de la cellule tumorale

Inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs (Anti-oncogènes)

Les gènes suppresseurs de tumeurs constituent des freins à la transformation tumorale. Les « caretakers » contrôlent la stabilité et l'intégrité du génome cellulaire. Les « gatekeepers » sont des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire, il s'agit principalement de *p53* et de *Rb*. Le facteur de transcription *p53*, une protéine gardienne du génome, est activé par phosphorylation. Suite à un dommage à l'ADN, *p53* est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation de la lésion avant la reprise du cycle cellulaire. Dans le cas où le dommage est trop important, *p53* peut orienter la cellule vers une mort par apoptose. Ce mécanisme de protection est aboli dans les cellules où le gène de *p53* est muté (et c'est le cas dans environ 50% des tumeurs), ce qui permet à ces cellules tumorales d'échapper au processus d'apoptose et de proliférer. Les gènes *p53* et *Rb* sont impliqués dans le processus tumoral notamment lorsque l'altération de leurs 2 allèles conduit à une perte de fonction de la protéine correspondante [127].

Activation de gènes inducteurs de tumeurs (Proto-oncogènes / Oncogènes)

La conversion d'un proto-oncogène (dans une cellule saine) en oncogène (dans une cellule tumorale) survient suite à une mutation activatrice, une amplification génique ou à un réarrangement chromosomique sur un seul des allèles et aboutit à un gain de fonction de ce gène. On peut citer par exemple les gènes *HER* (récepteurs transmembranaires à l'EGF) et *C-MYC*.

2. Conséquences pour la cellule tumorale

Perturbations du cycle cellulaire

Dans des cellules saines, des points de contrôle existent à différents niveaux du cycle permettant d'arrêter la prolifération cellulaire si besoin (Figure 12a). Le cycle cellulaire est régulé par les inhibiteurs des complexes cyclines /Cdk tels que p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p21^{WAF1} et p27^{KIP1} et par des facteurs de transcription tels que C-MYC. Lors d'une lésion de l'ADN, p53 est activé et induit p21.

Les mutations intervenant sur les anti-oncogène et proto-oncogènes aboutissent à un emballement du cycle cellulaire et une prolifération incontrôlée ne répondant plus aux signaux antiprolifératifs. Rb devient inactif soit par altération inactivatrice de son gène soit par phosphorylation excessive de Rb suite à l'amplification du gène de certaines cyclines. L'altération du cycle peut être liée également à un défaut d'activité des inhibiteurs des complexes cyclines/Cdk, ainsi une diminution d'expression des inhibiteurs p27, p15 et p16 est observée dans certains cancers [128]. Par ailleurs l'inactivation de la protéine p53 aboutit à un déficit en inhibiteur p21.

Inhibition de l'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée ne provoquant pas de réaction inflammatoire. Les effecteurs sont les caspases pouvant être activées par 2 mécanismes : la voie extrinsèque (type I) passant par des récepteurs transmembranaires, et la voie intrinsèque (type II) impliquant la mitochondrie et les facteurs proapoptotiques (Bax, Bad) et antiapoptotiques (Bcl2) (Figure 12b). La balance de ces facteurs est régulée par les facteurs de croissance et par p53.

L'échappement des cellules tumorale au mécanisme d'apoptose peut être liée à :

- Une signalisation excessive par les facteurs de croissance et de survie
- Une inactivation de la protéine p53
- Un déséquilibre de la balance des facteurs pro- et anti-apoptotiques en faveur de la survie : la surexpression du gène de survie Bcl2 est en effet observée dans certaines tumeurs.

Inhibition de la différenciation

La prolifération et la différenciation sont 2 phénomènes évoluant en sens inverse. En effet, les cellules souches, peu différenciées, prolifèrent énormément, mais au cours de leur différenciation en un type cellulaire spécialisé, les cellules perdent leurs capacités à proliférer (Figure 12c). Les mutations citées précédemment favorisent la prolifération cellulaire au dépend de la différenciation et les tumeurs les moins différenciées semblent les plus agressives. A ce titre, les cellules souches cancéreuses (CSC) sont des cellules tumorales très peu différenciées et très agressives représentant une proportion infime de la tumeur [129]. De plus, une dédifférenciation des cellules tumorales d'origine épithéliale vers un statut mésenchymateux (EMT ; epithelial-to-mesenchymal transition) est décrite dans certaine tumeurs (cancer du sein, du poumon) et ce phénomène accroît leur agressivité et leur capacité à métastaser. Les mutations de p53 ou Rb peuvent faciliter ce mécanisme d'EMT [130].

3. Inflammation, immunité et cancer

L'inflammation et l'immunité jouent un rôle critique dans la tumorigenèse et peuvent soit favoriser le développement tumoral soit le contenir [133].

Définition des différents types d'inflammation

En cancérologie, on distingue 3 types d'inflammation.

L'inflammation initiale peut favoriser le développement et la progression tumorale. Il s'agit d'inflammation chronique préexistante liée à des facteurs environnementaux, secondaire à des pathologies autoimmunes ou induite lors d'une infection virale ou bactérienne.

Il existe un second type d'inflammation tout à fait différent, initié par les cellules tumorales ou leur environnement et qui a également un rôle protumorigène. Ce phénomène d'inflammation associée à la tumeur est lié au recrutement de leucocytes et lymphocytes, à l'expression de cytokine pro-inflammatoires et au relargage de médiateurs proinflammatoires lors de la nécrose.

Un troisième type d'inflammation correspond à celle induite lors d'une thérapie anticancéreuse entraînant une nécrose massive des cellules tumorales. Son effet est controversé car il pourrait soit favoriser le développement tumoral via le relargage de médiateurs proinflammatoires, soit favoriser la présentation des antigènes tumoraux et donc la réponse immunitaire antitumorale.

Impact de l'inflammation en fonction du stade de la tumeur

L'abondance et l'état d'activation des cellules immunitaires ainsi que l'expression de médiateurs permet d'orienter la balance entre l'effet pro ou antitumoral de la réponse inflammatoire. Dans les tumeurs bien établies, l'inflammation est clairement en faveur du développement tumoral. Pour ce qui est des premiers stades de la carcinogenèse, il est difficile d'établir l'impact réel de l'inflammation car l'immunité antitumorale et l'inflammation coexistent.

Les cellules immunitaires et inflammatoires

Une tumeur est en fait composée d'une grande variété de types cellulaires pouvant communiquer entre eux. Outre les cellules tumorales et les cellules du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules mésenchymateuses), on peut retrouver :

- Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée.
 - Macrophages. Les TAMs (macrophages associés à la tumeur) sont les acteurs les plus importants dans l'inflammation et le cancer et sont une source de cytokines. Ils favorisent la croissance tumorale et sont importants pour l'angiogenèse, l'invasion et la métastase. On trouve également des macrophages conventionnels, dont le rôle se rapproche de celui des cellules dendritiques.
 - Neutrophiles. Les TAN (neutrophiles associés à la tumeur) peuvent être protumoraux ou antitumoraux selon leur statut de différenciation.

- Cellules dendritiques. Ces cellules sont importantes pour la présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes T au cours de l'immunité antitumorale mais aussi pour la production cytokinique et l'immunosuppression dans les tumeurs établies.
- Cellules NK. Les cellules Natural Killer ont clairement un rôle antitumoral.
- Mastocytes. Ces cellules ont plutôt un rôle protumoral.
- Les cellules de la réponse immune adaptative.
 - Lymphocytes B. En général ils favorisent la croissance tumorale.
 - Lymphocytes T. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et les lymphocytes T helper CD4+ (incluant les Th1, Th2, Th17, Treg) infiltrant la tumeur (TILs) peuvent à la fois être promoteur ou suppresseur de tumeur. Par exemple les Treg sont protumorigènes en inhibant la réponse immunitaire antitumorale mais antitumorigènes en supprimant l'inflammation induite par la tumeur.

Production de cytokines inflammatoires

Les différentes cytokines sécrétées peuvent induire (IL-6, IL-17, IL-23) ou inhiber (IL-12, TRAIL, IFN γ) le développement tumoral en agissant sur l'immunité et l'inflammation ou en jouant directement sur la prolifération tumorale (TRAIL, FasL, TNF- α , EGFR ligands, TGF- β , IL-6).

Les macrophages M1 (induits pas l'IFN γ) expriment des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 or IL-23), des molécules du CMH et initient la réponse immunitaire antitumorale. Les macrophages M2 (induits par l'IL-4, IL-10 et IL-13) expriment des cytokines anti-inflammatoires (IL-10), et peuvent induire l'angiogenèse et le remodelage tissulaire.

4. Néangiogenèse

La survie d'une cellule nécessite qu'elle réside à proximité d'un réseau vasculaire permettant l'apport de nutriments et d'oxygène. Dans un tissu normal, l'angiogenèse est contrôlée par des intégrines (l'intégrine $\alpha v \beta 3$) et des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF, PDGF ou EGF).

L'angiogenèse est un facteur très important dans la croissance et l'expansion tumorale [134]. Pour les petites tumeurs, les apports en oxygène et nutriments peuvent être obtenus par diffusion passive à partir des vaisseaux voisins proches mais au fur et à mesure de leur croissance les tumeurs doivent recruter de nouveaux vaisseaux (néangiogenèse). Les tumeurs sont caractérisées par un déséquilibre de la balance des facteurs angiogéniques. On peut ainsi observer la surexpression de facteurs proangiogéniques ou de leurs récepteurs ou la sous expression de facteurs antiangiogéniques dans les tissus tumoraux. L'hypoxie, importante au centre des tumeurs, stimule l'expression des facteurs proangiogéniques. Les MMP, produites par les cellules tumorales ou les cellules du stroma, augmentent la biodisponibilité des facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans la matrice extracellulaire.

5. Dissémination métastatique

Détachement de la cellule tumorale de son milieu d'origine et invasion de la matrice environnante.

Cette étape est caractérisée par une perte d'adhésion des cellules tumorales et une désorganisation de la matrice. Les molécules d'adhésion, permettant des interactions cellule/cellule (cadhérines, N-CAM) ou cellule/MEC (intégrines), sont fréquemment touchées au cours de processus tumoraux. Les protéases extracellulaires, souvent surexprimées dans les tissus tumoraux, sont impliquées dans la migration et l'invasion tumorale par différents mécanismes [135]:

- dégradation de la matrice extracellulaire favorisant la migration cellulaire.
- libération de facteurs de croissance séquestrés au sein de la matrice
- clivage de molécules d'adhésion

Passage dans la circulation sanguine ou lymphatique.

Cette étape est d'autant plus facile que l'angiogenèse tumorale est importante. Le processus d'intravasation permet le passage d'une cellule tumorale du tissu vers la circulation sanguine, à travers la membrane endothéliale.

Extravasation, survie et multiplication dans un site secondaire.

Lorsqu'elle a atteint un environnement lui convenant, la cellule tumorale traverse la membrane endothéliale pour pénétrer dans un tissu secondaire où elle peut donner une cellule tumorale dormante, des micrométastases ou des métastases actives. Il existe des sites préférentiels de développement de métastases, qui dépendent de la tumeur d'origine et des organes eux-mêmes. Différentes hypothèses permettent d'expliquer la tissu-spécificité des métastases :

L'hypothèse mécanique considère que l'arrêt de cellules tumorales dans un site secondaire dépend du trajet emprunté par ces cellules et des contraintes mécaniques telles que la taille des capillaires.

L'hypothèse du seed and soil de Paget considère que les cellules tumorales ne peuvent se développer que dans un site secondaire contenant les facteurs de croissance, molécules d'adhésion... adéquats. Cette hypothèse sera explicitée plus précisément dans une partie suivante.

L'hypothèse des chimiokines indique que ces molécules, spécifiquement produites au niveau de certains sites, y attirent les cellules tumorales [136]. Par exemple les cellules de cancer du sein expriment le récepteur CXCR4, qui lie la chimiokine CXCL12 produite au niveau osseux.

La réponse immunitaire antitumorale du site secondaire peut aussi être un obstacle à la colonisation.

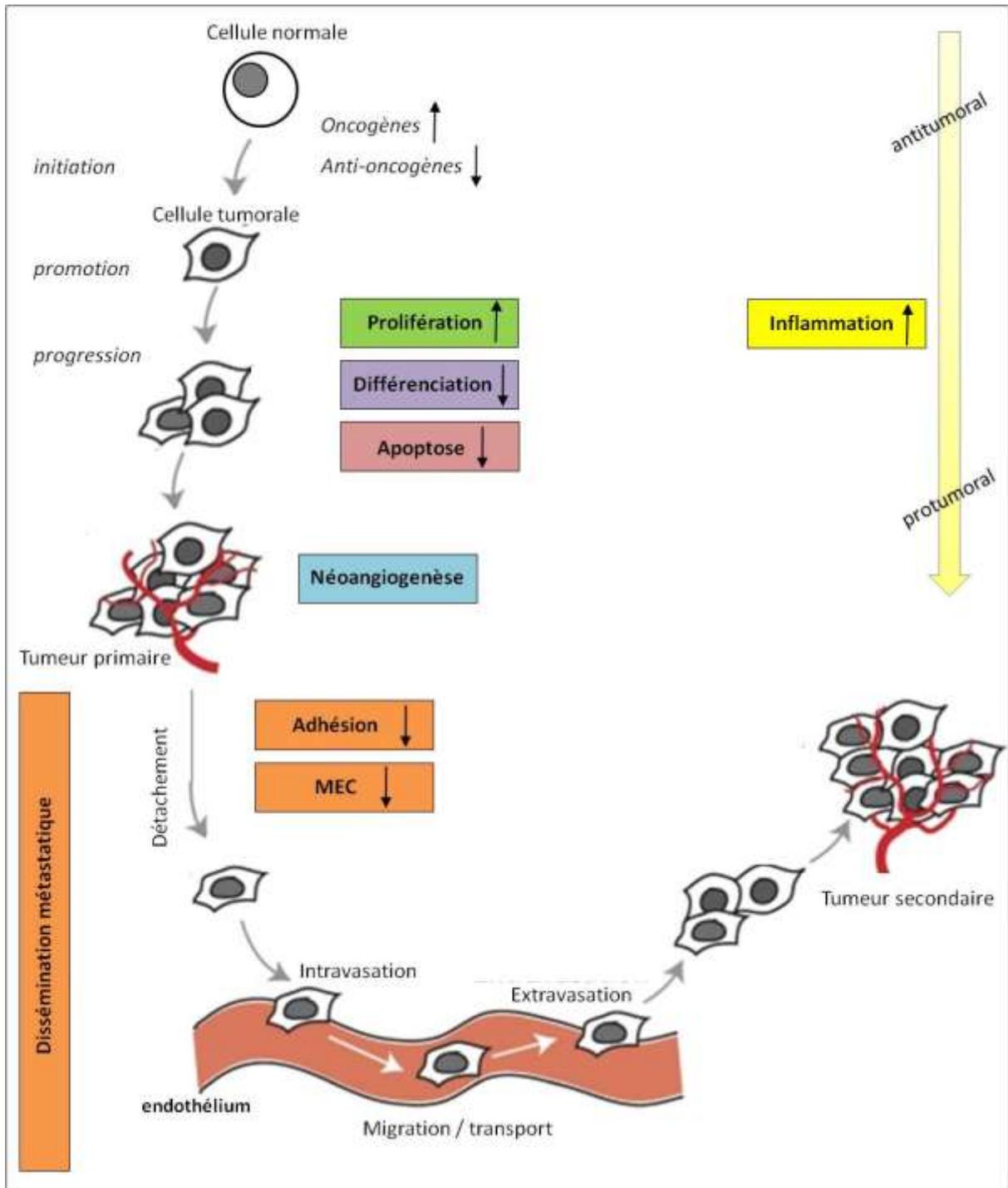


Figure 13: Les étapes du processus de tumorigenèse

Différents mécanismes sont impliqués dans le développement tumoral, que ce soit au moment de l'initiation de la tumeur, de la croissance dans un site primaire ou de la dissémination métastatique. Ces phénomènes sont favorisés par une prolifération accrue, une diminution de la différenciation, de l'apoptose et de l'adhésion. La néoangiogenèse et la dégradation de la matrice extracellulaire favorisent le détachement et la dissémination des cellules tumorales. L'inflammation peut également intervenir dans ce processus. Adapté de [137].

B. Classification des tumeurs osseuses

Comme tout tissu, le tissu osseux est susceptible de développer des pathologies pouvant avoir des origines traumatiques, immunitaires, métaboliques, infectieuses, tumorales... Les signes cliniques des tumeurs osseuses (la douleur, la tuméfaction et la fracture sur os pathologique) n'ont aucune spécificité. Il est indispensable de connaître la nature histologique de la lésion, grâce à une biopsie osseuse, de façon à entreprendre un traitement adapté. Le diagnostic peut être précisé par des examens complémentaires comme la radiographie ou l'IRM. Voici ainsi un aperçu des différentes pathologies tumorales osseuses qui pourront être envisagées dans le cadre d'un diagnostic différentiel.

Les tumeurs osseuses primitives (TOP) bénignes sont plus fréquentes que les TOP malignes. Elles sont principalement classées selon la nature du tissu produit par la tumeur avec :

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

Les tumeurs osseuses primitives (TOP) malignes représentent environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et l'adolescent. On peut citer :

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

Les 2 principaux types de TOP malignes chez l'enfant sont l'ostéosarcome et la tumeur d'Ewing qui constituent environ 90% de l'ensemble des tumeurs osseuses malignes pédiatriques [138].

Les tumeurs osseuses secondaires correspondent aux métastases osseuses. Si la majorité des cancers peuvent métastaser à l'os, certaines tumeurs sont plus ostéophiles telles que les tumeurs du sein, de la prostate, de la thyroïde, du poumon et du rein. Les métastases osseuses sont principalement composées de cellules d'origine épithéliale (carcinomes) contrairement aux tumeurs osseuses primitives (TOP) qui sont d'origine mésenchymateuse (sarcomes).

Parmi toutes ces tumeurs, certaines sont purement ostéolytiques, d'autres purement ostéocondensantes, et certaines peuvent induire des lésions mixtes. Une grande hétérogénéité histologique existe au sein même d'un type de tumeur, ce qui rend compliquée leur classification.

C. Origine cellulaire et niveaux de différenciation des TOP

Les tumeurs osseuses primitives malignes non hématopoïétiques regroupent une grande variété d'entités cellulaires qui dérivent des cellules osseuses ou de leurs précurseurs. Ce sont des tumeurs non épithéliales mésenchymateuses (sarcomes). Les 3 principaux types de TOP sont les ostéosarcomes (OS), chondrosarcomes (CS) et sarcomes d'Ewing (ES).

1. Ostéosarcomes et Chondrosarcomes

Les ostéosarcomes et les chondrosarcomes dérivent du mésoderme et il semble que ces deux tumeurs soient directement issues des MSC [139] :

- Tout comme les ostéoblastes, les OS expriment RUNX2 [132], ALP, OC et BSP.
- Tout comme les chondrocytes, les CS expriment SOX9 [140], ACAN, COLL2 et COLL10.

Les OS et CS résulteraient ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des MSC et au sein de ces tumeurs, différents degrés de différenciation peuvent être retrouvés, selon le niveau de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale (Figure 14). De manière générale, il semble apparaître une corrélation inverse entre la différenciation et l'agressivité des tumeurs.

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales qui dérivent des MSC, des précurseurs ostéoblastiques ou des ostéoblastes. Selon la différenciation de ces cellules et la nature de la matrice produite, il existe plusieurs sous-types d'ostéosarcome :

- L'ostéosarcome ostéoblastique est le plus fréquent avec des cellules tumorales de types ostéoblastique produisant une matrice ostéoïde formant un complexe trabéculaire.
- L'ostéosarcome chondroblastique est caractérisé par des amas de cellules peu différenciées produisant une matrice cartilagineuse, rappelant l'ossification endochondrale.
- L'ostéosarcome fibroblastique est formé de cellules indifférenciées de morphologie fibroblastique.

Le chondrosarcome, dérivant des cellules souches mésenchymateuses différenciées secondairement dans la voie chondrocytaire [141], existe sous différents sous-types histologiques, présentant des degrés de différenciation variés qui peuvent être mis en parallèle avec les stades de différenciation des chondrocytes dans la plaque de croissance [142][114]. Ces divers stades de différenciation peuvent être observés au sein de la masse tumorale [143].

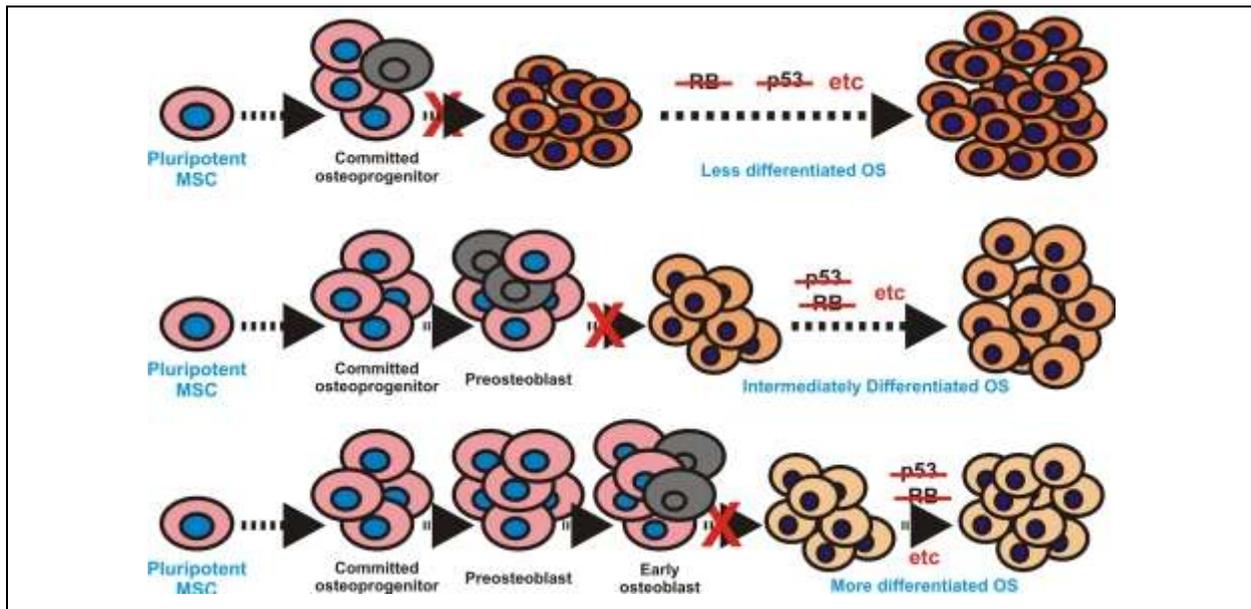


Figure 14: Genèse d'un ostéosarcome et niveaux de différenciation

Le moment où intervient la mutation reflète les divers niveaux de différenciation des ostéosarcomes [144].

2. Sarcomes d'Ewing

Contrairement aux OS et CS (présentant différents niveaux de différenciation), les ES sont des tumeurs moins hétérogènes, composées de petites cellules rondes indifférenciées avec peu de stroma. Leur origine demeure toutefois incertaine et reste une question ouverte (Figure 15).

Origine neuroectodermique ?

Les ES, caractérisés par une translocation chromosomique impliquant EWS et un gène de la famille ETS, ont été initialement inclus dans la famille des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET). Très tôt des études ont montré la différenciation possible in-vitro des ES dans la voie neuronale avec l'apparition d'un phénotype neuronal et de marqueurs caractéristiques [145].

L'implication phénotypique d'EWS-FLI1 suggère que les ES ont une origine neuroectodermique et dérivent de la crête neurale [146]. Toutefois, cette étude indique que le phénotype des ES dépend plus de l'expression de EWS-FLI1 que du type cellulaire à partir duquel ils dérivent. EWS-FLI1 est également capable d'inhiber la différenciation neuronale de cellules de neuroblastome [147].

Plus récemment, Rocchi et collaborateurs ont mis en évidence un nouveau rôle du CD99, une protéine membranaire exprimée dans la plupart des ES, en prévenant la différenciation neurale des cellules, suggérant que le blocage du CD99 pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique pour les ES [148]. De plus, dans un panel de lignées d'ES, ces auteurs ont démontré une corrélation inverse entre la différenciation neurale et la transformation oncogénique.

Origine mésodermique ?

D'un autre côté, la localisation osseuse et des expériences plus récentes basées sur l'inhibition d'EWS-FLI1, sont en faveur d'une origine mésenchymateuse des ES. Des travaux indiquent qu'EWS-FLI1 inhibe la différenciation mésenchymateuse. En particulier, l'expression forcée d'EWS-FLI1 inhibe la différenciation adipogénique et ostéogénique de cellules stromales de moelle de souris [149]. EWS-FLI1 inhibe également la différenciation myogénique dans des myoblastes [150].

Deux études indiquent que EWS-FLI1 est capable de transformer des cultures primaires de cellules stromales issues de moelle osseuse, et l'injection de ces cellules chez la souris SCID induit la formation de tumeurs ressemblant aux ES [151] [152]. Ceci indique que contrairement aux autres types cellulaires (les cellules souches embryonnaires et fibroblastes embryonnaires pour lesquels la transformation requiert d'autres événements en plus d'EWS-FLI1), les MSC sont permissives à la transformation cellulaire médiée par EWS-FLI1. Les MSC possèderaient donc les conditions appropriées pour le développement des ES.

Plus récemment, Tirode et collaborateurs ont démontré qu'après inhibition d'EWS-FLI1 dans des lignées d'ES, les cellules sont alors capables de se différencier dans les lignées adipogéniques, ostéoblastiques ou chondrocytaires [153]. Ces observations ont été corroborées par Riggi et collaborateurs qui ont montré qu'EWS-FLI1 module l'expression de miRNA145 et SOX2 pour initier la transformation des MSC en cellules souches cancéreuses de sarcome d'Ewing [154].

L'expression des marqueurs neuronaux étant strictement dépendante d'EWS-FLI1, une hypothèse consiste à dire que les sarcomes d'Ewing sont d'origine mésenchymateuse mais qu'EWS-FLI1 favorise la différenciation de ces cellules vers un phénotype neuronal. En revanche il n'est pas impossible que ces MSC proviennent de la crête neurale.

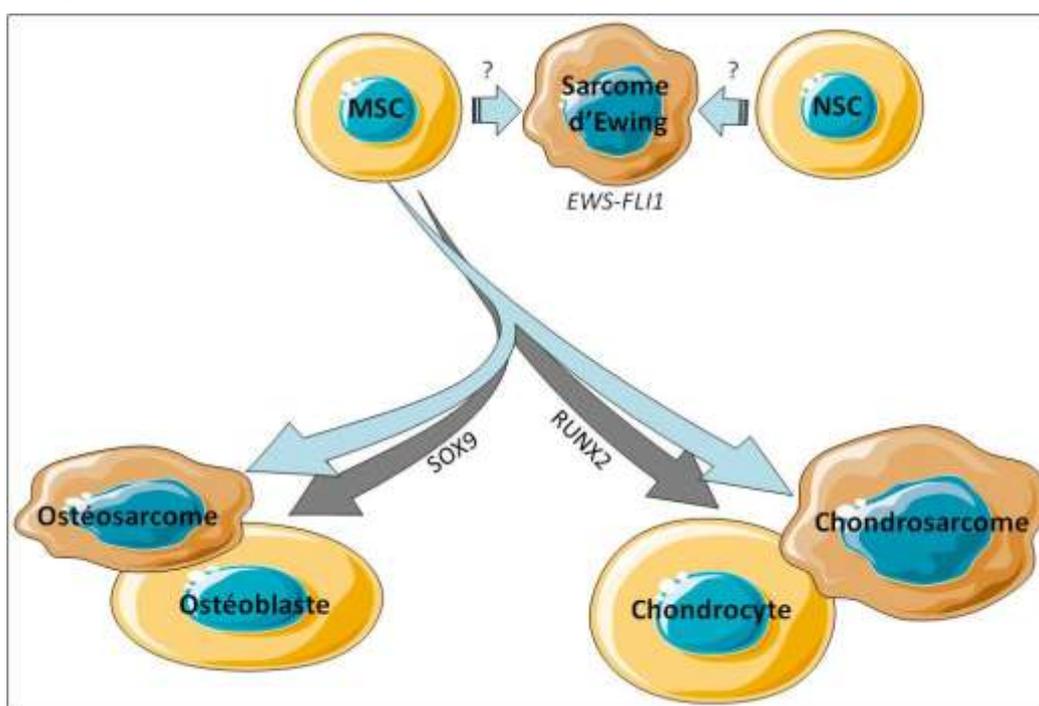


Figure 15: Origine des ostéosarcomes, chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing

II. Les ostéosarcomes

A. Epidémiologie

Avec 4,8 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 20 ans aux Etats-Unis et 3,6 nouveaux cas par an par million d'enfants de moins de 15 ans en France, l'OS est la TOP maligne la plus fréquente [138][155]. Elle représente la moitié des cas de TOP diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes).

L'OS survient généralement dans une population jeune ; 75% des OS sont diagnostiqués entre 8 et 25 ans (avec une médiane d'âge de 18 ans) ; et est 1,4 plus fréquent chez les garçons que chez les filles [156]. Les OS sont souvent diagnostiqués au décours d'une fracture pathologique. Un second pic d'incidence est observé autour de 50 ans, correspondant aux OS se développant au cours de la maladie de Paget ou aux ostéosarcomes secondaires à une radiothérapie (Figure 16).

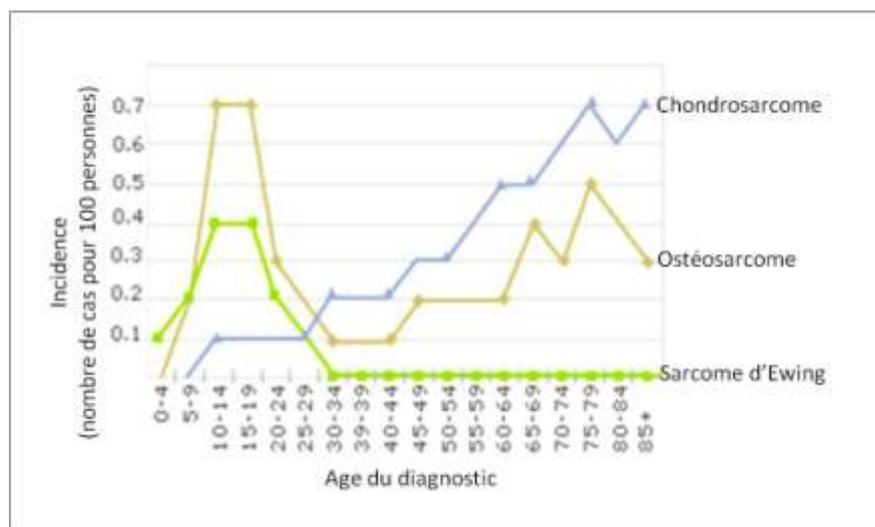


Figure 16: Taux d'incidence des tumeurs osseuses primitives
Incidence en fonction de l'âge adapté de la classification WHO des tumeurs osseuses.

B. Localisations

L'OS se développe dans 90% des cas au niveau de la métaphyse des os long. Il est principalement localisé au niveau du genou : extrémité inférieure du fémur (40 %) et extrémité supérieure du tibia (15 %), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %), sites correspondant aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Les atteintes diaphysaires et épiphysaires ainsi que celles des os plats ou des os courts (au niveau du tronc et du crane) sont beaucoup plus rares.

Le site métastatique préférentiel est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient. La présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients. Plus rarement, des métastases osseuses peuvent être retrouvées [157].

C. Caractéristiques et classification histologique

Les OS sont caractérisés par la production d'une matrice ostéoïde. Radiologiquement il s'agit d'une tumeur très agressive, avec appositions périostées, destruction de la corticale, et envahissement des parties molles. La tumeur peut être purement lytique, condensante, ou le plus souvent mixte.

Trois groupes sont identifiés selon leur localisation (Figure 17a):

- les ostéosarcomes de surface sont généralement de bon pronostic.
- les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares.
- les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux sont les plus fréquents. Ces OS regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité. Parmi ces variantes, on peut noter :
 - o la forme commune, classée par Dahlin selon le contingent cellulaire prédominant, est de loin la plus fréquente. La variante ostéoblastique représente environ 50 % des cas, la variante chondroblastique 25% et la variante fibroblastique 25 % (Figure 17b)
 - o l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire est caractérisé par un envahissement des parties molles absent ou limité et son aspect histologique bien différencié.
 - o l'ostéosarcome télangiectasique, représentant 2 à 10 % des ostéosarcomes, est caractérisé par des lésions purement lytiques et expansives à l'origine de fréquentes fractures pathologiques, et par un aspect multilobé à contenu hémorragique [158]
 - o l'ostéosarcome à petites cellules rondes a un aspect radiographique hétérogène et aspect histologique proche des sarcomes d'Ewing.

D. Etiologie

1. Croissance et ostéosarcome

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs et l'incidence élevée des OS chez les chiens de grande taille suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue de ces tumeurs. L'OS se développe plus fréquemment chez des sujets de grande taille et à l'inverse, une plus faible incidence a été mise en évidence dans les populations asiatiques et latino-américaines.

2. Pathologies prédisposant à l'ostéosarcome

Les causes exactes de survenue d'un ostéosarcome restent inconnues, cependant certaines prédispositions peuvent être impliquées dans la pathogenèse et la résistance des ostéosarcomes [159].

Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine, apparaissant habituellement avant l'âge de 5 ans, liée à une mutation sur les 2 allèles du gène *Rb*. La survenue d'un deuxième cancer (OS dans la moitié des cas) est fréquente chez ces patients pour qui les OS s'observent 100 fois plus que dans la population normale [160].

Le syndrome de Li-Fraumeni est une anomalie innée de l'un des allèles du gène *p53*, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses que carcinomateuses [161], et notamment des OS [162].

Le syndrome de Rothmund-Thomson, lié à une mutation sur le chromosome 8, est principalement caractérisé par des troubles cutanés, des anomalies osseuses congénitales et un risque accru d'OS [163].

La maladie de Paget est une pathologie chronique associant des anomalies de l'architecture de l'os et une fibrose de la moelle. Ces patients peuvent développer un OS suite à une modification pathologique du remodelage osseux [164].

Chez la souris la délétion de *p53* et *Rb* dans les ostéoblastes induit le développement d'OS [165].

3. Anomalies cytogénétiques fréquentes

De manière générale, les OS se développent de façon sporadique et sont caractérisés par des caryotypes complexes présentant de multiples réarrangements (translocations, amplifications ou délétions) mais ces mutations ne sont pas récurrentes et semblent être la conséquence du processus oncogénique plutôt que la cause de la pathologie [166]. Toutefois, des approches génomiques ont identifié un certain nombre d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire liées à la pathogenèse de l'OS [167]. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont la mutation de *p53* (chez environ 50% des patients) [168] ou de *Rb* (chez 70% des cas) [169], l'amplification de *MDM2* (un important régulateur négatif de *p53*) et de *CDK4*, la surexpression de *C-MYC* [170], d'*AP-1* [171] et de *C-KIT*, la délétion de *TWIST* (impliqué dans le développement embryonnaire)[172] ou l'inactivation de *p16^{INK4A}* [173].

Le manque de données sur les mécanismes moléculaires rend plus difficile le diagnostic ainsi que le développement d'approches thérapeutiques ciblées. Toutefois la présence de ces altérations génétiques a pu être corrélée à l'agressivité des tumeurs et à la survie des patients [170][167]. De plus, la détection de *MDM2* et *CDK4* par immunohistochimie est utilisée comme marqueur pour le diagnostic des OS de bas grade, permettant de les différencier des lésions fibreuses bénignes et des lésions fibro-osseuses dans le cas de tableaux radiologiques ou cliniques atypiques [174].

E. Diagnostic

La principale manifestation clinique de l'OS est la douleur au site tumoral, irradiant vers les articulations voisines. Une masse apparaît plus tardivement, sensible à la palpation et pouvant gêner la mobilité de l'articulation selon la taille. A un stade plus tardif, les signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles. La grande partie du diagnostic repose sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie et sur l'imagerie médicale.

- La radiographie conventionnelle révèle les lésions ostéolytiques ou ostéocondensantes (Figure 17c)
- la scintigraphie osseuse permet la visualisation de lésions multiples
- l'imagerie en coupe de type résonance magnétique (IRM) ou tomographie assistée par ordinateur (TDM) sont utiles pour déterminer la nature de la tumeur, son extension locale et la présence de métastases, notamment dans les poumons.

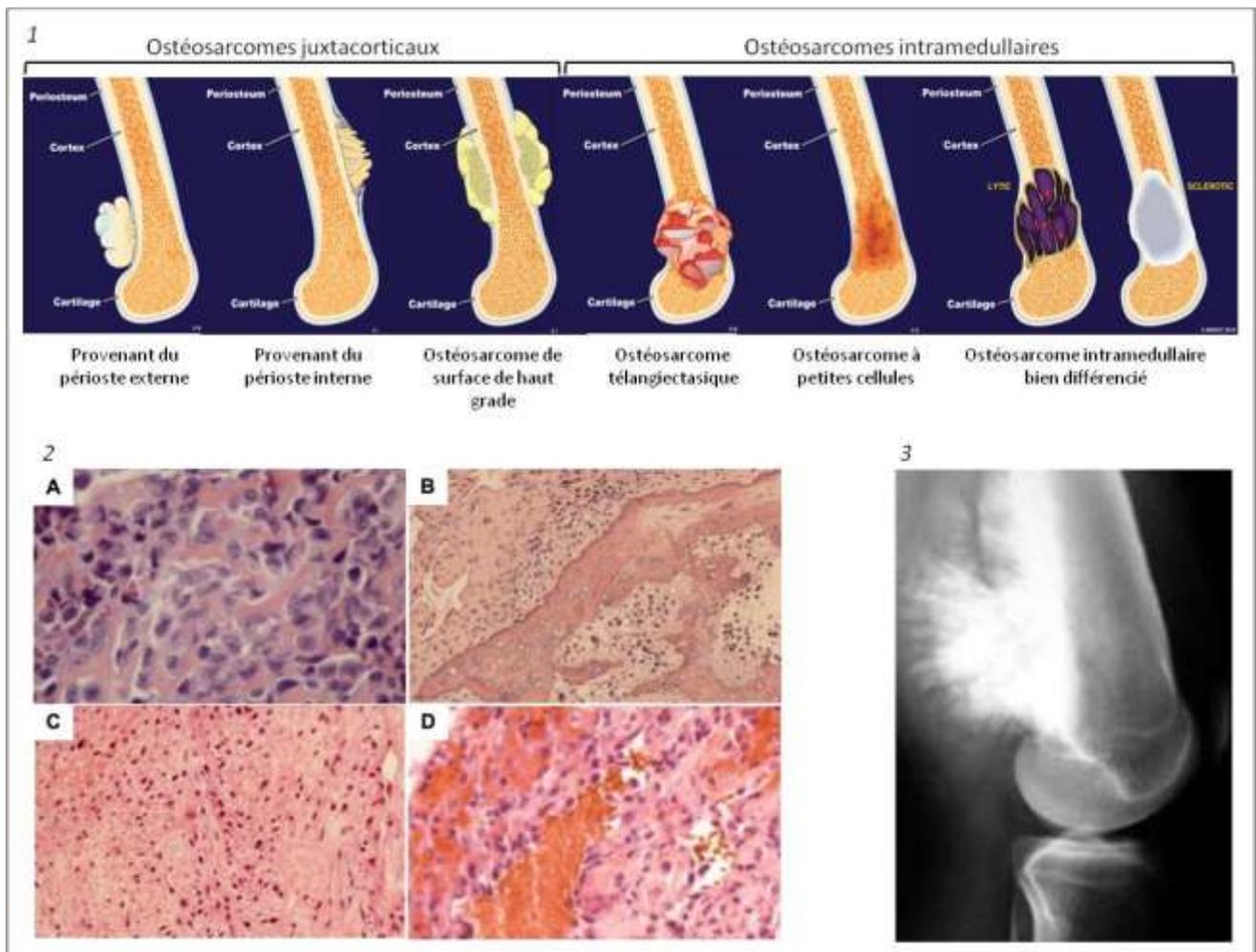


Figure 17: Caractéristiques des ostéosarcomes

1- Représentation schématique des différentes localisations d'un ostéosarcome au sein de l'os d'après [175]. 2- coupes d'ostéosarcomes ostéoblastique (a) chondroblastique (b) fibroblastique (c) et telangiectasique (d)(Original magnification: x 200) d'après [176]. 3- Radiographie d'un ostéosarcome du fémur.

III. Les chondrosarcomes

A. Epidémiologie

Les CS représentent le deuxième type de TOP le plus fréquent chez l'adulte après l'OS et sont exceptionnels chez l'enfant. Les CS sont principalement diagnostiqués entre 30 et 60 ans, avec une moyenne d'âge de 45 ans et une incidence de 1,8 nouveaux cas par million d'habitants et par an. Ces tumeurs se développent plus fréquemment chez l'homme que chez la femme avec un ratio 2/1.

B. Localisation

Les CS surviennent principalement dans les os formés grâce à l'ossification endochondrale, ce qui renforce le parallèle entre la différenciation des chondrocytes et des cellules de CS. La tumeur est surtout localisée aux ceintures ou aux segments proximaux (os du bassin, côtes, fémur et humérus) mais d'autres sites peuvent être plus rarement affectés (os du crâne). Les métastases sont rares [143].

C. Caractéristiques et classifications

Les chondrosarcomes sont des tumeurs osseuses formatrices de cartilage caractérisées par la présence de chondrocytes tumoraux au sein d'une matrice extracellulaire abondante. La tumeur se développe sous forme de lobes séparés par du stroma fibreux peu vascularisé.

Les chondrosarcomes peuvent être classés selon leur localisation au sein de l'os :

- ❖ Les chondrosarcomes centraux proviennent de la cavité médullaire de l'os puis infiltrent le cortex.
- ❖ Les chondrosarcomes périphériques sont originaires de la capsule cartilagineuse
- ❖ Les chondrosarcomes juxta-corticaux se développent initialement au sein du cortex osseux

Les chondrosarcomes peuvent également être classés selon leur niveau de différenciation:

- ❖ Les chondrosarcomes conventionnels (85%) peuvent être centraux ou périphériques avec des survies à 10 ans de 90% à 40% selon les grades histologiques [177].
- ❖ Les chondrosarcomes à cellules claires (2%) sont d'assez bon pronostic si la résection chirurgicale est complète. Ils sont caractérisés par des cellules claires au sein d'un cartilage hyalin.
- ❖ Les chondrosarcomes mésenchymateux (3%) ont des survies à 10 ans de 25%. Ces tumeurs se présentent sous forme de lésions bimorphiques constituées d'une part de cellules cartilagineuses de bas grade et d'autre part de petites cellules indifférenciées ressemblant aux ES.
- ❖ Les chondrosarcomes dédifférenciés (10%) sont les plus agressifs avec une survie à 10 ans de seulement 10% liée aux métastases à distance. Histologiquement ces tumeurs sont caractérisées par

2 composants : une tumeur cartilagineuse bien différenciée adjacente à un sarcome de haut grade non cartilagineux. L'analyse génétique de ces 2 unités suggère qu'elles ont une origine monoclonale suivie par des altérations génétiques différentes [178].

Une troisième classification, basée sur les données histologiques (composition de la matrice, présence d'atypies nucléaires, index mitotique) permet de définir 3 grades de chondrosarcomes [179].

- ❖ Grade I (CS de bas grade). La tumeur ressemble à du cartilage normal entourant des zones d'os lamellaire et présente des cellules contenant 2 noyaux. La survie à 10 ans est de 80-90%.
- ❖ Grade II (CS de grade intermédiaire). La tumeur est plus cellulaire et les cellules présentent des noyaux atypiques de grande taille. La survie à 10 ans est de 65-80%.
- ❖ Grade III (CS de haut grade). Les tumeurs sont composées de grandes cellules avec un noyau hyperchrome. L'index mitotique y est plus important. La survie à 10 ans est de 30-40%

Ces grades conditionnent le pronostic du patient ainsi que le traitement à adopter. Pour les grades I et II, le seul traitement consiste en une résection chirurgicale, alors que pour le grade III, la chirurgie devra être associée à la chimiothérapie et radiothérapie.

D. Etiologie

Tout comme les OS, les CS sont associés à différentes anomalies cytogénétiques [142]. Des mutations de *p53* et de *Rb* sont présentes dans 96% des chondrosarcomes centraux de haut grade [180]. La progression de la lésion bénigne à la tumeur maligne est toutefois beaucoup mieux décrite que pour les OS (Figure 18d).

- 1- Les tumeurs cartilagineuses évoluent du stade d'enchondrome ou ostéenchondrome (tumeurs bénignes) vers le stade de chondrosarcome (tumeur maligne). Les tumeurs bénignes résultent d'une dérégulation des composants de la voie de signalisation Hedgehog impliqués dans la plaque de croissance épiphysale normale et dans l'ossification endochondrale.
- 2- A partir de ces tumeurs bénignes, le processus oncogénique dépend de nombreux facteurs, tels que CDK4, IGF, HIF, MMP, SRC et AKT, déjà identifiés dans d'autres types de cancers [114].

Bien que ces médiateurs puissent être des cibles thérapeutiques potentielles, les tumeurs cartilagineuses apparaissent résistantes à la majorité des chimiothérapies. En revanche, ces marqueurs peuvent avoir un intérêt dans le diagnostic. Par exemple, l'immunolocalisation de la galactin-1 permet de distinguer les ostéosarcomes chondroblastiques des chondrosarcomes conventionnels [174].

E. Diagnostic

Le problème du diagnostic des tumeurs cartilagineuses est la distinction entre bénignité et malignité. Le diagnostic est basé sur des critères cliniques, radiologiques et histologiques (Figure 18a,b,c). Le CS est caractérisé comme une tumeur douloureuse, localisée aux ceintures ou aux

segments proximaux, envahissant les parties molles et dont la taille est supérieure à 5 cm. Radiologiquement, c'est une tumeur hétérogène, à contours flous, entraînant une soufflure, un épaissement cortical, une réaction périostée, et induisant une hyperfixation scintigraphique.

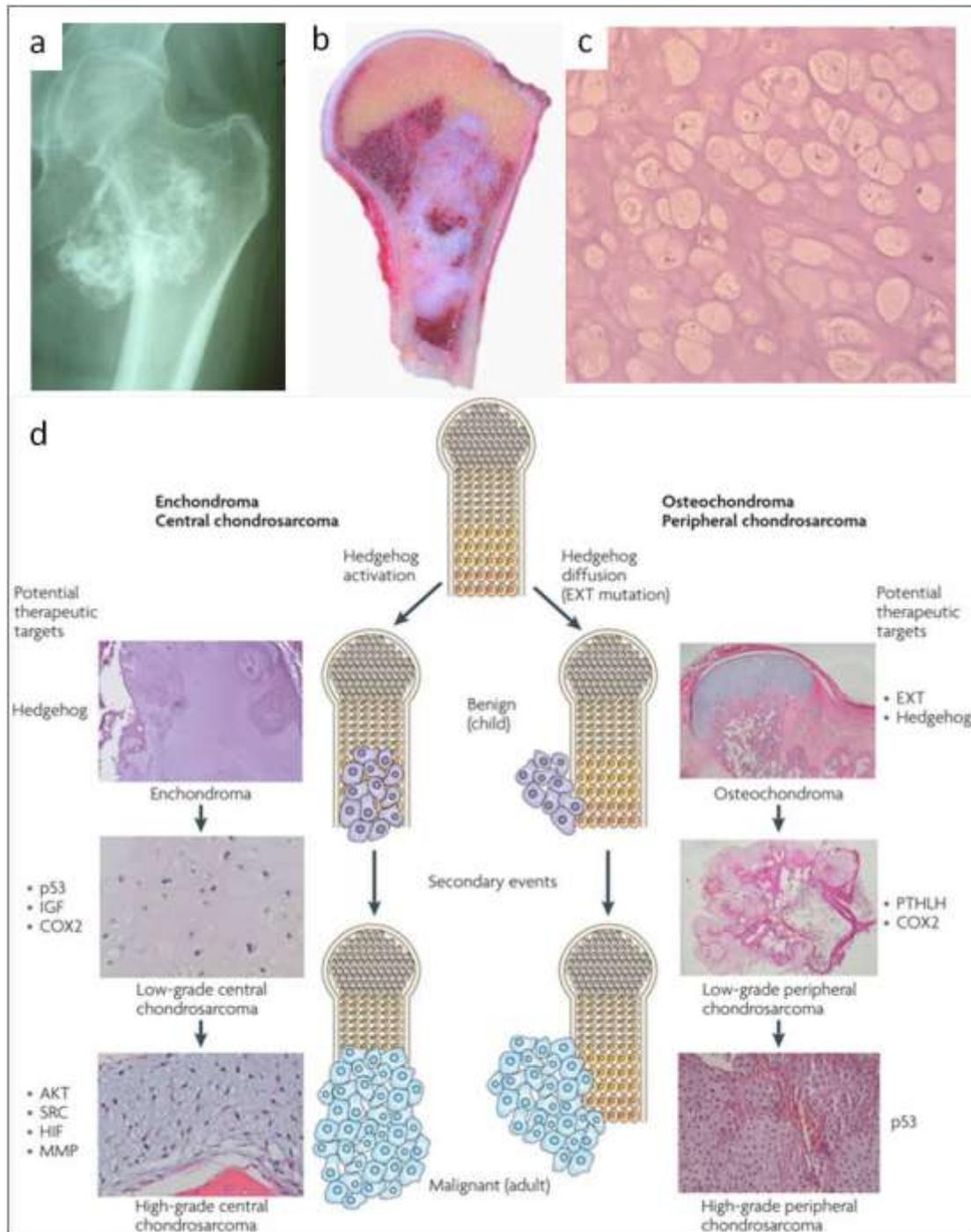


Figure 18: Caractéristiques et développement des chondrosarcomes

a-Radiographie aux rayons X d'un chondrosarcome du fémur [181]. b- Résection d'un chondrosarcome central conventionnel [177]. c- Coupe histologique d'un chondrosarcome bien différencié constitué de matrice hyaline et de chondrocytes tumoraux (HE stain, ob. 40x) [181]. d- Etapes du développement d'un chondrosarcome [114]. Les enchondromes et ostéochondromes proviennent d'une dérégulation de la différenciation au niveau de la plaque de croissance. Ces tumeurs bénignes peuvent ensuite évoluer respectivement en chondrosarcome central ou périphérique, de bas grade puis de haut grade, sous l'influence de mutations secondaires.

IV. Les sarcomes d'Ewing

A. Epidémiologie

Les ES représentent le second type de TOP chez l'enfant avec un pic d'incidence autour de 15 ans et une incidence annuelle de 2,9 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 15 ans (soit 200 nouveaux cas diagnostiqués par an aux Etats-Unis) [182]. 90% des ES sont observés chez des patients entre 5 et 25 ans dont 65 % entre 10 et 20 ans. Les garçons sont plus touchés que les filles (1,3/1), et les ES sont 10 fois plus fréquents chez la population blanche que chez la population afro-américaine [183].

B. Localisation

La moitié des ES atteint les os longs (principalement le fémur 20%, tibia 18% et humérus 9%) et la moitié est centrale (cage thoracique 16% ou pelvis 26%) (Figure 19). Contrairement aux OS la localisation osseuse est plutôt diaphysaire que métaphysaire. Les ES s'accompagnent de tumeurs des parties molles souvent volumineuses en particulier au niveau des os plats créant une réaction périostée de type « oignon multilamellaire ». Les ES totalement extra osseux, d'origine musculaire notamment, existent mais sont très rares. Le risque de métastases est très important principalement au niveau pulmonaire ou au niveau osseux [184] et est un facteur de mauvais pronostic. 15 à 25% des patients présentent déjà des métastases au moment du diagnostic.

C. Caractéristiques

Ce sarcome a initialement été identifié par James Ewing en 1921 [185] comme dérivant des cellules endothéliales et appartient à la catégorie des lésions à petites cellules rondes. La classification des tumeurs de la famille des sarcomes d'Ewing (ESFT) par des critères histologiques et anatomiques inclut les PNET (tumeur neurectodermique primaire) et les ES.

L'analyse immunohistochimique montre l'expression du CD99 dans plus de 90% des cas de sarcome d'Ewing. Le CD99 est communément associé aux cellules lymphoïdes et semble jouer un rôle dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium [186]. Selon leur degré de différenciation neurectodermique, les cellules de sarcome d'Ewing peuvent également exprimer des marqueurs neuronaux, tels que le NSE (neural-specific enolase), S-100, la synaptophysine et le CD57. Les cellules expriment également la vimentine, et dans 20% des cas la cytokératine.

Radiologiquement c'est une tumeur lytique, très agressive, mal limitée, avec destruction du cortex, appositions périostées, et atteinte des parties molles. Bien que la tumeur ne produise pas d'os, elle est condensante au scanner du fait des dépôts secondaires de calcium sur les travées osseuses.

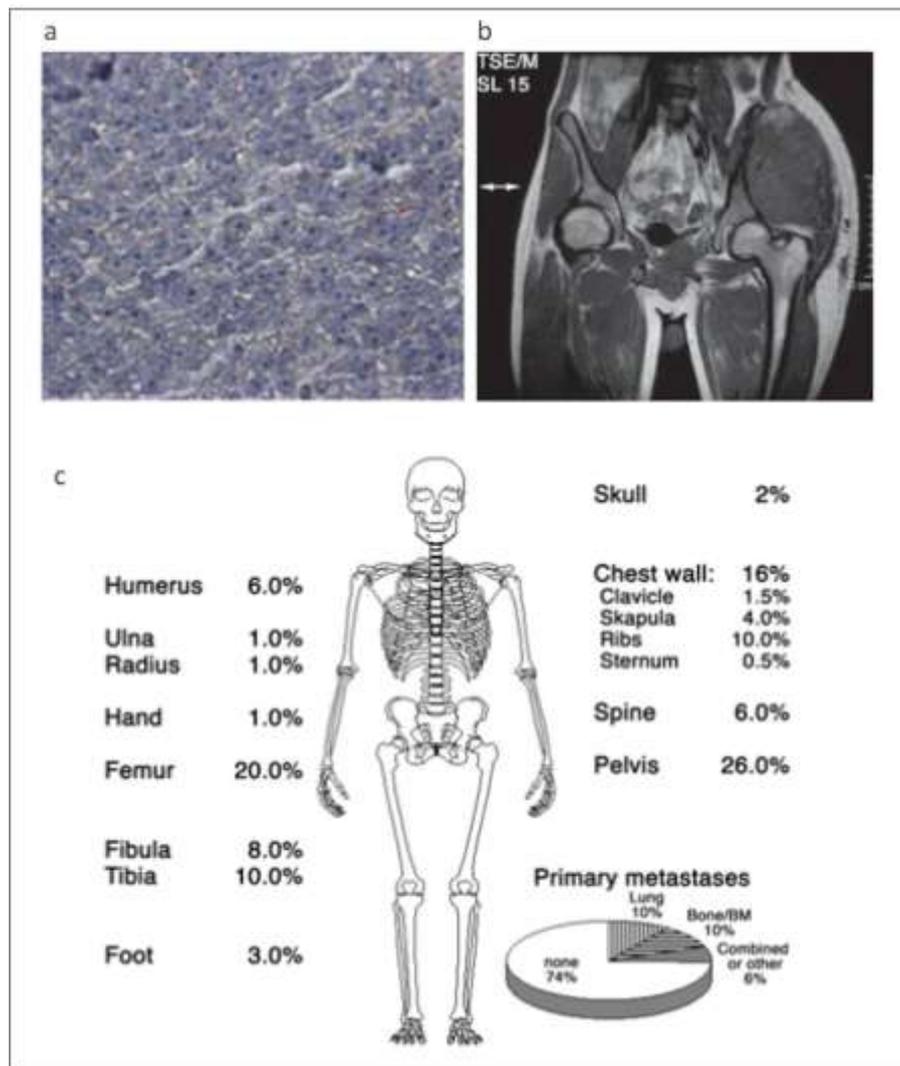


Figure 19: Caractéristiques des sarcomes d'Ewing

a- Coupe histologique d'une tumeur de sarcome d'Ewing. coloration hématoxyline (grossissement x100). b- IRM de sarcome d'Ewing du bassin. c- Fréquence de la localisation des sites primaires de sarcomes d'Ewing et de métastases. Données basées sur 1426 patients de l'essai European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies [184].

D. Etiologie

Les ES sont toujours associés à une translocation chromosomique faisant intervenir généralement le gène *EWS* et un gène de la famille *ETS*. Dans 85% des cas, le gène *ETS* est le gène *FLII*, aboutissant à la translocation $t(11;22)(q24;q12)$ qui forme le gène de fusion *EWS-FLII* [187]. Dans 10 à 15% des cas le gène *ETS* est le gène *ERG*, aboutissant à la translocation $t(21;12)(22;12)$. Mais il existe également d'autres types de translocations beaucoup plus rares n'impliquant pas un gène

ETS [188]. De manière générale les taux de survie des patients en fonction du type de translocation varient peu [189][190].

D'autres mutations aspécifiques peuvent être retrouvées : *p16* est souvent sous exprimé dans les ES et constitue un facteur d'agressivité de la tumeur [128]. Alors que *p53* est muté dans plus de 50% des tumeurs, cette mutation n'est retrouvée que dans 10% des ES, mais *EWS-FLI1* pourrait directement bloquer la voie *p53* pour induire la tumorigénicité [191]. L'effet de toutes ces délétions peut se cumuler puisque la délétion conjointe de *p53*, *p16* et *p14* définit un groupe de tumeurs très résistantes à la chimiothérapie [192][193].

E. Diagnostic

Les 2 signes principaux qui amènent le patient à consulter sont la douleur et la présence d'une masse. Ces symptômes s'accompagnent parfois d'une fracture, fièvre et perte de poids.

La radiographie, l'IRM, le scanner thoracique, le scanner osseux et la tomographie par émission de positron peuvent être utilisés pour établir le diagnostic et rechercher d'éventuelles métastases pulmonaires et osseuses [194][195].

Le diagnostic est également basé sur l'analyse histologique de la tumeur :

- ❖ La RT-PCR est la technique de choix pour rechercher le gène de fusion *EWS-FLI1*, *EWS-ERG* ou *EWS-ETV1* [196][197].
- ❖ La technique de FISH (hybridation in-situ) permet de détecter *EWS* ou *FLI1* sur des coupes de tissus et indique s'il y a eu réarrangement de ces gènes ou non [196].
- ❖ L'analyse immunohistochimique pour rechercher le marqueur *CD99* est fréquemment utilisée [198] mais d'autres marqueurs doivent également être recherchés pour établir le diagnostic différentiel des tumeurs à petites cellules rondes. Les sarcomes d'Ewing expriment le *CD99*, *NSE* et *S-100* mais pas le *CD45*.

F. EWS-FLI1 : Facteur clé du développement des ES

1. Le gène EWS

Le gène *EWS*, localisé sur le chromosome 22, est exprimé de manière ubiquitaire mais sa fonction n'est pas très bien connue [199][200]. *EWS* fait partie des gènes de la famille *TET* (dont font également partie *TLS/FUS* impliqué dans le liposarcome myxoïde et *TAFII68*) codant pour une protéine ayant un domaine commun caractéristique de 87 acides aminés impliqué dans la fixation ARN/protéine [201]. Les protéines *TET* possèdent un nombre variable de répétition arginine-glycine-

glycine permettant leur fixation à l'ARN et un domaine N-terminal riche en glutamine qui fera partie de la protéine EWS-ETS après translocation [188] (Figure 20).

EWS se fixe à l'ARN in-vitro [202] et s'associe à des facteurs de transcription ou des régulateurs de la transcription (le TFIID, l'ARN polymérase II et le CBP/p300) ou interagit avec les protéines impliquées dans l'épissage [203][204]. Les protéines TET pourraient ainsi créer un lien entre la transcription et la maturation de l'ARNm. Notamment EWS est capable de réguler la transcription et la maturation de l'ARNm codant pour la cycline D1 [205]. Les membres de la famille TET sont très conservés entre les espèces suggérant un rôle physiologique important. Ils seraient notamment impliqués dans la stabilité génomique, d'après l'étude de souris *TLS/FUS*^{-/-} [206].

Les gènes de la famille *TET* sont impliqués dans la formation d'un gène de fusion dans la moitié des sarcomes caractérisés par une translocation chromosomique simple (les ESFT, les sarcomes à cellules claires, les tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes, les chondrosarcomes myxoïdes et les liposarcomes myxoïdes).

2. Le gène *FLI1*

Le gène *FLI1*, localisé sur le chromosome 11, est un facteur de transcription. Ce gène a tout d'abord été identifié comme le site d'insertion de nombreux virus et notamment le Friend's murine leukemia virus [207]. *FLI1* est composé d'un domaine ets en 5' et d'un domaine ets en 3', séparés par un domaine FLS (*FLI-1* specific) [208][209]. Les domaines 5'ets et FLS forment le domaine ATA (amino terminal transcriptional activation) alors que le domaine 3'ets contient le domaine de fixation à l'ADN et le domaine CTA (carboxyterminal transactivation) (Figure 20).

Au cours du développement, *FLI1* est exprimé dans les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales et dans le mésenchyme dérivé de la crête neurale. Dans les tissus adultes, il est retrouvé dans les cellules hématopoïétiques, et en plus faible quantité dans le cœur, les poumons et les ovaires. L'étude des souris KO ou transgénique pour *FLI1* montre que ce gène joue un rôle physiologique important dans l'hématopoïèse et la vasculogénèse [210][211] en se fixant notamment sur le promoteur du récepteur à la trombopoïétine.

3. Translocation *EWS-FLI1*

La translocation t(11 ;22) conduit à un gène de fusion codant pour une protéine oncogénique formée par l'association du domaine N-terminal de EWS et du domaine C-terminal de *FLI1* (domaine de fixation à l'ADN). Le remplacement du domaine N-terminal natif de *FLI1* (domaine activateur de la transcription) par le domaine N-terminale d'EWS crée une protéine avec un nouveau potentiel d'activation transcriptionnelle (Figure 20).

L'analyse des séquences de EWS-*FLI1* montre qu'il existe au moins 8 formes différentes du transcrit EWS-*FLI1* selon les points de cassure de EWS et de *FLI1* et donc le nombre d'exons

appariés. EWS-FLI1 de type 1 est le variant le plus fréquent (63% des cas) et consiste en la fusion de l'exon 7 de EWS avec l'exon 6 de FLI1. Le type 1 est moins prolifératif et de meilleur pronostic que les autres [212]. EWS-FLI1 de type 2 (fusion de l'exon 7 de EWS avec l'exon 5 de FLI1) est le second variant le plus fréquent (Figure 20).

4. Mécanisme d'action d'EWS-FLI1

La translocation aboutit à l'expression par les cellules tumorales d'une protéine de fusion EWS-FLI1 qui se comporte comme un facteur de transcription aberrant. Il migre dans le noyau, se fixe à l'ADN sur des sites spécifiques et possède au niveau du domaine N-terminal EWS un activateur de la transcription beaucoup plus puissant que le domaine FLI1 originel. Les analyses moléculaires ont révélé que les protéines EWS-ETS ciblent des promoteurs contenant des sites de fixation pour ets et AP-1 en tandem et se fixent à ces éléments en interagissant avec FOS-JUN [213]. Lors de sa fixation aux promoteurs, EWS-FLI1 peut également s'associer à d'autres protéines (notamment la RNA helicase A) qui jouent le rôle de coactivateurs [214]. De récentes études ont montré qu'EWS-FLI1 se fixe aussi sur des séquences microsatellites contenant des séquences GGAA afin de réguler le mécanisme de transcription [215][216].

5. Potentiel tumorigène d'EWS-FLI1

Le rôle d'*EWS-FLI1* dans la pathogenèse des ES peut être étudié en surexprimant ce gène de fusion dans différents types cellulaires ou en inhibant son expression dans des lignées d'ES.

L'utilisation de dominant négatif FLI-1, les stratégies antisens ou les SiRNA ciblant EWS-FLI1 dans les lignées d'ES montrent une diminution de la prolifération cellulaire in-vitro et de la tumorigénicité in-vivo [217].

La seule addition du gène *EWS-FLI1* à des MSC leur donne un phénotype tumoral caractéristique des ES [152], empêche leur différenciation [149] et induit le développement de tumeur d'Ewing chez la souris après injection de ces cellules [151]. De même, l'expression d'*EWS-FLI1* dans la lignée fibroblastique NIH-3T3 augmente la prolifération de ces cellules et induit le développement de tumeurs ayant des caractéristiques histologiques proches des sarcomes d'Ewing [218]. D'autre part, l'expression d'*EWS-FLI1* dans des lignées tumorales telles que le neuroblastome ou le rhabdomyosarcome alvéolaire induit une transdifférenciation de ces cellules, qui présentent alors une morphologie de type ES et expriment des marqueurs neuronaux [147].

A l'inverse, la même approche en utilisant des MEF ou des fibroblastes primaires humains n'induit pas de transformation oncogénique de ces cellules mais déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [219]. EWS-FLI1 est donc capable d'induire des phénomènes d'oncogenèse, mais l'environnement cellulaire est un facteur crucial dans ce processus.

6. Cibles d'EWS-FLI1

EWS-FLI1 exerce son action oncogénique en modifiant l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Des études transcriptomiques après surexpression ou inhibition d'*EWS-FLI1* ou des études par ChIP ont permis de mettre en évidence un très grand nombre de gènes cibles d'EWS-FLI1 [220][221][222]. Toutefois, la régulation de ces gènes par EWS-FLI apparaît dépendante du type cellulaire et les résultats obtenus après inhibition d'EWS-FLI1 dans les ES semblent plus pertinents qu'après surexpression de l'oncogène dans d'autres types cellulaires. De plus, le type de régulation (directe ou indirecte) n'a pas toujours été mis en évidence. En effet, les mécanismes épigénétiques sont de plus en plus décrits dans différents types de cancers [223]. Notamment l'hyperméthylation de régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs induit une perte de fonction de ces gènes [224]. De plus, des modifications de la chromatine et en particulier des dérégulations d'acétylation et méthylation des histones sont impliquées dans le développement tumoral [225]. EZH2 (Enhancer of Zeste, Drosophila, Homolog 2) est capable d'inhiber l'expression de certains gènes de par son activité histone méthyl-transférase et ceci peut être prévenu par les HDAC (histone deacetylase inhibitors). EZH2 apparaît souvent surexprimé dans les pathologies tumorales avancées et de mauvais pronostic [226] et notamment dans les sarcomes d'Ewing. EWS-FLI1 est capable de se fixer au promoteur d'EZH2 et d'induire son expression [227].

Induction de la prolifération et inhibition de l'apoptose. EWS-FLI1 participe à la pathogenèse des ES de 2 manières :

- en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la transformation et la progression tumorale tels que : *MYC* [228], *ID2* [229], *CCND1*, *PDGFC* [230], *IGF1*, *NKX2-2* [231], *DAX1* ou *NROB1* [232], *PTPL1* (proteine tyrosine phosphatase 1) et *PLD2* (phospholipase D2)
- en réprimant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et l'inhibition de prolifération tels que *p21* [233], *p27* [234], *p57kip* [235], *TGF-βRII* [236] et *IGFBP-3*.

Inhibition de la différenciation. EWS-FLI1 inhibe la différenciation ostéoblastique par sa fixation à *RUNX2* [237] et inhibe également la différenciation chondrocytaire, adipocytaire et myocytaire. EWS-FLI1 maintient un statut souche mésenchymateux notamment via EZH2 [227]. EWS-FLI1 participe également au phénotype peu différencié des cellules de sarcome d'Ewing en régulant des gènes critiques du développement de la crête neurale [146].

Inhibition de la fonction d'EWS. Un autre mécanisme d'action d'EWS-FLI-1 est suspecté, mais son étude est plus difficile. Il s'agit d'un éventuel rôle dominant négatif sur EWS. EWS a été retrouvé dans de nombreux complexes, en particulier des complexes d'épissage ou des complexes transcriptionnels mais la fonction d'EWS au sein de ces différents complexes n'est pas connue.

Certaines études préliminaires semblent indiquer qu'EWS-FLI-1 pourrait perturber la fonction d'EWS au niveau de l'épissage [238][205].

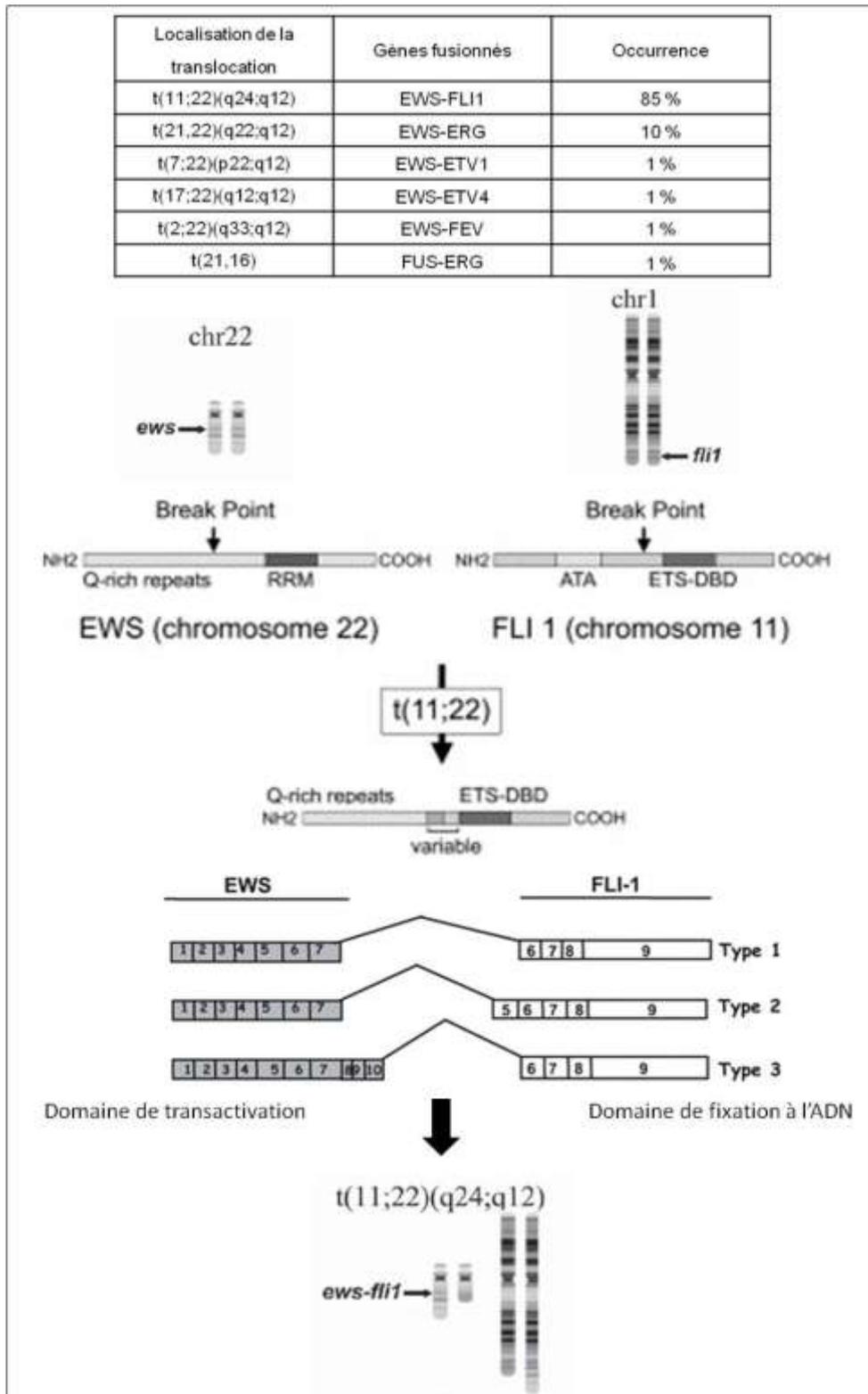


Figure 20: Translocation EWS-FLI1

Partie supérieure : tableau des translocations caractéristiques du sarcome d'Ewing et leur occurrence [239]. Partie centrale : Structure des protéines EWS et FLI1 et de la protéine de fusion EWS-FLI1 [239]. Partie inférieure : Translocations EWS-FLI1 de type 1, 2 ou 3 en fonction des exons appariés [240]

V. Rôle de la niche osseuse dans le développement des TOP

Mis à part l'oncogène *EWS-FLII* pour les ES ou les mutations non spécifiques (*p53*, *Rb*...), les causes des TOP restent inconnues. Dans la majorité des cas d'OS, les patients ne présentent aucun facteur de risque spécifique et l'étiologie est basée principalement sur la théorie du « seed and soil » proposée par Stephen Paget à la fin des années 1890.

A. Notion de niche et cellules souches cancéreuses

1. Théorie du seed and soil de Paget

Il y a plus de 100 ans, Paget a remarqué que si les tumeurs diffèrent par leur potentiel à métastaser, les organes diffèrent aussi par leur potentiel à développer des métastases, certains produisant un environnement plus fertile pour la croissance de tumeurs spécifiques que d'autres.

Paget a établi une distinction claire entre les propriétés intrinsèques de la cellule tumorale et les propriétés de l'individu en faisant une analogie entre les tumeurs et les plantes. En effet, quand une plante produit des graines, celles-ci sont transportées dans de multiples directions mais elles ne peuvent germer que si elles tombent sur une terre qui leur convient. L'étude de la « terre » est donc aussi importante que l'étude de la « graine ».

La théorie de Paget a ainsi défini le concept de niche comme un microenvironnement spécialisé favorisant l'émergence de cellules souches tumorales et fournissant tous les facteurs nécessaires à leur développement. Cette théorie s'applique aussi bien pour la tumeur primitive que pour les métastases. L'environnement de la tumeur doit être pris en considération dans une période où les recherches sur le cancer portent plus souvent sur le niveau d'expression génique, les régulations et les modifications épigénétiques des cellules tumorales.

2. La niche des cellules souches normales

Les cellules souches normales sont localisées dans un environnement distinct, la niche, régulant la souchitude, la prolifération et la résistance à l'apoptose de ces cellules. La niche a une architecture complexe composée de cellules mésenchymateuses et immunitaires, d'un réseau vasculaire, des facteurs solubles et des composants de la MEC (Figure 21). Ce concept a initialement été décrit dans le cadre du soutien de l'hématopoïèse normale par la niche ostéoblastique locale [241]. En effet, la signalisation des BMP contrôle le nombre de HSC en régulant la taille de la niche.

3. La niche des cellules souches cancéreuses

Il devient de plus en plus évident que les tumeurs sont composées de populations hétérogènes organisées hiérarchiquement dont les cellules souches cancéreuses (CSC) représentent le haut de la pyramide. Cette fraction de cellules tumorales partage de nombreuses similarités avec les cellules souches normales telles que la capacité d'autorenouvellement et les propriétés de différenciation dans de multiples lignées [129]. Les CSC sont très peu nombreuses au sein d'une tumeur mais présentent un fort potentiel tumorigène. D'un point de vue clinique, le plus grand problème posé par ces cellules est leur résistance aux traitements conventionnels qui pourrait être la cause des récurrences tumorales [242][243]. Il apparaît donc nécessaire de définir les facteurs qui soutiennent les CSC de manière à développer des thérapies plus efficaces.

La tumorigénicité n'implique pas simplement la biologie des cellules tumorales mais résulte également d'une interaction complexe entre les cellules tumorales et les cellules non-tumorales de l'environnement. Tout comme les cellules souches normales, les CSC semblent dépendre d'un environnement permissif similaire, la niche des CSC, pour maintenir leur propriété d'autorenouvellement et leur statut indifférencié [244]. De plus, en protégeant les CSC des diverses agressions génotoxiques, la niche contribue à leur résistances aux thérapies [245][246].

B. Application aux tumeurs osseuses

1. Cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse

Au niveau du tissu osseux plus spécifiquement, la croissance des cellules tumorales entraîne une dérégulation des cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes), modifie la vascularisation et altère l'immunité locale, ce qui favorise la survie, la croissance et la dissémination des cellules tumorales. Un cercle vicieux peut alors s'établir entre le microenvironnement osseux et la progression tumorale via le relargage de différents facteurs [247]. Ce cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse peut être divisé en 4 étapes (Figure 21) :

- 1- Les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs pro-ostéoclastiques [248] dont des cytokines (IL-1, IL-6, TNF α et β ...), des hormones (PTHrP), des facteurs de croissance (TGF β) et des glycosaminoglycanes, mais aussi des facteurs pro-ostéoblastiques tels les BMP, IGF et Wnts
- 2- Ces facteurs induisent une dérégulation de la balance formation/résorption osseuse et modifient de ce fait le remodelage osseux. Le développement d'un OS entraîne en effet la formation directe d'os ou de substance ostéoïde mais également une ostéolyse maligne qui résulte d'une hyperactivité ostéoclastique. L'action de ces différents facteurs sur les ostéoclastes est soit directe, soit indirecte via les ostéoblastes produisant la cytokine RANKL qui permet d'activer les ostéoclastes grâce au récepteur RANK.

- 3- Les ostéoblastes et ostéoclastes produisent alors des facteurs pro-tumoraux [249][250]. Les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse, libérant les facteurs de croissance piégés dans la MEC (TGF β et IGF-1).
- 4- Les facteurs de croissance libérés sont alors capables d'activer la prolifération tumorale.

2. Cellules souches cancéreuses et récurrences

De manière générale, le microenvironnement apparaît comme un sanctuaire protégeant les CSC mais est également capable de générer de nouvelles CSC en induisant la dédifférenciation de cellules tumorales non souches [251]. Des évidences montrent l'existence d'une niche osseuse pouvant maintenir des cellules tumorales à un stade quiescent. Ainsi, un cas de récurrence locale tardive d'OS a été mis en évidence à Nantes quelques mois après l'injection de graisse à visée esthétique [252].

3. Niche et résistance aux traitements

Deux types de facteurs peuvent permettre la survie et la résistance des cellules tumorales lors d'un traitement de chimiothérapie :

Les facteurs intrinsèques sont propres aux mutations préexistantes au sein des cellules tumorales ou se produisant en réponse au traitement. Il peut s'agir de la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments, de l'activation des mécanismes de réparation, de la modification de la cible des médicaments anticancéreux ou de la modification de l'expression des gènes.

Les facteurs extrinsèques sont des facteurs permettant la survie cellulaire ne provenant pas de la cellule tumorale elle-même mais plutôt de son environnement. Outre le rôle clé de la niche dans la croissance tumorale, le microenvironnement osseux favorise la résistance des tumeurs aux thérapies [253]. Cette résistance innée aux drogues est indépendante des modifications génétiques ou épigénétiques dues à la pression de sélection lors du traitement. Dans cette forme de résistance, les cellules tumorales sont transitoirement et réversiblement protégées de l'apoptose induite par la chimiothérapie ou les inducteurs physiologiques de mort. Cette résistance est médiée par des facteurs solubles et des mécanismes d'adhésion cellulaire [254]. La moelle osseuse produit le SDF1 (stromal cell-derived factor-1) et l'IL-6 qui favorisent le homing, la survie et la prolifération des cellules tumorales. L'IL-6 produit par le microenvironnement pourrait être une cible thérapeutique notamment pour les métastases osseuses de cancer de la prostate [255]. Le microenvironnement produit également des intégrines permettant de séquestrer les cellules tumorales au sein de cette niche protectrice.

4. La niche osseuse des chondrosarcomes

Article en Annexe 1. La niche osseuse des chondrosarcomes : un sanctuaire permettant la résistance aux chimiothérapies, favorisant la croissance tumorale et proposant de nouvelles cibles thérapeutiques.

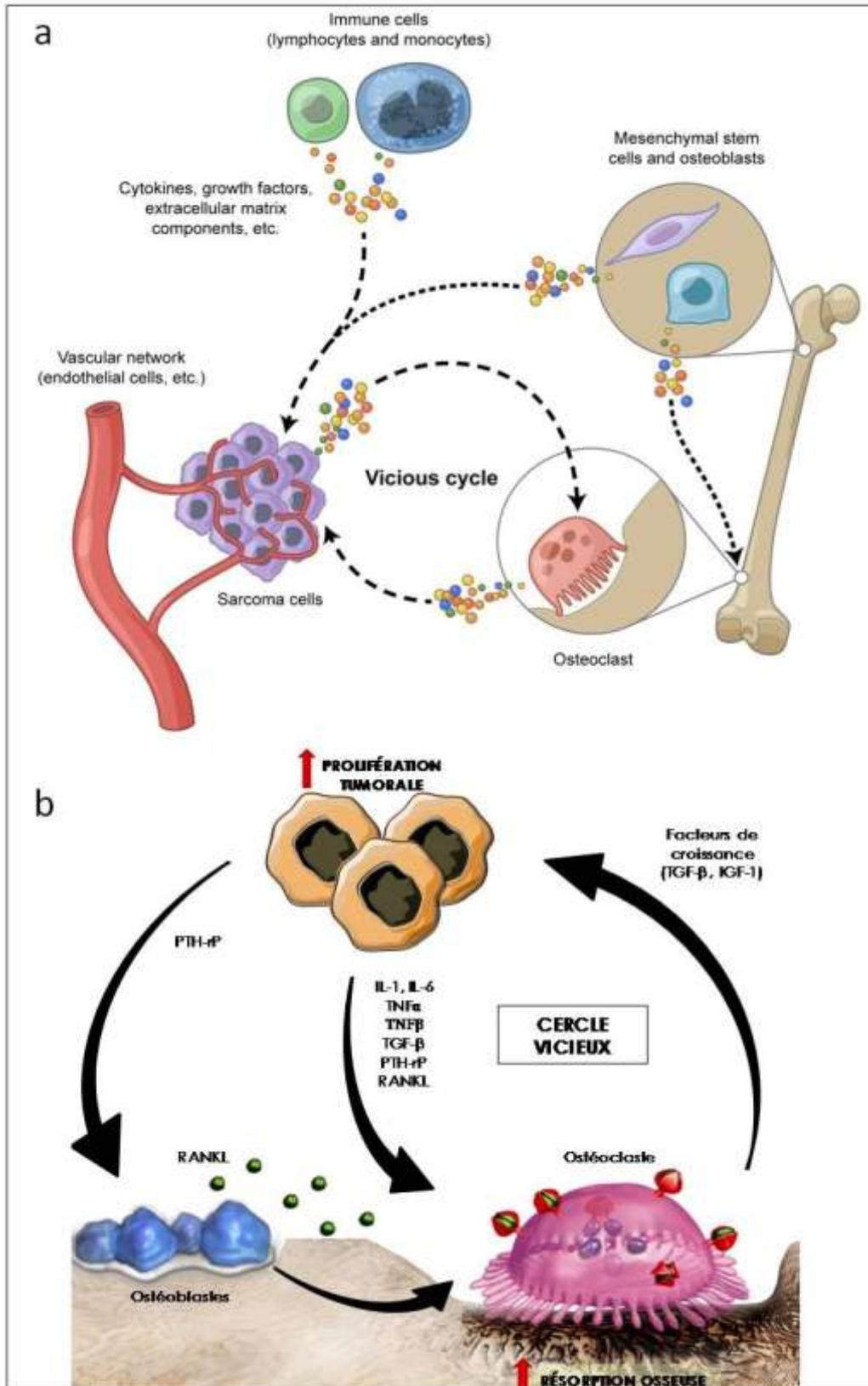


Figure 21: La niche osseuse

a- La niche osseuse est un microenvironnement spécialisé conférant tous les facteurs requis pour le développement des cellules sarcomateuses [176]. b- Détails du cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne adaptée d'après [249].

3^{ème} Partie : Thérapies anticancéreuses

I. Généralités

En tant que pharmacien et avant d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives, il m'apparaît important de replacer les protocoles actuels de prise en charge des tumeurs et les mécanismes d'actions des molécules utilisées. Cette partie est développée en **Annexe 2**.

Dans le paysage de la cancérologie, le développement des tumeurs osseuses est dépendant de 2 composantes que sont la prolifération tumorale et la résorption osseuse. Il existe donc 2 grandes approches pour traiter les tumeurs osseuses primitives en bloquant ce cercle vicieux :

- en touchant directement la cellule tumorale avec des agents anticancéreux
- en empêchant la résorption osseuse avec des agents anti-résorption osseuse tels que ceux utilisés dans le traitement de l'ostéoporose.

Ces 2 approches peuvent être associées pour améliorer le traitement des tumeurs osseuses. Cette partie est développée en **Annexe 3**.

II. Protocoles thérapeutiques actuels des TOP

A. Traitement des ostéosarcomes

Le traitement de l'OS est généralement réalisé en 3 phases : (i) 3 mois de chimiothérapie neoadjuvante, (ii) la résection chirurgicale de la tumeur puis (iii) 6 mois de chimiothérapie adjuvante. La radiothérapie se révèle quand à elle une technique peu efficace dans ce type de tumeur. Le protocole OS2006, qui est le premier essai commun pour patients adultes et pédiatriques, constitue le traitement actuel de référence des OS en France.

Chirurgie. La conservation du membre est possible chez la grande majorité des patients (> 90 %), mais l'amputation reste la seule solution en cas de tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants. La reconstruction après OS du genou se fait le plus souvent par endoprothèse.

Chimiothérapie. Les cytotoxiques les plus utilisés dans la prise en charge de l'OS en France sont le Méthotrexate (MTX), l'Etoposide (VP), l'Ifosfamide (IFO), la Doxorubicine/Adriamycine (AD) et le Cisplatine (CP) [256]. La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'OS. Au moment de l'exérèse chirurgicale, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie préopératoire est déterminée par l'appréciation de la nécrose tumorale qui quantifie le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce de résection (grade de HUVOS). Un

patient est considéré comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection. La chimiothérapie postopératoire est ensuite adaptée en fonction de la qualité de la réponse histologique : un bon répondeur recevra le même traitement qu'en préopératoire alors que le protocole sera modifié pour un mauvais répondeur.

Pronostic. Quand seul un traitement local est effectué, la dissémination métastatique apparaît dans plus de 80 % des cas. L'approche multidisciplinaire associant chimiothérapie et chirurgie a permis depuis le début des années 1980 une amélioration considérable du pronostic [257]. Avec les thérapeutiques actuelles, la survie des patients à 5 ans est de 60 à 70 % mais chute à 30 % lorsque des métastases pulmonaires sont présentes lors du diagnostic (30% des patients présentent déjà des métastases au diagnostic).

B. Traitement des chondrosarcomes

Les CS sont chimiorésistants de par:

- leur faible vascularisation, qui pose des problèmes pour la biodistribution des chimiothérapies.
- l'importante matrice cartilagineuse, qui forme une protection pour les cellules tumorales
- le faible taux de division des cellules chondrosarcomateuses, alors que les agents de chimiothérapie ciblent les cellules à division rapide
- les fréquentes altérations de *p53* et délétions de *p16* et *p14* [258].
- la surexpression du gène *ABCBI* codant pour la P-Glycoprotéine associée à des phénomènes de « multi-drug resistance » [259]

Les CS sont également réfractaires à la radiothérapie et ceci pourrait être lié à l'hypoxie locale très importante comme cela a déjà été décrit dans d'autres types de tumeurs. En effet, le faible taux d'oxygène empêche la formation et la propagation des espèces réactives de l'oxygène induites par la radiation entraînant des dommages à l'ADN [260]. L'expression de HIF-1alpha par les CS et les taux élevés de Bcl-2 peuvent contribuer à la résistance à la radiothérapie et chimiothérapie [261].

Le traitement actuel des CS est de ce fait uniquement chirurgical et consiste en une exérèse large de la tumeur. La chirurgie conservatrice est réalisée quand l'exérèse totale de la tumeur est compatible avec la sauvegarde du membre. Le problème réside dans les localisations où il est difficile de retirer la totalité de la tumeur, notamment dans la région pelvienne. L'exérèse totale est très importante car la chirurgie ne sera pas suivie de chimiothérapie adjuvante et les CS présentent un fort taux de récurrences locales, qui se traduit par le développement d'une seconde tumeur de grade plus élevé au niveau du site initial.

Bien que la chimiothérapie et la radiothérapie ne soient normalement pas utilisées, certains CS inopérables ou de grade III sont pris en charge par ce type de traitement, même si aucune évidence de leur efficacité n'est démontrée [262].

C. Traitement des sarcomes d'Ewing

Traitement. Pour les formes localisées le traitement est divisé en 3 phases :

- La chimiothérapie néoadjuvante est réalisée en cures de 14 à 17 cycles et est composée des 5 agents suivants : Vincristine, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Doxorubicine et Etoposide [263]
- La résection chirurgicale de la tumeur est réalisée si possible avec chirurgie conservatrice et reconstruction. La radiothérapie est fréquemment utilisée dans les formes inopérables ou associée à la chirurgie du fait de la radiosensibilité des ES (traitement quotidien de 6 semaines).
- La chimiothérapie postopératoire permettant d'éliminer toute cellule tumorale résiduelle est adaptée en fonction de la réponse à la chimiothérapie initiale.

Malheureusement, 15 à 25% des patients présentent déjà des métastases au moment du diagnostic. Pour ces formes métastatiques, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de 1^{ère} intention ; la chirurgie peut également être appliquée. Lorsqu'elle est possible, la résection des métastases pulmonaire améliore la survie des patients.

Des greffes de moelle peuvent également être proposées dans certains cas.

Pronostic. Grâce à ces traitements, la survie à 5 ans de ce type de tumeur est de 60 % mais chute à 10 % dans les cas de récurrence [264]. Pour les formes localisées, la survie à 5 ans est d'environ 70-75% [182][265] mais pour les formes métastatiques au diagnostic elle ne dépasse pas 15 à 30 %.

Essai clinique : Protocole EuroEwing99. Le protocole européen "EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups 1999" est organisé par 5 centres de recherche en oncologie pédiatrique dans 195 hôpitaux et propose une chimiothérapie adjuvante intense composée de 6 cures de VIDE dans le traitement des ES primaires disséminés. Les 1ers résultats intermédiaires publiés concernant les 281 patients inclus entre 1999 et 2005 montrent une survie sans rechute de 27% et une survie globale de 34% [263].

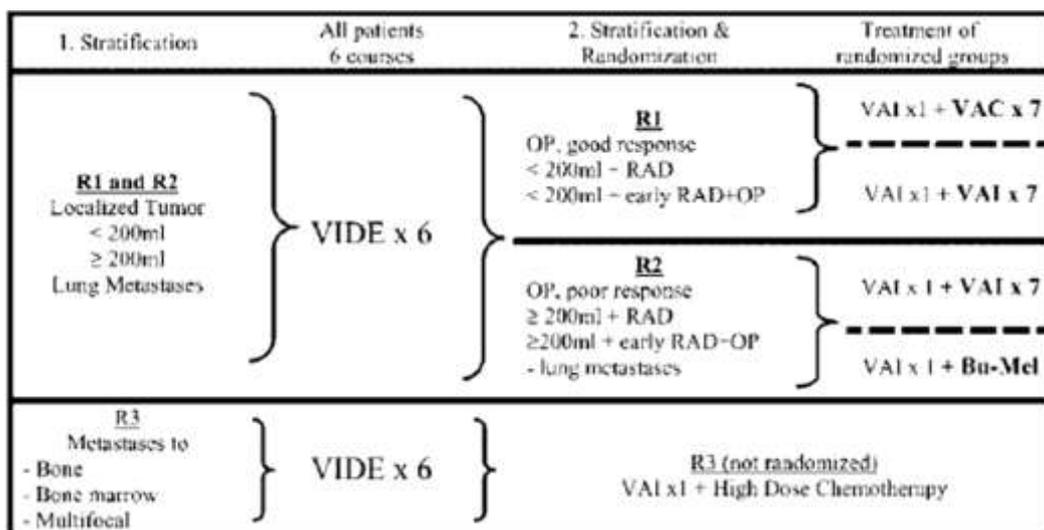


Figure 22: Protocole EURO-E.W.I.N.G.99

Schéma thérapeutique des patients inclus dans ce protocole d'après [266]. VIDE (vincristine, ifosfamide, doxorubicin, etoposide), VAC (vincristine, actinomycin D, cyclophosphamide), VAI (vincristine, actinomycin D, ifosfamide), Bu (Busulfan), Mel (Melfhalan), OP (Chirurgie) et RAD (Radiothérapie).

III. Développement de nouvelles thérapies

Face à des taux de survie parfois médiocres, le développement de nouvelles thérapies pour les TOP apparaît nécessaire. Les approches moléculaires visent à mieux comprendre le développement et la progression de ces tumeurs dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques possibles. De nombreuses cibles potentielles, incluant des cytokines, ont déjà pu être mises en évidence permettant d'induire l'apoptose, diminuer la prolifération, induire la différenciation ou prévenir l'invasion de ces tumeurs; ce chapitre fait état de quelques unes d'entre elles.

A. Nouvelles thérapies des chondrosarcomes

1. Ciblage de voies caractéristiques des chondrosarcomes

Inhibition de la voie Hedgehog : L'activation de la voie hedgehog étant un évènement précoce dans le développement des CS, le ciblage de cette voie pourrait induire la différenciation des cellules pour les rendre moins agressives. L'inhibition du hedgehog par la cyclopamine dans des xénogreffes de CS diminue le volume tumoral et la prolifération cellulaire [267].

Inhibition de la PTHrP : La PTHrP inhibe l'apoptose des chondrocytes, maintient leur prolifération et retarde leur différenciation en chondrocytes hypertrophiques. La voie de la PTHrP étant active dans les CS, l'inhibition par des anticorps ciblant la PTHrP a été réalisée dans des lignées de CS et induit leur différenciation et leur apoptose [268].

2. Ciblage de l'environnement (angiogenèse, matrice, hypoxie)

Inhibition de l'angiogenèse : Les CS, même peu vascularisés, peuvent exprimer des facteurs proangiogéniques. Le blocage de l'angiogenèse, combiné à la chimiothérapie conventionnelle a montré des résultats prometteurs dans des modèles de xénogreffe [269]. Le 2ME (methoxyoestradiol) et le PEDF (Pigment epithelium-derived factor) sont des agents antiangiogéniques capables d'induire l'apoptose et d'inhiber la prolifération de lignées de CS [270][271].

Inhibition de HIF-1 α : HIF-1 α est exprimé dans les CS de haut grade, et un SiRNA ciblant HIF-1 α diminue l'invasion de lignées de CS [272]. Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de HIF1 pourraient avoir un intérêt dans le traitement des CS.

Inhibition des MMP : Certaines protéases impliquées dans la dégradation de la matrice cartilagineuse pourraient avoir un intérêt dans le traitement de ces tumeurs. Il a notamment été montré

que les CS surexpriment la MMP1 et son inhibition par ARN antisens diminue les capacités d'invasion des cellules de CS in-vitro [273].

Interaction avec les intégrines : Les interactions des chondrocytes avec la matrice via les intégrines permettent de réguler la prolifération, la différenciation et l'invasion des cellules. Ces interactions peuvent être ciblées pour la prise en charge thérapeutique des CS. Par exemple, le PIIBNP (NH(2)-propeptide of collagen IIB) induit la mort cellulaire des CS via les intégrines V β 3 et V β 5 [274] et le CP2CP (C-propeptides of procollagen II) induit l'apoptose via l'intégrine V β 1[275].

3. Ciblage de la prolifération et induction de l'apoptose

Inhibition de l'IGF1 : La diminution de l'expression d'IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) observée dans les CS induit la signalisation de l'IGF et la survie cellulaire. Le traitement de cultures de CS par l'IGFBP3 ou des inhibiteurs de la voie IGF augmente l'apoptose de ces cellules [276]. Ceci suggère que la signalisation médiée par l'IGF est importante pour le développement des CS et que cette voie peut donc être une cible thérapeutique potentielle.

Inhibition de protéines anti-apoptotiques : Les CS expriment des taux beaucoup plus importants de protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL, Bcl-2 and XIAP) que les chondrocytes normaux [277]. Des SiRNA ciblant les membres de la famille Bcl-2 permettent d'augmenter la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie des lignées de CS exprimant le P-glycoprotéine [278]. Le PDCD5 ou TFAR19 (Programmed cell death 5 ou TF-1 cell apoptosis-related gene 19) recombinant humain sensibilise les cellules de CS au Cisplatine in-vitro et in-vivo en induisant la voie mitochondriale de l'apoptose, en augmentant le ratio Bax/Bcl-2 et en stimulant le relargage du cytochrome c [279].

Anti-métabolite : 50% des CS de haut grade présentent une délétion au niveau de gène MTAP (methylthioadenosine phosphorylase) jouant un rôle dans le recyclage de l'adénine et de la méthionine [280]. Les cellules déficientes en MTAP étant plus sensibles aux inhibiteurs de la synthèse des purines, un essai clinique est en cours pour l'utilisation du Pemetrexed dans les stades avancés de CS.

Inhibition des récepteurs à tyrosine kinase : Les récepteurs à tyrosine-kinase PDGFR et KIT étant exprimés et activés dans les CS, l'utilisation d'inhibiteurs de récepteurs à tyrosine-kinase (Imatinib) pourrait présenter un intérêt thérapeutique [281]. La voie src est également fortement active dans les CS et le Dasatinib est capable de diminuer la viabilité de lignées de CS [282].

Inhibition de la voie Akt : La voie de signalisation PI3K-Akt étant particulièrement activée dans les CS [283], des petites molécules actuellement en développement ciblant cette voie pourraient être envisagées dans le traitement des CS [284].

HDAC : Les HDAC (inhibiteurs des histones deacétylases) représentent une nouvelle classe d'agents anticancéreux entraînant une accumulation des cellules en phase sub-G₁ du cycle cellulaire et induisant la différenciation des cellules de CS in-vitro et in-vivo [285].

4. Autres voies d'étude

Inhibition des stéroïdes : L'activité de la signalisation par les œstrogènes ainsi que la présence de récepteurs aux œstrogènes a été démontrée dans des lignées de CS [286]. Cette observation laisse envisager une possible utilisation des inhibiteurs des stéroïdes sexuels (inhibiteurs de l'aromatase Anastrozole ARIMIDEX ou modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes Tamoxifène) dans le traitement des CS métastatiques ou non résecables.

Bisphosphonates : Le traitement de lignées de CS par des bisphosphonates de 3^{ème} génération augmente l'apoptose des cellules, diminue leur prolifération, réduit la production de MMP-2 et inhibe leur invasion [287][288].

Anti-CD44 : Un anticorps monoclonal ciblant le CD44, un récepteur pour le hyaluronan fortement exprimé par les chondrocytes, est capable d'induire la voie extrinsèque de l'apoptose dans la lignée SW1353 [289].

Ligands de PPAR γ : PPAR γ est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire et l'apoptose exprimé dans de nombreuses tumeurs dont les CS. Le traitement de la lignée OUMS-27 par des ligands synthétiques ou endogènes de PPAR γ induit l'apoptose en modifiant le ratio Bax/Bcl-xl et inhibe la prolifération de ces cellules en induisant p21 [290][291].

B. Nouvelles thérapies des sarcomes d'Ewing

1. Inhibition d'EWS-FLI1

Le blocage de la fonction d'EWS-FLI semble être une approche idéale pour le traitement des ES puisque son expression est nécessaire et suffisante pour le développement de ce type de tumeur. Les approches permettant de cibler EWS-FLI in-vivo sont en cours d'investigation. La technique d'ARN interférence apparaît comme une excellente approche mais son application clinique est lente à mettre en place et une étape important réside dans le développement de systèmes non viraux de transport de SiRNA tels que des nanoparticules. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'efficacité du ciblage de EWS-FLI pour inhiber la prolifération cellulaire in-vitro [292][293][217] et la croissance tumorale dans des modèles murins d'ES [294][295].

Une approche alternative est d'utiliser des agents interagissant avec la fonction ou l'expression d'EWS-FLI1. Le screening de molécule a permis d'identifier la Cytarabine (un agent pharmacologique déjà utilisé dans le traitement des leucémies) mais les tests cliniques ont révélé une importante toxicité [296]. Une récente étude a identifié la Mithramycine comme un inhibiteur d'EWS-FLI1 présentant des activités antitumorales in-vitro et in-vivo [297].

2. Inhibition de l'IGF1

Comme pour les chondrosarcomes, la voie de l'IGF-1 apparaît dérégulée dans les ES et se révèle une cible intéressante. Bien que cette voie soit différente d'EWS-FLI1, la protéine de fusion est capable de réguler la voie de l'IGF1. En effet, EWS-FLI1 réprime l'expression d'IGFBP3, favorisant des taux importants d'IGF-1 biologiquement actif, ce qui stimule la croissance tumorale [298]. De plus, l'apoptose induite lors de l'extinction d'EWS-FLI1 est en partie dépendante d'IGFBP3. D'autre part, le traitement de lignées d'ES avec l'IGFBP3 bloque leur prolifération et leur transformation oncogénique [299]. EWS-FLI1 pourrait également déréguler directement l'expression de l'IGF1 et l'IGF1R [300]. Dans ce contexte différentes études précliniques et cliniques ont été mises en œuvre pour bloquer la voie de l'IGF1 dans les ES en ciblant principalement l'IGF1R. In-vitro, un SiRNA ciblant IGF1R augmente la sensibilité des cellules d'ES à un agent de chimiothérapie [301]. Différents anticorps anti IGF1R sont actuellement au stade d'essai clinique, montrant une assez bonne réponse chez les patients atteints d'ES [302][303][304].

3. Ciblage du CD99

Le CD99 étant exprimé dans la plupart des ES et contribuant au potentiel oncogénique [148], il pourrait représenter une cible thérapeutique de ces tumeurs. Même si le ligand et le mécanisme d'action de cet antigène dans l'oncogenèse ne sont pas connus, des études in-vitro montrent que le blocage du CD99 par des anticorps induit une mort cellulaire rapide et augmente la sensibilité à la chimiothérapie. In-vivo, le traitement anti-CD99 diminue la croissance tumorale dans des modèles de xéno greffe d'ES [305]. Alors que le CD99 n'est pas exprimé chez la souris, il est fortement exprimé chez l'homme dans les cellules souches hématopoïétiques, les gonades et le pancréas, ce qui pourrait être source de toxicité lors de l'utilisation d'un anti-CD99 chez l'homme.

4. Ciblage des interactions ou des cibles de EWS-FLI1

Inhibition de la RNA hélicase A : Les interactions protéine-protéine apparaissent de plus en plus importantes dans la fonction transcriptionnelle d'EWS-FLI1. La RNA hélicase A joue un rôle important dans la fonction d'activation de transcription d'EWS-FLI1 et donc dans l'oncogénicité [214]. Une petite molécule a récemment été identifiée pour perturber l'interaction entre EWS-FLI1 et la RNA hélicase A [306]. Cette molécule induit l'apoptose et diminue la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffe d'ES.

Inhibition de l'NKX2.2 : Les études par microarray ont démontré la surexpression de NKX2.2 par EWS-FLI1 et son implication dans la transformation des ES en réprimant l'expression d'autres gènes [231][307]. NKX2.2 pourrait être une cible thérapeutique mais son mécanisme de répression

génique dépend de nombreuses interactions notamment avec les histones deacétylases. Dans ce cadre, le Vorinostat (un inhibiteur des HDAC), s'est révélé antiprolifératif in-vitro mais non efficace in-vivo [308].

Inhibition de NROB1 : NROB1 (ou DAX1) est un récepteur d'hormone nucléaire induit par EWS-FLI ayant un rôle important dans le processus oncogénique des ES en tant que corégulateur de l'expression de nombreux gènes [309]. NROB1 pourrait ainsi être une cible dans le traitement des ES.

5. Autres voies d'étude

TRAIL : Les ES exprimant les récepteurs de mort DR4 et DR5, le ligand TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) est capable d'induire l'apoptose de lignées d'ES in-vitro [310] et inhibe la croissance tumorale dans des modèles précliniques [311].

Inhibition de GST4M : Le GST4M code pour une enzyme de type glutathion transférase permettant la détoxification de composés endogènes ou exogènes en les conjuguant au glutathion. Une diminution du taux de GST4M augmente la sensibilité des ES à certains agents de chimiothérapie [312]. De plus ce gène est apparu surexprimé chez les patients répondant moins bien à la chimiothérapie. L'inhibition de GST4M pourrait être une approche thérapeutique adjuvante.

C. Développement des thérapies cytokiniques en cancérologie

Comme cela a été décrit précédemment, le rôle de l'inflammation dans le cancer apparaît complexe et bivalent. Certaines cytokines inflammatoires sont plutôt protumorales, d'autres antitumorales. Toutefois l'impact de l'inflammation sur le développement tumoral dépend également du type et du stade de la tumeur :

- Au début du phénomène de tumorigénèse, l'inflammation semble favoriser l'éradication des cellules tumorales ; un traitement cytokinique pourrait ainsi améliorer le traitement des tumeurs.
- A des stades plus avancés, l'inflammation favoriserait au contraire le développement tumoral. Des cytokines proinflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β sont produites par les cellules infiltrant la tumeur et permettent la survie et la croissance des cellules tumorales. Ces cytokines doivent alors être considérées comme des cibles thérapeutiques.

Les stratégies cytokiniques en cancérologie, utilisées comme adjuvant aux traitements de chimiothérapie conventionnelle, regroupent diverses approches :

- cytokines recombinantes
- anticorps ciblant les cytokines ou leur récepteur

- antagonistes ou récepteurs solubles aux cytokines
- ARNantisens
- Petites molécules inhibitrices des voies de signalisation des cytokines

Les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux sont de plus en plus envisagées dans le traitement des pathologies tumorales. Ces anticorps ciblant des antigènes exprimés par les cellules tumorales peuvent être utilisés pour cibler des agents de chimiothérapie ou des agents radioactifs vers le site tumoral. Les anticorps peuvent être également utilisés pour bloquer la signalisation de facteurs de croissance ou les interactions avec la MEC. Le problème de ce type de stratégie dans le traitement des CS réside toujours dans la mauvaise distribution au sein de la tumeur.

1. TNF- α

Le TNF- α (Tumor necrosis factor- α) a été identifié il y a une vingtaine d'année comme une protéine produite par les macrophages capable de tuer les cellules tumorales et est rapidement apparu comme un composant essentiel du système immunitaire. Le TNF- α est impliqué dans différentes pathologies autoimmunes telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. Pour ces indications, plusieurs spécialités pharmaceutiques injectables ciblant le TNF- α sont commercialisées :

- L'Etanercept ENBREL correspond au récepteur soluble au TNF associé au Fc
- L'Infliximab REMICADE est un anticorps neutralisant anti TNF
- L'Adalimumab HUMIRA est également un anticorps anti TNF

Plusieurs études mettent en évidence l'augmentation du risque de cancer chez les patients traités par anti-TNF [313]. En effet, dans le domaine de la cancérologie le TNF- α est un acteur important réduisant la prolifération tumorale, l'invasion, l'angiogenèse et le processus métastatique.

Dans ce contexte, le Tasonerimine BEROMUN, une forme recombinante du TNF- α humain a été développée. Cette spécialité est commercialisée et indiquée en perfusion du membre isolé sous légère hyperthermie et en association avec le Melphalan pour le traitement des tumeurs des tissus mous des membres, notamment les mélanomes, liposarcomes, sarcomes synoviaux [314][315].

2. IFN- α

L'interféron alpha2a ROFERON et l'interféron alpha2b INTRONA sont commercialisés dans le traitement des hépatites B et C chroniques mais ont également des indications dans certaines leucémies, myélomes, lymphomes, cancers du rein et mélanomes en association avec d'autres agents de chimiothérapie [316].

3. Anti-TGFbeta

Le TGFbeta présente une dualité d'action sur la prolifération cellulaire : il a un rôle suppresseur de tumeurs sur des cellules normales ou dysplasiques mais un rôle promoteur de tumeurs dans les cancers avancés. Il est suppresseur de tumeur sur les tumeurs primitives et pro-tumoral pour l'extravasation, l'invasion et donc la dissémination des métastases. La compréhension des mécanismes anti-oncogéniques (dépendant de la voie des Smad) ou pro-oncogéniques, permet d'envisager le TGFbeta comme une cible thérapeutique potentielle [317]. Des études précliniques avec des inhibiteurs de la voie du TGFbeta (ARN antisens, anticorps ou petites molécules inhibitrices ciblant le TGFbeta ou son récepteur) ont montré des résultats prometteurs en inhibant l'invasion tumorale et les métastases [318]. Certaines de ces molécules sont actuellement en essai clinique.

4. Anti IL-6R et gp130 soluble

Les cytokines signalisant via la voie JAK/STAT (IFN, IL-6, IL-10, IL-15, IL-23) apparaissent de plus en plus liés à la pathogenèse de maladies inflammatoires chroniques et de cancers [319][320]. L'activation de STAT3 corrèle souvent avec le potentiel tumorigène et est associé à la croissance tumorale, la survie, l'angiogenèse et les processus métastatiques tels que la transition epithelio-mésenchymateuse, la dégradation de la MEC et la migration cellulaire [321][322]. Dans des modèles tumoraux l'activation de STAT3 apparaît souvent corrélée avec la production d'IL-6. Par exemple, dans un modèle murin de cancer colorectal induit par l'inflammation, la tumorigenèse dépendante de STAT3 est associée avec la sécrétion locale d'IL-6 [323][324]. Dans un modèle de cancer du colon associé à une colite ulcéreuse, l'IL-6 produite par les macrophages est responsable de la tumorigenèse [325]. L'IL-6 est donc une cytokine majeure associée au développement tumoral et dans les cancers humains l'activité IL-6/STAT3 est associée à la progression tumorale et est un facteur de mauvais pronostic notamment dans le cancer du sein ou du poumon [326][327]. L'IL-6 apparaissant comme un facteur de croissance dans divers types de tumeurs, la mesure des taux circulants d'IL-6 et IL-6Rs peut être utilisée comme marqueur pronostic, et l'inhibition de cette cytokine pourrait présenter un intérêt thérapeutique.

La meilleure façon d'inhiber les effets de l'IL-6 est de bloquer son récepteur, l'IL-6R, car le blocage direct de la cytokine avec un anticorps induit une élévation des taux sériques d'IL-6 [328]. Des anticorps humanisés ciblant l'IL-6R ont été développés (notamment le Tocilizumab ACTEMRA commercialisé depuis 2009) et montrent des résultats favorables pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [329][330][331]. L'autre sous unité réceptrice de l'IL-6, le gp130, pourrait également être une cible thérapeutique. La forme soluble de la gp130 est capable d'antagoniser la trans-signalisation de l'IL-6 [332][333]. L'utilisation de cette forme soluble de gp130 associée au fragment Fc d'une IgG

est actuellement en développement préclinique et a montré son efficacité dans des pathologies inflammatoires ainsi que dans le cancer du colon [334][335].

5. Autres interleukines

IL-2: L'Aldesleukine PROLEUKIN est une forme recombinante de l'IL-2 humain commercialisée dans le traitement de l'adénocarcinome rénal métastatique [336]. Des études cliniques ont également pu démontrer son efficacité dans le mélanome [337].

IL-12: Dans le cadre de l'ostéosarcome, le MTP-PE (Liposomal muramyl tripeptide Phosphatidylethanolamine), un activateur des monocytes et macrophages induisant la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF, a été testé lors d'une étude clinique et présente des résultats prometteurs [338]. Le MTP augmente également l'expression de l'IL-12 qui elle-même augmente l'expression de Fas [339]. Plusieurs études précliniques utilisant l'IL-12 en aérosol ont montré des effets bénéfiques dans des modèles d'ostéosarcome [340]. De plus l'IL-18 associée à l'IL-12 améliore ce potentiel thérapeutique [341].

Anti IL-11R: L'IL-11 peut également contribuer au cancer induit par l'inflammation, notamment dans le cancer de l'estomac [342]. L'IL11R apparaît exprimé dans les ostéosarcomes canins mais pas dans les os sains [343], suggérant l'intérêt d'anticorps ciblant le récepteur de l'IL-11 en cancérologie.

6. Inhibition des JAK

Les JAK étant impliquées dans la signalisation de différentes cytokines, leur ciblage pourrait présenter un intérêt thérapeutique en cancérologie. Le Ruxolitinib est un inhibiteur sélectif de JAK1 et JAK2 ayant montré son efficacité dans le traitement des pathologies myéloprolifératives [344] commercialisé sous ATU nominative (autorisation temporaire d'utilisation) depuis 2011. Le Tofacitinib est un inhibiteur sélectif de JAK3 actuellement en essai clinique de phase III montrant des résultats favorables dans le traitement du psoriasis et de la polyarthrite rhumatoïde [345].

4^{ème} Partie : OSM et LIF, 2 cytokines de
la famille de l'IL-6 impliquées dans la
prolifération tumorale et la
physiopathologie osseuse

I. Caractéristiques communes des cytokines de la famille de l'IL-6

A. Définitions

Les cytokines sont des médiateurs solubles glycoprotéiques, produits par de nombreux types cellulaires après leur activation et actifs à de faibles concentrations. Elles permettent des communications très rapides entre des cellules présentes dans un même microenvironnement. Leur activité s'exerce essentiellement au niveau local selon un mode paracrine ou autocrine, néanmoins elles peuvent parfois agir à distance selon un mode endocrine. Les cytokines ne sont pas des molécules préformées mais sont rapidement synthétisées et excrétées en réponse à une stimulation.

Leur action passe par la fixation à un récepteur membranaire spécifique. Les cytokines peuvent exister sous différentes formes : soluble, membranaire ou intracytoplasmique et sont caractérisées par leur caractère pléiotrope et redondant. La pléiotropie caractérise la faculté des cytokines à agir sur de nombreuses cibles différentes, elles ont un large spectre d'activité. La redondance caractérise plusieurs cytokines ayant une même activité biologique. Les cytokines peuvent agir de façon synergique ou au contraire antagoniste.

Les cytokines contribuent notamment à l'embryogénèse, la réponse immunitaire, l'inflammation ou l'hématopoïèse et peuvent être également impliquées lors de situations pathologiques comme l'auto-immunité, le cancer, les maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde...), les hépatites virales, l'infection par le VIH.

On distingue plusieurs grandes familles de cytokines, basées sur leur structure, leur récepteur et/ou leurs activités biologiques. Parmi elles se trouvent les Interférons (IFN), les Tumor Necrosis Factors (TNF), les Transforming Growth Factors (TGF), les facteurs de croissance hématopoïétiques, les chimiokines et les interleukines (IL).

B. Récepteurs

La gp130

Les cytokines de la famille de l'IL-6 exercent leurs activités grâce à un complexe de récepteur, formé de glycoprotéines transmembranaires, contenant au moins la protéine de transduction du signal gp130 ou la gpl (gp130 like) [346].

La gp130, dont le gène est localisé sur le chromosome 5 chez l'homme, a une masse moléculaire de 130 kD. Sa partie extracellulaire comporte, en N-terminal, un domaine « Ig-like » suivi d'un domaine CBD (cytokine binding domain) et de trois domaines FnIII (Fibronectin type III) dans la

région proximale de la membrane plasmique. La région intracellulaire est impliquée dans la transduction du signal et contient des motifs fonctionnels conservés.

La protéine gp130 est exprimée de manière ubiquitaire. Au niveau osseux, elle est par exemple exprimée dans les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules ostéoblastiques [347]. La gp130 est aussi exprimée dans de nombreuses cellules tumorales telles que les mélanomes, myélomes, neuroblastomes, médulloblastomes, carcinomes du colon, mammaires, placentaires [348] [349].

Autres chaînes réceptrices

Cette famille regroupe actuellement 10 cytokines [350] se fixant à différents types de récepteurs (Figure 23) :

- L'IL-6 (Interleukine 6) se fixe à l'IL-6R puis à un homodimère de gp130.
- L'OSM (Oncostatine M) peut se fixer à 2 types de récepteurs : un hétérodimère gp130 et LIFR (récepteur de type I) ou de gp130 et OSMR (récepteur de type II)
- Le LIF (Leukaemia inhibitory factor) se fixe à un hétérodimère de gp130 et LIFR
- Le CT1 (CardioTrophine-1) se fixe à un hétérodimère de gp130 et LIFR
- Le CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) se fixe au CNTFR puis au gp130/LIFR
- Le CLC (Cardiotrophine-Like Cytokine) se fixe au CNTFR puis au gp130/LIFR
- Le NP (NeuroPoietine) se fixe au CNTFR puis au gp130/LIFR
- L'IL-31 (Interleukine 3) se fixe à un hétérodimère gp1 et OSMR.
- L'IL-11(Interleukine 11) se fixe à l'IL11R puis à un homodimère de gp130
- L'IL-27 (Interleukine 27) se fixe à un hétérodimère de gp130 et WSX-1

Seules les chaînes gp130, gp1, OSMR et LIFR sont capables de transduire un signal [351].

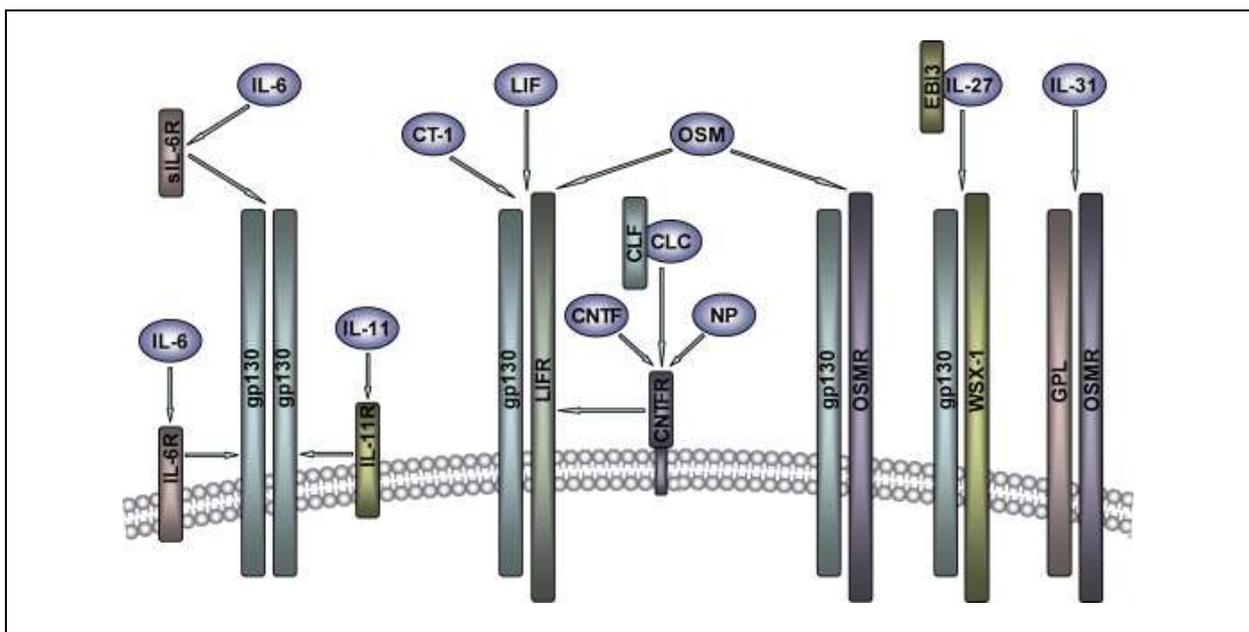


Figure 23: Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6
D'après [352]

C. Voies de signalisation

Je développerai principalement dans cette partie la voie JAK/STAT car c'est celle que nous avons le plus étudiée par la suite.

1. Les JAK

La fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur va induire la phosphorylation rapide et transitoire de résidus tyrosine conservés dans le domaine intracellulaire à l'extrémité C-terminale des chaînes réceptrices. Les récepteurs de ces cytokines ne possédant pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque (contrairement aux récepteurs aux facteurs de croissance), leur phosphorylation est permise par des tyrosine-kinases constitutivement associées au récepteur : les JAK (Janus kinases).

Structure des JAK

La famille des JAK compte 4 membres, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2). Les JAK sont des protéines de 120 à 140 kD formées de 7 domaines (JH1 à JH7) dont les activités spécifiques ne sont pas encore bien caractérisées [353] (Figure 24a).

- Le domaine JH1 contient 2 tyrosines adjacentes conservées et correspond au domaine kinase. La phosphorylation de ces tyrosines induit des modifications conformationnelles de la protéine JAK facilitant sa fixation au substrat.
- Le domaine JH2 représente un domaine pseudokinase permettant de réguler l'activité du domaine JH1.
- Le domaine N-terminal (JH3-JH7) est impliqué dans l'association des JAK avec les récepteurs aux cytokines ou avec d'autres kinases.

Mécanisme d'activation

Les JAK s'associent à la partie cytoplasmique des récepteurs, à proximité de la membrane cellulaire, dans une région riche en proline appelée box1/box2. Ce motif apparaît un facteur important dans l'association JAK/récepteur puisque la mutation de quelques acides aminés de cette région est suffisante pour annuler la liaison avec les JAK et conduit à l'inactivation du récepteur [354].

La fixation de la cytokine avec les sous-unités réceptrices induit l'accolement de celles-ci ainsi que des modifications conformationnelles permettant de rapprocher les JAK associées à chaque chaîne réceptrice [355]. La proximité des JAK permet ainsi leur auto-phosphorylation.

Les JAK activées pourront à leur tour phosphoryler des résidus tyrosine situés dans le domaine intracytoplasmique du récepteur au niveau de la box 3, créant ainsi des sites d'ancrage pour de nombreuses molécules contenant un domaine SH2 (Src homology 2) (Figure 24b).

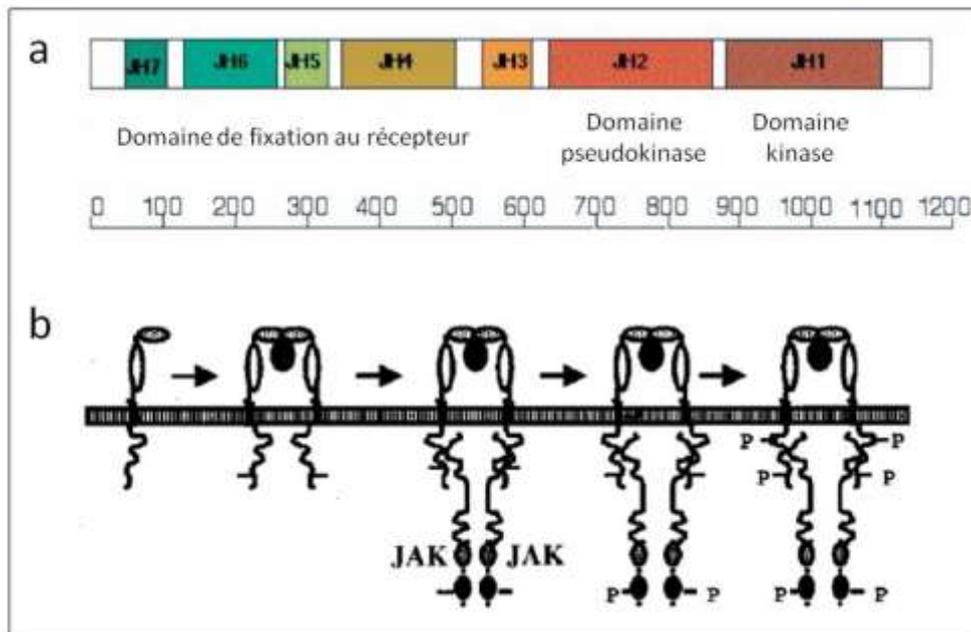


Figure 24 : Structure et activation des JAK

a- Les JAK partagent sept régions d'homologie [356]. b- L'oligomérisation du récepteur lors de la fixation du ligand induit l'accolement des JAK puis leur activation par phosphorylation. Les JAK peuvent à leur tour phosphoryler le récepteur [357].

Activation par les cytokines de la famille de l'IL-6 et rôles physiologiques

Les JAK participent à de nombreuses voies de signalisation. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimés de manière ubiquitaire alors que l'expression de JAK3 apparaît principalement restreinte aux lignées myéloïdes et lymphoïdes [358]. Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent activer principalement JAK1 et JAK2.

JAK1 est impliqué dans la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6, de l'IL-2, de l'IL-4 et des cytokines aux récepteurs de classe II. Les souris KO JAK1 meurent très rapidement après la naissance et ne répondent plus à différentes classes de cytokines incluant l'IFN γ , ou les cytokines de la famille de l'IL-6 et notamment le LIF [359]. Ces souris souffrent de lésions neurologiques similaires à celles observées chez les souris KO LIFR, suggérant que ces lésions sont dues à une perte de fonction du LIF [360].

JAK2 est impliqué dans la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-6, de l'IL-3, les cytokines aux récepteurs de classe II ainsi que les protéines se fixant aux récepteurs à une seule chaîne (Epo-R, Tpo-R, GH-R, PRL-R). Les souris KO JAK2 présentent un phénotype létal au stade embryonnaire lié à des défauts d'érythropoïèse similaires à ceux des souris KO Epo [361].

JAK3 est impliqué dans la signalisation des récepteurs contenant la chaîne réceptrice commune gamma γ C (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, and IL-21R) [353]. Les souris KO JAK3 présentent des défauts importants dans la lymphopoïèse similaires à ceux observés chez les souris KO γ C mais survivent dans un environnement SPF (specific pathogen free)[362].

TYK2 contribue à la signalisation de l'IFN- α , IL-6, IL-10 and IL-12. Les souris KO TYK2 présentent peu de défauts si ce n'est une réponse plus faible à l'IFN- α [363], à l'IL-12 et aux LPS.

2. La voie STAT

La voie majoritairement activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est la voie des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) composée de sept membres : STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6 [364].

Structure des STAT

Les STAT sont composés de 5 domaines bien définis (Figure 25 a et b):

- Le domaine N-terminal conservé est un élément critique pour la fonction des STAT car des délétions dans cette région empêchent leur phosphorylation.
- Le domaine « coiled coil » se situe juste à côté du domaine N-terminal et consiste en 4 hélices alpha formant une surface hydrophile. Il est impliqué dans l'interaction avec d'autres facteurs de transcription, la fixation au récepteur, la phosphorylation de la tyrosine et l'export nucléaire [365][366].
- Le domaine de fixation à l'ADN est une région très conservée entre les différentes STAT, qui se fixe sur des séquences consensus sur l'ADN TTNCNNNA [367].
- Le domaine SH3-like ou domaine linker apparaît comme un domaine moins conservé, et sa fonction SH3 n'est pas réellement bien caractérisée.
- Le domaine SH2 est quant à lui très conservé et joue un rôle crucial dans la signalisation des STAT. Il est en effet impliqué dans :
 - o le recrutement des STAT au niveau du complexe de récepteur activé
 - o l'interaction avec les JAK et les kinases src
 - o l'homo ou l'hétérodimérisation des STAT, une étape critique dans la translocation nucléaire et la fixation à l'ADN.
- Le résidu tyrosine, jouant un rôle critique dans l'activation des STAT, se trouve juste à côté de ce domaine SH2 (aux alentours du résidu 700) [368]. Sa phosphorylation, essentielle pour l'activation et la dimérisation des STAT, est induite par les récepteurs aux facteurs de croissance, les JAK et les kinases Src et dépend du type cellulaire et des interactions ligand/récepteur.
- Le domaine C-terminal intervient dans la transactivation transcriptionnelle. La phosphorylation d'un résidu sérine de ce domaine augmente son activité transcriptionnelle. Un épissage alternatif des STAT entraînant une perte de ce domaine donne naissance à une forme de STAT capable de se lier à l'ADN mais ne pouvant pas activer la transcription (forme dominante négative).

Mécanisme d'activation

Les STAT sont des facteurs de transcription localisés, en l'absence de stimulation cytokinique, au niveau plasmatique sous forme de monomères inactifs. Plusieurs étapes sont classiquement nécessaires pour que les STAT puissent réguler la transcription génique (Figure 25c) :

1. Après fixation d'une cytokine sur son récepteur, activation des JAK et phosphorylation du récepteur, STAT est recruté sur ce récepteur au niveau de sites d'ancrage SH2.
2. STAT est alors phosphorylé.
3. Cette phosphorylation induit un changement de conformation permettant de libérer les STAT du récepteur.
4. Les STAT vont ensuite former des homo- ou hétérodimères par fixation du domaine SH2 d'un STAT sur la tyrosine phosphorylée de l'autre STAT et réciproquement. Les dimères de STAT connus sont les suivants (1:1)(3:3)(4:4)(5:5)(6:6)(1:3)(1:2) et en l'absence de STAT1 (2:2)(2:3).
5. Ces dimères sont relocalisés dans le noyau cellulaire de façon active grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS).
6. Les STAT pourront alors se lier à l'ADN (au niveau de séquences consensus présentes sur le promoteur de différents gènes) et réguler l'expression de gènes cibles.
7. La phosphorylation des facteurs de transcription STAT est transitoire, et une fois déphosphorylées, ces molécules sont exportées du noyau vers le cytoplasme grâce à un signal d'exportation nucléaire (NES).

Ce schéma général de l'activation des STAT est en réalité beaucoup plus complexe, et ce, à différents niveaux :

- Des complexes multimériques préformés de molécules STAT peuvent exister mais leur rôle reste encore à déterminer [369]
- La fixation de STAT au récepteur sans fixation préalable du ligand a déjà été rapportée [370].
- STAT5 peut être phosphorylé sans se fixer au récepteur activé mais en interagissant directement avec JAK2 [371].
- Les STAT peuvent également être phosphorylés plus tardivement sur des résidus sérine par différentes sérine kinases (MAPK, PKC... selon le contexte cellulaire). Cette phosphorylation permet de réguler, au moins partiellement, l'activité du domaine de transactivation des STAT [372].
- Il existe un mouvement permanent des STAT entre cytoplasme et noyau, indépendant de leur état de phosphorylation [373]. Des molécules STAT déphosphorylées ont en effet été observées dans le noyau, jouant alors un rôle de coactivateur [374].

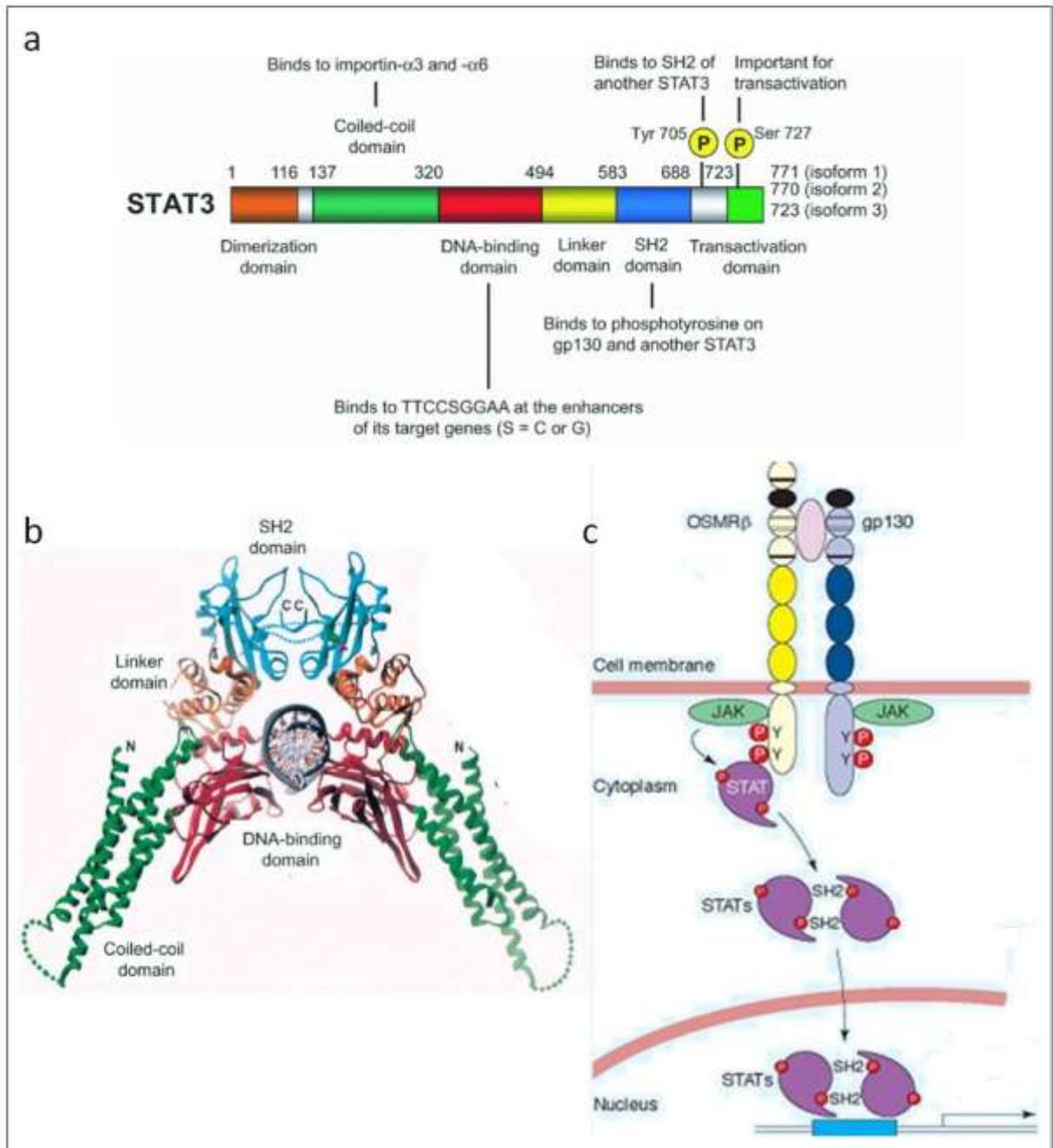


Figure 25: Structure et activation des STAT

a- Organisation structurelle de la protéine STAT3, composé de 6 domaines [375]. b- Structure cristallographique de STAT1 [356]. c- Activation de la voie JAK-STAT par l'OSM [376].

Activation par les cytokines de la famille de l'IL-6

La nature des STAT activés dépend plus du type cellulaire que de la cytokine ou du type de JAK activé lors de l'interaction cytokine/récepteur. Différents récepteurs peuvent activer le même STAT via la phosphorylation du même site tyrosine, même s'ils activent des JAK distincts [377].

Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent activer principalement trois membres de la famille des STAT :

- STAT1, phosphorylé sur la Tyr701
- STAT3, phosphorylé sur la Tyr705
- STAT5b phosphorylé sur la Tyr694

La gp130 contient 4 motifs de recrutement des STAT, qui présentent des affinités différentes pour STAT1 et STAT3 [378]. L'étude des souris KO gp130 a confirmé le rôle de ces motifs tyrosine dans l'activation de STAT3 [379].

Suite à la fixation de l'OSM sur ses récepteurs, STAT1 et STAT3 peuvent être activés par les récepteurs de type I ou de type II alors que STAT5b est activé spécifiquement par le récepteur de type II (et ne pourrait donc pas être activé par le LIF). Cette spécificité de l'OSM a pu être mise en évidence par Auguste et collaborateurs en 1997 grâce à l'utilisation de cellules exprimant uniquement le récepteur de type I ou le récepteur de type II [380] et a été confirmée ultérieurement par l'équipe de P. Heinrich [381].

Rôles physiologiques et implication en cancérologie

D'une manière générale, les facteurs de transcription STAT jouent un rôle dans les processus de différenciation, de prolifération cellulaire et d'apoptose.

STAT1 est classiquement décrit comme un suppresseur de tumeur capable d'induire l'apoptose [382]. Les souris KO STAT1 présentent des défauts dans la réponse immunitaire dépendante de l'IFN face aux agents pathogènes [383]. Même si ces souris ne présentent pas d'anomalies osseuses, les embryons ont des défauts de prolifération chondrocytaire dépendante du FGF [384].

A l'inverse, STAT3 et STAT5 semblent plutôt favoriser la prolifération et la survie [385]. Ainsi, l'activation constitutive de STAT3 ou de STAT5 est retrouvée dans de nombreux cancers : myélomes [386], leucémies, lymphomes, mélanome [387] cancers du sein [388] et de la prostate.

STAT5 a tout d'abord été identifié comme un facteur de transcription induit par la prolactine. STAT5a et STAT5b sont exprimés dans tous les tissus et partagent une redondance fonctionnelle, toutefois les KO de l'une ou l'autre des formes présentent des phénotypes distincts [389] :

- Les souris KO STAT5a sont principalement déficientes au niveau du développement de la glande mammaire dépendante de la prolactine.
- Les souris KO STAT5b présentent un phénotype similaire à celui des souris KO pour la GH car STAT5b est majoritairement activé par cette hormone.
- Les souris double KO STAT5a/STAT5b cumulent ces anomalies mais de manière plus prononcée et sont infertiles. Ces souris présentent également des défauts au niveau des lignées myéloïdes, lymphoïdes et des macrophages.

STAT3 est exprimé dans la plupart des tissus et précocement durant le développement embryonnaire. De ce fait, la suppression du gène *STAT3* est létale au niveau embryonnaire [390]. Les KO *STAT3* tissu spécifiques ont montré un retard d'apoptose au niveau de la glande mammaire [391], un défaut d'induction des gènes de la phase aigüe en réponse à l'IL-6 dans les hépatocytes [392] ou des hyperplasies au niveau de l'épiderme [393].

STAT3 est constitutivement activé dans un certain nombre de tumeurs murines et humaines, mais est aussi capable de réguler la transformation de fibroblastes dépendante de Src [394]. STAT3 régule notamment des gènes cibles impliqués dans la transformation tumorale tels que *C-MYC*, *Bcl-X_L* et *Fas*. De plus, un mutant de STAT3 constitutivement activé induit la tumorigenèse [395].

STAT3 est souvent décrit comme acteur important dans les effets induits par l'OSM, qu'ils soient pro ou antiprolifératifs :

- Inhibition de la prolifération dans le cancer du sein [396]
- Réduction de prolifération des cellules épithéliales mammaires [397]
- Inhibition de prolifération et induction de la différenciation des cellules hépatiques [398] [399]
- Induction de la différenciation ostéoblastique [400]
- Induction de prolifération dans le cancer de l'ovaire [401]
- Induction de prolifération et inhibition de différenciation des cellules souches embryonnaires [402].

3. La voie MAPK

Outre la voie des STAT, la fixation des cytokines de la famille de l'IL-6 sur leur récepteur conduit à l'activation d'une autre grande voie de signalisation : la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Ces MAPK incluent ERK1/2 (favorisant la survie et la prolifération cellulaire), p38 et JNK (des kinases de stress). Le mécanisme d'activation de cette voie apparaît différent selon la chaîne réceptrice impliquée :

- Pour la gp130 et le LIFR, la SHP2 (une tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2) est recrutée respectivement au niveau de la phospho-Tyr759 et de la phospho-Tyr974 [403]. La SHP2 activée peut à son tour recruter et activer d'autres molécules, telles que le complexe Grb2/SOS (growth-factor-receptor-bound protein / Son of Sevenless), conduisant à l'activation de Ras.
- Pour l'OSMR, la protéine adaptatrice Shc (SH2 and collagen-homology-domain containing protein) est recrutée au niveau de la phospho-Tyr861 permettant le recrutement et l'activation en cascade des molécules Grb2, SOS, Ras, Raf et MAPK de façon plus importante qu'après le recrutement de SHP2 [404].

Les MAPK migrent ensuite dans le noyau et, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, peuvent réguler la transcription de différents gènes.

4. La voie PI3K/Akt

Une troisième voie activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est celle de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase). La PI3K peut également être activée par divers médiateurs inflammatoires et facteurs de croissance.

Le mécanisme d'activation de cette voie apparaît ici encore différent en fonction de la cytokine impliquée. En réponse à l'IL-6 la protéine adaptatrice Gab1 interagit avec la PI3K [405]. En réponse à l'OSM, la PI3K s'associe avec l'IRS-1 (insulin receptor substrate-1) [406].

La PI3K est alors capable de phosphoryler le groupe 3' hydroxyl des phosphatidylinositols, lipides membranaires qui vont jouer le rôle de seconds messagers.

La sérine thréonine kinase Akt est ensuite recrutée au niveau de la membrane plasmique où elle est activée par phosphorylation par une seconde kinase, PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1).

Les substrats de la kinase Akt sont nombreux. Akt peut inactiver la molécule proapoptotique Bad par phosphorylation [407]. La voie PI3K /Akt est alors associée avec la survie cellulaire et la prolifération. Akt induit également la synthèse de cytokines inflammatoires et chimiokines. De ce fait, la PI3K peut jouer un rôle dans l'initiation et la progression de pathologies inflammatoires.

5. La voie PKC δ

Parmi les molécules activées par les cytokines de type IL-6, on trouve également un membre de la famille des PKC : la protéine kinase C delta (PKC δ). Les PKC sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation de processus cellulaires tels que la croissance, la migration et la réponse inflammatoire [408]. La PKC δ est une isoforme calcium-indépendante dont l'activité est régulée par le stress oxydatif et les cytokines inflammatoires. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération ou l'apoptose, se révélant pro ou antiapoptotique selon le contexte [409].

Différentes cascades moléculaires peuvent conduire à l'activation de la PKC δ . Une première voie décrite après stimulation par l'IL-6 consiste en l'activation successive des protéines Rac-1, Sek (SAPK/Erk kinase 1) et MKK4 (MAP kinase kinase 4) [410]. Une seconde voie décrite dans le cadre de l'IL-1 β implique la phospholipase C gamma (PLC γ), protéine capable de cliver le phosphatidyl inositol di-phosphate (PIP₂), générant le di-acyl-glycérol (DAG) et l'inositol tri-phosphate (IP₃) [411]. La PI3K semble quant à elle nécessaire à l'activation de la PKC δ par l'OSM [412].

L'activation de la PKC δ consiste en sa phosphorylation sur la Thr505 [410]. La PKC δ activée peut s'associer avec le facteur de transcription STAT3 pour le phosphoryler sur la Ser727, amplifiant alors son activité transcriptionnelle [413].

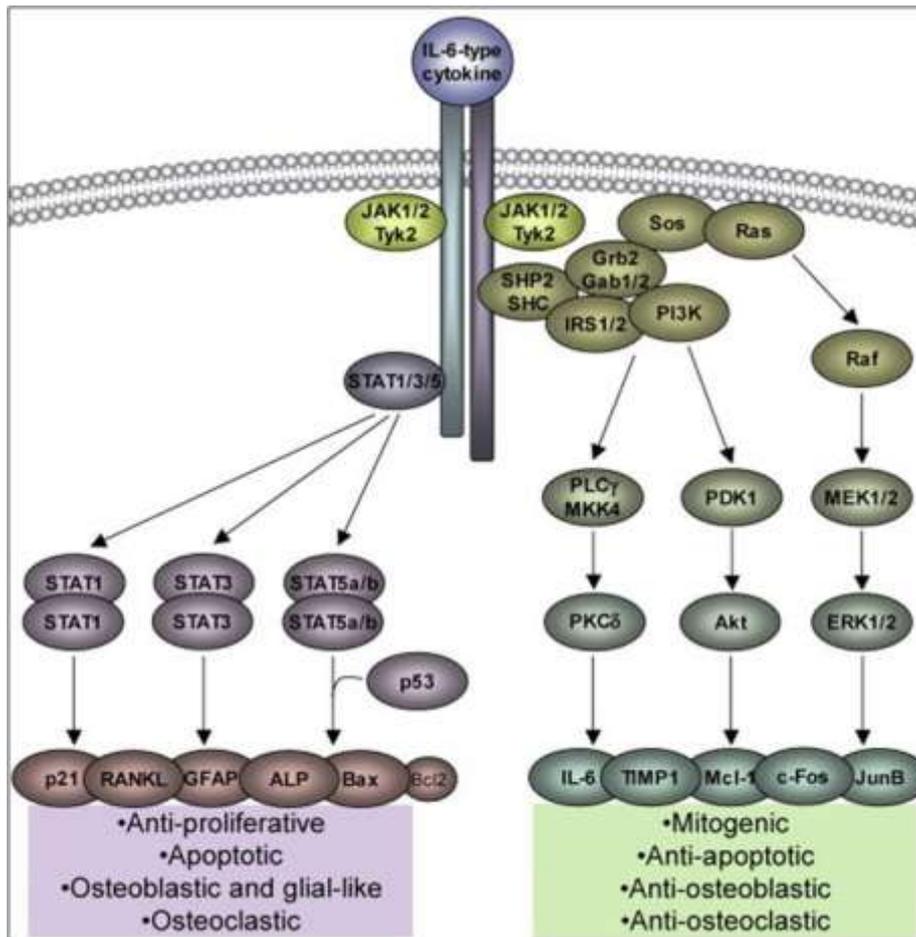


Figure 26: Voies de signalisation activées par les cytokines de type IL-6

Les JAK activées permettent l'activation des facteurs de transcription STAT, et des kinases ERK1/2, Akt et PKC δ . Les STAT induisent principalement l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de croissance, l'apoptose et la différenciation, alors que les kinases induisent les effets inverses [352].

6. La régulation négative de la signalisation intracellulaire

Afin d'induire un signal uniquement transitoire, plusieurs mécanismes interviennent pour réguler négativement les signalisations intracellulaires précédemment citées.

Les SHP (Src homology containing tyrosine phosphatase) sont capables de déphosphoryler et donc d'inactiver le récepteur, les molécules JAK ou les STAT [351]. SHP2 est exprimé de manière ubiquitaire alors que l'expression de SHP1 apparaît restreinte aux tissus hématopoïétiques. Une mutation de la gp130 empêchant le recrutement et l'activation de SHP2 prolonge significativement la signalisation STAT3 [379]. SHP2 interagit également directement avec STAT5 et induit sa déphosphorylation [414].

Les SOCS (suppressors of cytokine signaling) sont une famille de gènes cibles des STAT qui antagonisent directement l'activation des STAT et établissent ainsi une boucle de rétrocontrôle négative classique [415]. De manière générale les SOCS interagissent avec le domaine catalytique des

JAK afin d'inhiber leur activité kinase (Figure 27). Cette famille compte 8 membres : CIS-1 (cytokine-inducible SH2 containing protein), SOCS-1 à SOCS-7 [416]. Dans le cas des cytokines de la famille de l'IL-6, une stimulation par l'OSM active la voie JAK-STAT puis l'expression de CIS-1, SOCS-1 et SOCS-3 [417]. Les SOCS sont formés de 3 domaines :

- un domaine SH2 central, qui détermine la cible de chaque SOCS. Le domaine SH2 de SOCS-1 se lie directement aux JAK [418]. Le domaine SH2 de CIS-1 et SOCS-3 se fixe aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs activés [419]. SOCS-3 se fixe par exemple sur la gp130 au niveau de la tyrosine phosphorylée 759 puis forme un complexe avec les JAK [420].
- un domaine N-terminal variable fonctionnant comme une ubiquitine ligase E3 et médiant la dégradation des SOCS. SOCS-1 et SOCS-3 peuvent aussi inhiber directement l'activité tyrosine kinase des JAK via leur domaine KIR (kinase inhibitory regions) localisé dans ce domaine N terminal [418].
- un domaine C-terminal appelé SOCS box qui interagit avec l'elongin B, l'elongin C, les cullins, et la protéine RBX2 permettant le recrutement d'une E2 ubiquitine–transferase et la régulation de la dégradation des SOCS par le protéasome [421].

Les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) interviennent dans la régulation de la signalisation des STAT. Ces protéines interagissent uniquement avec les STAT activés sous forme de dimère. La famille des protéines PIAS compte 5 membres (PIAS1, PIAS3, PIASy, PIASx α et PIASx β), chaque membre régulant négativement l'activité des STAT auxquels il se lie. PIAS1 se lie aux dimères de STAT1 et l'empêche de se fixer à l'ADN [422]. De façon analogue PIAS3 inhibe spécifiquement STAT3 [423]. Ces protéines ont des structures communes [424] :

- Un domaine N-terminal contenant un motif conservé LXXLL, qui permet des interactions avec des coactivateurs de récepteurs nucléaires.
- Un motif présumé de liaison au Zn au milieu de la protéine
- Un domaine C-terminal moins conservé contenant une région riche en sérine-thréonine

Dégradation par le protéasome et le lysosome. La dégradation dépendante du processus d'ubiquitination et du protéasome peut également jouer un rôle pour diminuer la signalisation induite par une cytokine. Cette dégradation peut intervenir à différents niveaux

- directement sur les sous-unités réceptrices. Le LIF est ainsi capable d'induire la dégradation du LIFR par le lysosome [417].
- au niveau des JAK ou des STAT. Des inhibiteurs du protéasome sont en effet capables de stabiliser les taux de formes actives de STAT1 et STAT5 notamment et prolongent l'activité des JAK [425][426].

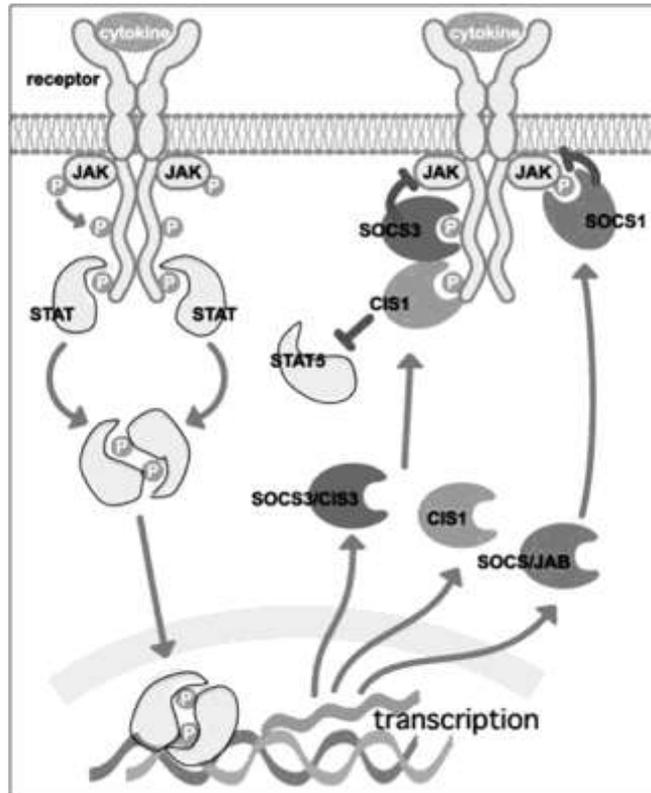


Figure 27: Inhibition de la signalisation par les SOCS

Schéma de la régulation négative de la signalisation par les SOCS induite après stimulation cytokinique [427]. CIS-1 se lie au récepteur et empêche l'activation de STAT5. SOCS-1 se lie aux JAK et SOCS-3 se lie au récepteur au niveau du domaine SH2 mais ils inhibent tous les deux l'activité JAK via le domaine KIR.

7. La régulation positive de l'activité des STAT

Phosphorylation de sérines. Les STAT peuvent être phosphorylés sur des sérines présentes au niveau du motif PMSP, démontrant des possibilités d'interactions avec d'autres voies de signalisation. La phosphorylation de STAT1 ou STAT3 sur la sérine 727 augmente leur activité transcriptionnelle [428]. La phosphorylation de STAT5 sur sérine augmente la stabilité de la protéine [429].

Interaction avec des protéines. De nombreuses études ont pu mettre en évidence des interactions directes entre les STAT et d'autres facteurs de transcription [430][431][432]:

- STAT1 peut interagir avec NF- κ B, Sp1, USF-1, PU.1 et le récepteur aux glucocorticoïdes
- STAT3 peut interagir avec Sp1, c-Jun et le récepteur aux glucocorticoïdes
- STAT5 peut interagir avec YY-1, Sp1, C/EBP β et le récepteur aux glucocorticoïdes

Les STAT peuvent interagir avec des protéines nucléaires, facilitant la transcription en induisant des modifications de la chromatine, telles que CBP/p300, BRAC1, Mcm5, Nmi et HMG-I(Y) [433][434]. Les STAT peuvent aussi interagir avec des protéines cytoplasmiques telles que StIP1 (qui facilite l'interaction entre les JAK et les STAT), STAM (une protéine se fixant aux JAK) ou SH2-B (une protéine se fixant au récepteur de l'hormone de croissance) [435][436].

D. Activités biologiques

Les cytokines de la famille de l'IL-6 ont des activités bien souvent redondantes du fait qu'elles utilisent des récepteurs très proches dans leur structure et leur fonctionnement. Elles sont également extrêmement pléiotropes et de façon générale, sont impliquées dans le développement, l'inflammation et la réparation de nombreux tissus tels le foie, les os et les systèmes nerveux et hématopoïétiques.

1. Inflammation

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont impliquées dans l'inflammation et notamment dans l'induction de la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (APP) par le foie [437]. Dans des lésions inflammatoires cutanées de type psoriasis ou dermatite atopique, il a été mis en évidence une surexpression d'IL-6 [438], d'IL-11 [439], d'IL-31 [440] et d'OSM [441]. Ces cytokines jouent également un rôle dans le développement des pathologies inflammatoires intestinales et du cancer colorectal [442][443][342]. Le ciblage de ces cytokines par des anticorps pourrait être une solution thérapeutique pour des pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou l'asthme. Le Tocilizumab (anticorps antiIL-6R) est notamment utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [329][330][331].

2. Hématopoïèse

Directement sur les cellules hématopoïétiques ou indirectement par leur action sur les cellules stromales, les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle central dans l'hématopoïèse fœtale et adulte. Elles peuvent favoriser la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, la production de globules rouges, de plaquettes ou de neutrophiles [444].

3. Physiologie osseuse

Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'os. Elles sont capables de contrôler la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes grâce à une variété de mécanismes complexes, parfois contradictoires. L'effet pro- ou antirésorptif de ces cytokines dépendrait du type de signalisation. L'activation des STAT par la gp130 est essentielle à la croissance osseuse, à l'activation des ostéoblastes, ainsi qu'à la production de RANKL et donc la formation des ostéoclastes alors que l'activation des MAPK est impliquée dans l'inhibition de l'ostéoclastogenèse [445].

Effets sur les ostéoblastes. Ces cytokines sont capables de stimuler la différenciation ostéoblastique [400][446][447] via STAT3 [448] mais peuvent également inhiber la formation osseuse in-vitro [449][450], via la PKCdelta et Erk1/2 [451]. Les cytokines de la famille de l'IL-6 semblent donc avoir un effet biphasique en fonction du stade de différenciation puisqu'à des stades très précoces de différenciation elles stimulent la différenciation et la minéralisation alors qu'à des stades plus tardifs, elles inhibent la minéralisation et l'expression des marqueurs ostéoblastiques.

Effets sur les ostéoclastes. Les cytokines de la famille de l'IL-6 agissent sur la différenciation ostéoclastique et donc sur la résorption osseuse de manière indirecte via les ostéoblastes. Ces cytokines peuvent stimuler la formation d'ostéoclastes en induisant la production de facteurs pro-résorptifs tels que RANKL par les cellules ostéoblastiques [452][453][454][455][447] jouant un rôle dans l'ostéoporose post-ménopause [456]. Cependant ces cytokines sont aussi capables d'inhiber la différenciation ostéoclastique induite par RANKL [457][458].

4. Croissance tumorale

Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulateurs, directs ou indirects, sur la croissance tumorale en fonction du type cellulaire.

Rôle antitumoral. L'OSM, l'IL-6 associée à son récepteur soluble (IL-6Rs), le LIF et l'IL-11 inhibent la prolifération de nombreuses cellules tumorales en culture issues de mélanome [459], de cancer du sein [376] ou d'ostéosarcome [460]. De même, l'IL-6, l'OSM et l'IL-27 ont une action antitumorale directe possible chez les rongeurs ou chez l'homme notamment sur le cancer pulmonaire [461], les métastases hépatiques [462] ou le mélanome [463][464] suggérant une utilisation potentielle comme traitement anticancéreux adjuvant. Dans des modèles de tumeurs solides chez la souris, l'IL-6 pourrait être un facteur de bon pronostic puisque le traitement par radiothérapie est amélioré s'il est associé à l'administration d'IL-6 + IL-6Rs [465].

Rôle protumoral. En revanche, ces cytokines sont également capables de soutenir ou de stimuler la prolifération in-vitro de cellules issues de mélanome [466], de myélome [467] ou de cancer de la prostate [468].

Implication dans les tumeurs osseuses primitives. Schématiquement, outre les effets pro ou antitumoraux directs, les cytokines de la famille de l'IL-6 pourraient avoir des effets indirects sur la prolifération tumorale via le cercle vicieux en modifiant la balance formation/résorption osseuse. En effet, les cytokines de la famille de l'IL-6 produites dans l'environnement tumoral osseux par les cellules tumorales (principalement l'IL-6, l'IL-11 et le LIF) participent à la résorption osseuse [452][469]. De même, l'OSM est capable d'induire la production de RANKL par les ostéoblastes et ainsi de stimuler la dégradation osseuse. De plus, une élévation du taux sérique de certaines de ces cytokines, et en particulier d'IL-6, a pu être mise en évidence chez les patients atteints de différentes TOP, en relation avec un mauvais pronostic vital [470].

5. Activités spécifiques

Cependant, ces cytokines apparaissent de plus en plus comme ayant également des activités spécifiques. En effet, l'expression de ces cytokines ou de leurs récepteurs peut être très différente in vivo et varier selon les tissus ou les conditions physiopathologiques.

L'IL-6 apparaît plus particulièrement impliquée dans la production des APP par le foie, l'ostéoporose post-ménopause et l'arthrite rhumatoïde [471][472].

Le LIF a un rôle majeur en contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires et il est nécessaire pour l'implantation du blastocyste [473].

L'OSM est la cytokine de type IL-6 la plus active pour inhiber la prolifération de divers sarcomes ou carcinomes [474].

L'IL-31 est une cytokine produite par les lymphocytes T (helper type 2, CD4+), majoritairement impliquée dans l'inflammation cutanée [475].

L'IL-11 stimule la thrombopoïèse, la neutropoïèse, l'hématopoïèse et régule la différenciation macrophagique [439]. C'est une cytokine anti-inflammatoire en inhibant la production d'IL-1 et activant la production d'IL-10 [476] impliquée dans la maladie de Crohn [477].

E. Historique des découvertes

Ce chapitre, consultable en **Annexe 4**, présente un historique des principales découvertes concernant l'IL-6, l'OSM et le LIF sur le plan de leur production, leur structure, leurs récepteurs et leurs activités biologiques initialement présentées (Figure 54). Les cytokines et récepteurs ayant été décrits parallèlement par différentes équipes, plusieurs noms leur ont été attribués (Tableau 7). L'enchaînement des découvertes met en exergue le caractère pléiotrope et redondant de ces cytokines, qui présentent des chaînes réceptrices communes et ont montré des activités biologiques, parfois contradictoires, dans des domaines très variés.

II. Modèles murins transgéniques ou KO

De nombreuses souris knockout et transgéniques pour une cytokine ou son récepteur ont permis d'étudier les effets biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6. Les souris KO pour une cytokine présentent en général des phénotypes peu sévères, certainement dûs à la redondance de ces cytokines, en revanche les souris déficientes pour un récepteur de la famille de la gp130 présentent des phénotypes plus sévères au niveau de différents organes dûs à la pléiotropie de ces cytokines.

Souris transgéniques pour les cytokines

Chez les souris **transgéniques IL-6**, cette cytokine induit la croissance polyclonale de cellules plasmatisques dans la rate et les nodules lymphatiques [478]. Dans d'autres modèles, la surexpression d'IL-6 induit une réduction significative du nombre d'ostéoblastes et des défauts de développement du squelette [479][480].

Les souris **transgéniques LIF** ont un phénotype proche des souris transgéniques IL-6: hyperplasie des lymphocytes B, hypergammaglobulinémie polyclonale et glomérulonéphrite [481]. La surexpression du LIF par injection de cellules transfectées par un rétrovirus induit une augmentation importante du volume osseux trabéculaire [482].

Les souris **transgéniques OSM** montrent un phénotype ostéopétrotique lié à une augmentation de la formation et une diminution de la résorption osseuse ainsi qu'une fibrose pancréatique et des défauts de développement des tissus lymphoïdes [483].

Souris KO pour les cytokines

Les souris **déficientes pour l'IL-6** présentent des défauts de réponse immunitaire humorale, une réduction de la réaction de phase aigue [471], des défauts de régulation des cellules souches hématopoïétiques [484] ainsi que des défauts de régénération des hépatocytes [485]. Ces souris ne présentent pas de phénotypes osseux en conditions normales [486] mais sont protégées de l'ostéolyse induite par l'ovariectomie ou la PTH [456][487].

Les souris **déficientes pour le LIF** (homozygotes LIF^{-/-}) sont viables mais présentent un certain nombre d'anomalies.

- Ces souris présentent un déficit en neurones moteurs [488] et en cellules gliales associé à une altération de la fonction des oligodendrocytes [489] ainsi que des défauts de maturation des neurones olfactifs [490].

- Les femelles LIF^{-/-} sont fertiles mais le blastocyste ne peut pas s'implanter, ce qui a permis de définir le LIF comme une hormone de la nidation [473]. Ce défaut d'implantation est dû à une absence

de production de LIF par l'utérus, qui est normalement induit par l'œstradiol via p53 [491][492]. On peut noter que les souris p53^{-/-} présentent les mêmes défauts d'implantation que les souris LIF^{-/-} [493].

- Ce modèle montre que le LIF inhibe l'expression du VEGF induit par l'hypoxie [494] et montre également l'importance du LIF dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques [495].

- Les souris LIF^{-/-} sont plus petites suggérant un rôle du LIF dans la croissance post-natale. Au niveau osseux, on peut observer une augmentation de la formation des ostéoclastes sans modification du versant ostéoblastique, entraînant une diminution du volume osseux trabéculaire [455].

Les souris **déficientes pour l'OSM** se développent normalement mais présentent une réduction du nombre de neurones nociceptifs au niveau du ganglion spinal de la racine dorsale associé à une altération dans la réponse à la douleur [496]. Leur phénotype osseux n'a pas été publié.

Souris KO pour les récepteurs

Le modèle de souris **KO gp130** (gp130^{-/-}) est létal, du à un certain nombre d'anomalies. Ces souris présentent d'importants défauts cardiaques, hématologiques et neuronaux et meurent entre E12 et E16 [497]. De nombreuses anomalies du squelette peuvent être observées. L'analyse des ostéoblastes a révélé des défauts dans la fonction de ces cellules, comme une réduction du niveau d'expression de la PAL, et une incapacité à stimuler les ostéoclastes [498]. Pour pallier à ce problème de létalité, plusieurs modèles de gp130 KO conditionnels ont été réalisés dans lesquels la gp130 est délétée uniquement dans certains tissus ou organes (foie, poumon, cœur, lymphocytes T, neurones) grâce à des systèmes Cre-lox sous la dépendance de différents promoteurs spécifiques. Ces études révèlent un rôle clé de la signalisation gp130 pour contrebalancer les signaux proapoptotiques induits par un stress [499].

Le modèle de souris **KO LIFR** est létal au niveau périnatal du à de nombreux défauts de développement [500][360][501]. Des défauts du squelette avec réduction du volume osseux et ostéopénie, liés à une augmentation du nombre d'ostéoclastes et une diminution du nombre d'ostéoblastes ont été décrits. Des anomalies métaboliques ainsi que des défauts de développement du système nerveux avec une réduction du nombre d'astrocytes et de neurones moteurs sont aussi observés. Le LIFR étant utilisé par d'autres cytokines que le LIF, le phénotype de souris LIFR^{-/-} est beaucoup plus sévère que celui des LIF^{-/-}.

Les souris adultes **KO OSMR** présentent une diminution de la résorption osseuse par les ostéoclastes ainsi que de la formation osseuse par les ostéoblastes. Ces souris développent un phénotype ostéopétrotique, indiquant que l'OSMR joue un rôle important dans le maintien d'un remodelage osseux normal [502]. Les souris OSMR^{-/-} présentent également des défauts d'hématopoïèse [503], de lymphopoïèse et des anomalies de la régénération hépatique [504].

III. IL-6

A. Structure

Le gène codant pour l'IL-6 humaine est localisé sur le chromosome 7. Ce gène code pour un précurseur protéique de 212 acides aminés ensuite clivé au niveau de la partie NH₂-terminale pour donner une protéine de 184 acides aminés. L'IL-6 est une glycoprotéine de 21 à 28 kD incluant deux sites possibles de N-glycosylation et 4 résidus cystéine. Sa structure secondaire est caractérisée par 4 longues hélices α antiparallèles, structure commune à toutes les cytokines de type IL-6 [505].

B. Cellules productrices

L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules incluant les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les cellules NK, les fibroblastes, les ostéoblastes, les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales. Sa production est souvent induite par d'autres cytokines telles que l'IL-1 et le TNF α [505].

C. Récepteur

L'IL-6 se fixe à l'IL-6R puis à un homodimère de gp130 [351] [506] (Figure 28). L'IL-6R est une glycoprotéine de 80kD composée de 3 régions :

- Une région extracellulaire, en N-terminal comportant un domaine « Ig-like », un domaine CBD et trois domaines FnIII
- Une région transmembranaire
- Une courte région intracellulaire n'ayant aucun rôle dans la transduction du signal.

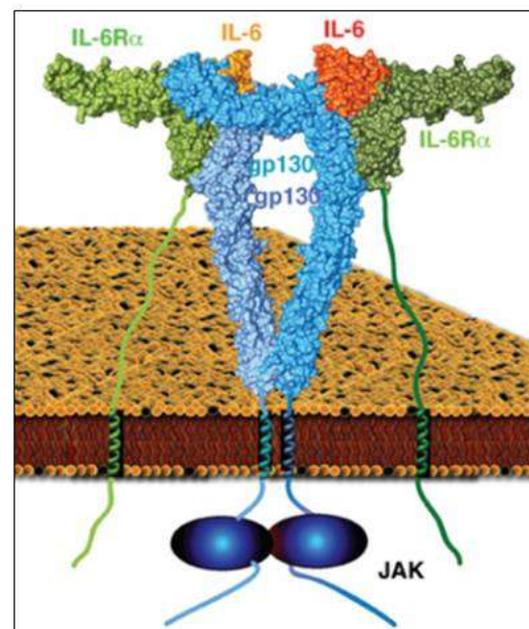


Figure 28: Le récepteur de l'IL-6
Modélisation moléculaire du complexe hexamérique gp130/IL-6/IL-6-R α [507].

L'IL-6R est principalement exprimé par les hépatocytes, neutrophiles, monocytes/macrophages, et lymphocytes. Ce récepteur a également été retrouvé dans des lignées tumorales issues par exemple de myélome, de plasmocytome ou de glioblastome [505].

De plus, il existe une forme naturelle soluble du récepteur (IL-6Rs), obtenue par épissage alternatif du transcrite ou par clivage protéolytique de la chaîne membranaire, qui fixe l'IL-6 avec la même affinité que la forme membranaire [508]. Ce complexe IL-6 / IL-6Rs est capable d'induire une signalisation dans des cellules exprimant uniquement la chaîne réceptrice gp130 mais pas l'IL-6R : ce phénomène est appelé « trans-signalisation » [509].

D. Activités biologiques

Effets sur le système immunitaire. L'IL-6 induit la production d'Ig par les lymphocytes B [510] et stimule la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T, notamment en lymphocytes T cytotoxiques en synergie avec l'IL-2 [511][512]. L'IL-6 joue également un rôle important dans la différenciation des lymphocytes Th17 [513].

Effets sur l'inflammation. L'IL-6 joue un rôle important dans la production des APP : alpha1 anti-chymotrypsine, CRP, fibrinogène et haptoglobine. L'IL-6 est également capable d'activer l'endothélium, via les L-selectin, pour favoriser l'infiltration leucocytaire [514]. La production d'IL-6 a pu être corrélée à de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoporose ou le psoriasis [515][516].

Effets sur l'hématopoïèse. L'IL-6 induit la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques multipotents [517] et est également impliquée dans la différenciation des macrophages et des mégacaryocytes [518].

Effets sur le système nerveux central. Cette cytokine est active sur l'axe hypothalamo-hypophysaire puisqu'elle stimule la production d'ACTH (adreno corticotropie hormone) par l'hypophyse via l'induction de CRH (corticotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus [519].

Effets sur les cellules osseuses. Comme d'autres cytokines de la famille, l'IL-6 présente des effets duals sur la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique. L'IL-6 associée à son récepteur soluble peut dans certains cas stimuler la différenciation ostéoblastique in-vitro [400][446] et dans d'autres inhiber cette différenciation [450]. De même, l'IL-6 associée à son récepteur soluble peut stimuler la formation d'ostéoclastes [453][452] ou l'inhiber [457].

Effets sur le développement tumoral. L'IL-6 (le plus souvent associée à son récepteur soluble) est capable d'inhiber la prolifération de nombreuses cellules tumorales de mélanome [459], de cancer du sein [520], d'ostéosarcome [460], de cancer pulmonaire ou de métastases hépatiques [462]. L'IL-6 induit la différenciation des neuroblastomes in-vivo [521]. En revanche, cette cytokine est également capable de stimuler la prolifération de cellules de mélanome à des stades avancés [466], de myélome [467], de cancer de la prostate [468] ou de glioblastome [522].

IV. OSM

A. Structure

Le gène codant l'OSM humaine, d'une taille de 9kb et composé de 3 exons, est localisé sur le chromosome 22 en q12, à seulement 12 kb du gène codant le LIF, suggérant que ces deux gènes dérivent d'une duplication en tandem relativement récente dans l'évolution [523]. Ils partagent de plus de nombreuses similarités de structure, au niveau de l'organisation introns/exons et des séquences promotrices [524]. On peut noter que le gène EWS se trouve également sur le chromosome 22 en q12.

L'OSM est tout d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur protéique (252 acides aminés) contenant un peptide-signal hydrophobe de 25 acides aminés à l'extrémité NH₂ terminale. La forme pro-OSM (227 acides aminés) est obtenue après clivage de ce peptide signal [525], puis la forme mature et active de l'OSM (196 acides aminés) est générée par clivage du pro-OSM en C-terminal [526]. Cette cytokine est produite par synthèse de novo puis libérée par la voie classique de sécrétion.

L'OSM est une glycoprotéine de 28kD formée de 4 hélices alpha antiparallèles [527] (Figure 29a). L'OSM humaine contient 5 résidus cystéine C6, C49, C80, C127 et C167, formant deux ponts disulfures intramoléculaires : C6-C127 et C49-C167. Relativement peu conservées, les formes humaine et murine de l'OSM ne montrent que 48% d'identité [528].

B. Cellules productrices

L'OSM est produite par les lymphocytes T activés, macrophages activés, cellules dendritiques et neutrophiles [529][530]. Cette cytokine est exprimée de façon abondante dans les tissus hématopoïétiques comme la moelle osseuse, le thymus et la rate [528]. D'un point de vue pathologique, l'OSM est exprimée localement dans des maladies inflammatoires telles que la polyarthrite ou le psoriasis. Au sein des tumeurs, il semble que cette cytokine soit produite par les macrophages ou neutrophiles infiltrant la tumeur plutôt que par les cellules tumorales [531].

C. Récepteurs

L'OSM est la seule cytokine capable de se lier directement à la gp130, formant ainsi un complexe de basse affinité incapable de transduire un signal. La gp130 va pouvoir constituer un hétérodimère en s'associant avec une deuxième sous-unité réceptrice, formant un récepteur de haute affinité actif. L'OSM peut se fixer sur 2 types de récepteurs (Figure 29b) :

Le récepteur de type I est un hétérodimère constitué de la chaîne gp130 et de la sous unité spécifique LIFR [532]. Il s'agit également du récepteur du LIF, CNTF, CT-1 et CLC. L'existence de ce récepteur explique en partie les nombreux effets similaires entre le LIF et l'OSM

Le récepteur de type II est un hétérodimère de gp130 et OSMR [533][534]. Utilisé de façon exclusive par l'OSM, il est responsable des activités spécifiques de cette cytokine [376].

Structure de l'OSMR

La chaîne réceptrice est composée de 3 domaines :

- Une région extracellulaire, en N-terminal, comportant un domaine CBD tronqué, un domaine Ig-like, un domaine CBD complet et trois domaines FnIII,
- Une région transmembranaire,
- Un domaine intracellulaire, contenant des motifs fonctionnels conservés, capable de transduire un signal.

L'OSMR présente une structure très proche de celle de la gp130 et du LIFR, avec 23,3% et 32,2% d'homologie respectivement.

L'OSMR est exprimée dans le tissu nerveux, les fibroblastes, les cellules épithéliales, certaines cellules de la moelle osseuse, et de nombreuses cellules tumorales [534], ainsi que dans la trachée, le thymus et la peau [475].

Deux autres formes de récepteur à l'OSM ont également été décrites :

- La forme courte de l'OSMR (OSMRs - short-form OSMR) est exprimée dans les adénocarcinomes pulmonaires et son expression est corrélée à la mauvaise survie des patients [535]. Ce récepteur est localisé au niveau de la membrane cellulaire et se comporte comme un récepteur leurre qui réduit l'effet inhibiteur de l'OSM sur la croissance cellulaire.
- La forme soluble de l'OSMR (sOSMR) est exprimée dans les carcinomes œsophagiens et est générée par épissage alternatif [536]. L'OSM est capable de se fixer à cette chaîne réceptrice, qui pourrait se comporter comme un récepteur neutralisant. Dans cette étude l'OSM signale majoritairement via le LIFR.

Différences inter-espèces

Les notions présentées ici concernent la cytokine et ses récepteurs chez l'homme, il existe néanmoins des différences entre les espèces. Chez la souris, l'OSM murine ne peut transduire un signal que via le récepteur gp130/OSMR. Pour les études inter-espèces il faut savoir que l'OSM murine ne se fixe à aucun des 2 récepteurs humains, alors que l'OSM humaine peut activer uniquement le récepteur gp130/LIFR murin [537] (Figure 29c).

Cette notion peut être utilisée pour évaluer l'impact de chaque chaîne réceptrice dans un effet biologique donné. Les effets observés après stimulation par l'OSM humaine chez la souris peuvent

ainsi être attribués à l'activation du LIFR alors que les effets observés après stimulation par l'OSM murine chez la souris sont dépendant de l'OSMR.

Mais cette théorie a récemment été remise en cause par l'équipe de NA Sims [502]. Leurs travaux ont montrés que l'OSM murine stimule l'ostéogenèse et la formation des ostéoclastes dans les cellules de souris via l'OSMR. Cependant, sur des ostéoblastes de souris OSMR^{-/-} (théoriquement incapables de répondre à l'OSM), l'OSM murine inhibe la sclérostine (un inhibiteur de l'ostéogenèse), et stimule toujours la formation osseuse. Contrairement à ce qui était admis, cette signalisation pourrait être permise par le LIFR ou par un autre récepteur qui reste à identifier.

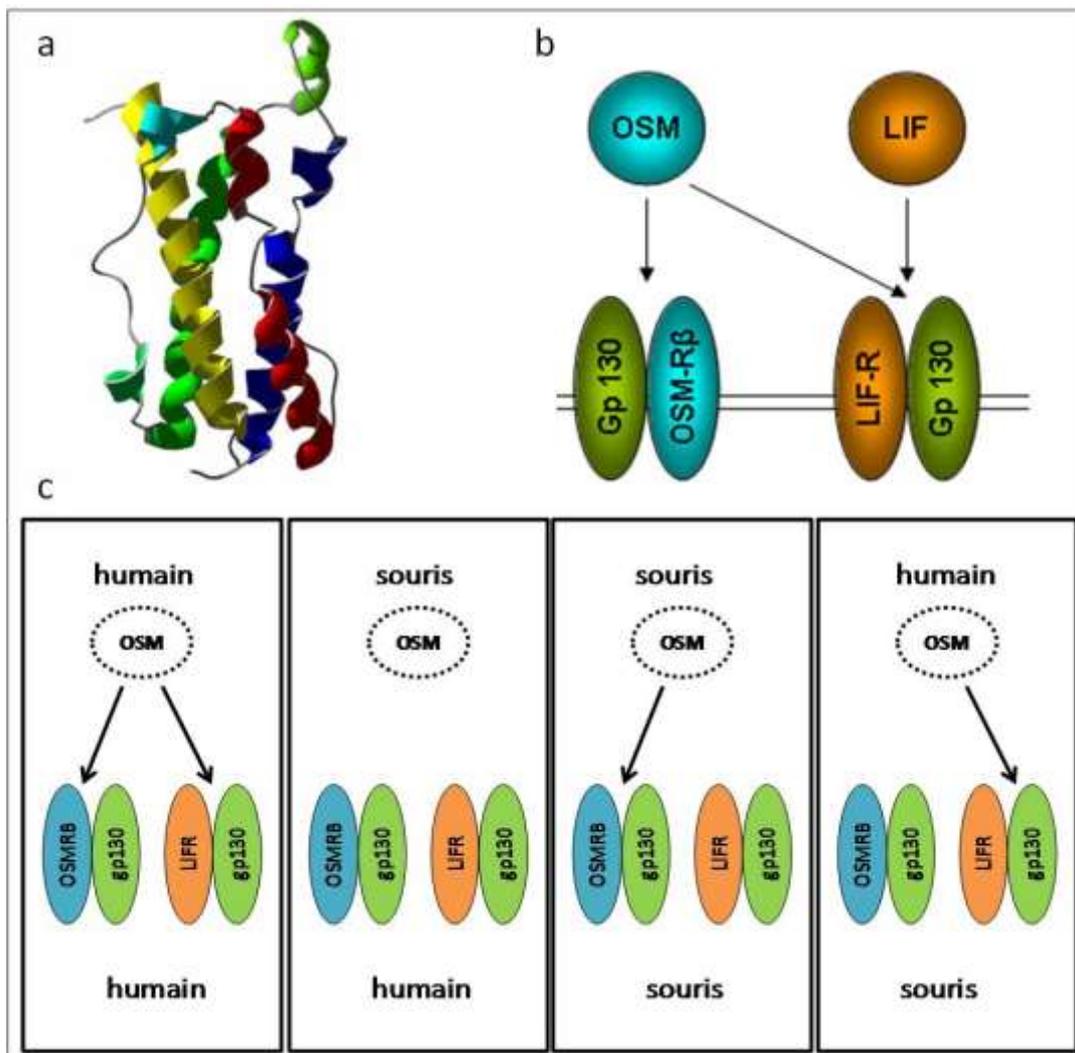


Figure 29: L'OSM et ses récepteurs

a- Structure tridimensionnelle de l'OSM [538]. b- Schéma des récepteurs de l'OSM et du LIF chez l'homme. c- Représentation des récepteurs à l'OSM chez l'homme et la souris. L'OSM humaine se fixe à deux récepteurs de haute affinité: le récepteur de type I (hgp130+hLIFR), et le récepteur de type II (hgp130+hOSMR). L'OSM murine ne peut se fixer qu'à son récepteur spécifique (mgrp130+mOSMR). Par contre, l'OSM humaine, qui ne se fixe pas au récepteur à l'OSM murine, est capable de transduire un signal via le récepteur au LIF murin.

D. Activités biologiques générales

1. Effets sur l'inflammation

L'OSM est une cytokine pro-inflammatoire capable d'induire les APP dans les hépatocytes [539]. L'OSM induit également l'inflammation de manière indirecte en stimulant la production d'IL-6 dans les cellules endothéliales [540] ou en stimulant l'expression de l'IL-6R dans des cellules hépatiques [541]. Cette cytokine joue un rôle dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires [542], notamment en induisant l'expression par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) [543]. L'OSM peut également favoriser l'infiltration de polynucléaires éosinophiles au site inflammatoire en stimulant l'expression de chimiokines tel que l'eotaxine-1 [544]. L'OSM participe à l'inflammation cutanée et à la cicatrisation, en effet, une augmentation de l'expression de l'OSM est retrouvée dans les lésions de psoriasis et de dermatite atopique [441][545].

La production d'OSM, suite à l'injection d'un adénovirus codant l'OSM murine au niveau du genou de souris induit une inflammation localisée avec destruction du cartilage et de l'os sous-chondral mais également une formation osseuse périostée [546]. L'inflammation induite par l'OSM dans ce modèle de polyarthrite rhumatoïde (PR) est en revanche indépendante de l'IL-6. Lors d'une réaction inflammatoire, le remodelage de la MEC joue un rôle important pour la cicatrisation des tissus endommagés. L'OSM augmente la production de MMP dans les chondrocytes humains et participe alors à la destruction du cartilage [547]. Produite localement par les macrophages des patients atteints de PR, l'OSM est donc associée à la fois à une dégradation de la MEC et à une stimulation de la production de médiateurs proinflammatoires [548].

A l'inverse, l'OSM peut réguler négativement le processus inflammatoire, par exemple en inhibant l'expression de l'IL-8 et du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induits par l'IL-1 dans des cultures de fibroblastes [549].

2. Hématopoïèse et lymphopoïèse

Chez la souris, l'OSM est impliquée dans l'hématopoïèse fœtale en stimulant les cellules endothéliales de la zone aortique induisant l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques [550]. L'OSM favorise également l'hématopoïèse adulte en activant les cellules stromales de la moelle osseuse pour maintenir les progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes [503].

L'OSM est impliquée dans la lymphopoïèse et sa surexpression conduit à un phénotype auto-immun létal et à des modifications dans le développement du tissu lymphoïde, une splénomégalie ainsi que des ganglions volumineux dus à une lymphoprolifération de cellules T [483]. Ces cellules T extra-

thymiques proliférant plus vite que les cellules T classiques, elles acquièrent des caractéristiques de cellules T mémoires mais sont plus sensibles à l'apoptose [551].

3. Développement hépatique et neuronal

L'OSM est impliquée lors du développement embryonnaire en stimulant la maturation fonctionnelle des hépatocytes fœtaux en induisant l'expression de marqueurs hépatiques, l'accumulation de glycogène et la synthèse lipidique [552]. Chez l'adulte, l'OSM favorise la régénération hépatique [553].

L'OSM est également impliquée dans le développement du système nerveux central et notamment des neurones nociceptifs [496] et joue un rôle neuroprotecteur important puisqu'elle réduit la mort neuronale induite par le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) [554].

4. Effets sur les tissus squelettiques

Cartilage. L'OSM induit la dégradation de la matrice extracellulaire dans le cartilage [555] en modifiant l'équilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs (TIMP).

Ostéoclastes. L'OSM stimule la différenciation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse [452]. Contrairement à l'effet direct de l'OSM sur les ostéoblastes, l'ostéoclaste n'ayant pas de récepteur à l'OSM, l'effet est indirect notamment via la relargage de RANKL par l'ostéoblaste [556].

Ostéoblastes. Sur des cellules issues de calvaria de souris, l'OSM présente des effets différents selon le stade de différenciation des cellules. L'OSM induit la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse aux stades précoces, alors qu'elle inhibe la formation osseuse à des stades tardifs [451][450]. Etant donné que la différenciation terminale des ostéoblastes en ostéocytes est caractérisée par une diminution de l'expression des marqueurs ostéoblastiques, il est possible que l'OSM induise une différenciation de type ostéocytaire.

Article en Annexe 5

Un traitement à long terme par l'Oncostatine M induit une différenciation de type ostéocytaire dans des cellules d'ostéosarcome et de calvaria.

E. Effets sur le développement tumoral

L'OSM peut favoriser ou au contraire limiter le développement tumoral en agissant sur la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose, le microenvironnement ou la dissémination métastatique. Les mécanismes régissant l'effet pro ou antiprolifératif de l'OSM, qui semble dépendant du type de tumeur ou de son niveau de différenciation, ne sont à ce jour pas compris.

1. Effets anticancéreux :

Les effets anticancéreux de l'OSM sur de nombreuses tumeurs solides [376] sont liés à ses capacités d'inhibition de prolifération, d'induction de l'apoptose et de stimulation de la différenciation.

Mélanome. L'OSM a initialement été identifiée par sa capacité à inhiber la prolifération tumorale des cellules de la lignée de mélanome A375 [557]. Cet effet antiprolifératif a pu être confirmé dans différentes études [459]. In-vitro, la prolifération des mélanocytes et des lignées cellulaires issues de mélanomes de stades précoces est inhibée par l'OSM, cependant les lignées cellulaires issues des lésions plus avancées ou métastatiques peuvent perdre leur sensibilité [558] notamment par perte du récepteur OSMR [559] ou par surexpression des SOCS [560]. L'OSM a également été montrée comme étant capable d'inhiber les métastases pulmonaires des cellules B16 de mélanome murin [461]. De plus, une corrélation a pu être établie entre la sensibilité des cellules de mélanomes à l'OSM et la survie sans rechute de patients atteints de mélanome de grade III et traités avec des TILs. Cette corrélation est vraisemblablement due à une inhibition directe de la prolifération des cellules de mélanomes par l'OSM [463].

Ostéosarcome. In-vitro, l'OSM humaine diminue la prolifération d'une lignée d'ostéosarcome MG63 par un blocage du cycle en phase G1. Ces cellules acquièrent un phénotype ostéoblastique plus marqué caractérisé par une induction de la phosphatase alcaline. Cet effet pro-différenciation met en jeu la voie JAK-STAT et la protéine p21WAF1 [400][561]. De plus l'OSM sensibilise les cellules à l'apoptose induite par des agents de chimiothérapie conventionnelle via STAT5 et p53 [460]. Cet effet a également pu être démontré in-vivo où la surexpression de l'OSM murine en association avec l'inhibiteur de kinase Midostaurin, ralentit la progression d'ostéosarcome chez le rat [562].

Cancer du sein. L'OSM diminue la prolifération de lignées de cancer du sein associé à un blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une induction de la différenciation [563]. Cet effet est corrélé à des changements morphologiques des cellules qui deviennent plus allongées, hétérogènes avec un noyau et un cytoplasme plus importants. L'OSM peut également réduire la prolifération des cellules épithéliales de la glande mammaire (non-tumorales) et induire leur différenciation, visualisée par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques [564][565]. L'arrêt du

cycle cellulaire est notamment caractérisé par l'induction de C/EBPdelta (CCAAT/Enhancer Binding Protein delta)[397].

Adénocarcinome pulmonaire. L'OSM est capable d'inhiber la prolifération de lignées de carcinome pulmonaire in-vitro [474] et d'induire leur différenciation [566]. De plus, dans un protocole de thérapie génique avec l'OSM combiné à la radiothérapie, une régression des tumeurs a pu être observée chez les souris [567]. L'OSM apparaît donc comme un facteur favorable dans le traitement des adénocarcinomes pulmonaires, d'autant que l'expression du récepteur leurre OSMRs, réduisant la sensibilité des cellules à l'OSM, est un facteur de mauvais pronostic [535].

Hépatocarcinome. In-vitro, l'OSM diminue la prolifération des cellules HepG2 en bloquant les cellules en phase G1 du cycle. Ceci est associé à la phosphorylation de STAT3, STAT5 et ERK et à une accumulation de p27kip1 [568].

Gliome. L'OSM induit la différenciation et inhibe la prolifération de lignées de gliome, ceci étant associé à des changements morphologiques [569]. L'OSM inhibe la prolifération d'astrogliomes et de cultures primaires de glioblastome via le complexe gp130/OSMR [570].

2. Effets pro-cancéreux

Les effets procancéreux de l'OSM peuvent être liés à une induction de la prolifération mais également à ses effets proangiogéniques ou d'induction de la dissémination métastatique. Ainsi, l'OSM stimule la prolifération des fibroblastes normaux [376] et de certaines tumeurs. De plus cette cytokine peut avoir un effet dual au sein d'une même tumeur en inhibant la prolifération mais en favorisant la dissémination métastatique par exemple.

Stimulation de la prolifération cellulaire. L'OSM est capable de stimuler directement la prolifération cellulaire de lignées de myélome [348] [571] ou de sarcome de Kaposi [572] pour lesquels la voie des MAPKs semble indispensable.

Induction de la dissémination métastatique. Bien que l'OSM inhibe la prolifération des astrogliomes, cette cytokine n'empêche pas la dissémination métastatique des cellules car elle augmente l'expression des MMP-2 et MMP-9 [570]. De même, l'OSM inhibe la prolifération des lignées de cancer du sein mais augmente l'expression du facteur proangiogénique VEGF, stimule le détachement de ces cellules et leur capacité invasive [531]. Une seconde étude sur la lignée T47D a montré des résultats similaires : perte d'adhérence au substrat, changements morphologiques, augmentation de la capacité invasive, mais également sécrétion de protéases lysosomales telles que la cathepsine D et L [573]. De plus, dans les carcinomes squameux du col de l'utérus, la surexpression de l'OSMR apparaît un facteur de mauvais pronostic, l'OSM augmentant notamment l'expression du VEGF [574].

V. LIF

A. Structure

Le LIF a initialement été décrit comme une glycoprotéine sécrétée dont le gène est constitué de 3 exons [575]. Le LIF humain est une protéine de 180 acides aminés constituée de 4 hélices alpha, d'un poids moléculaire de 37 à 62 kD selon son degré de glycosylation [576]. Les sites de glycosylation du LIF peuvent contenir des résidus mannose 6 phosphate, qui en se liant au récepteur du M6P participent au recyclage cellulaire de la cytokine [577][578].

L'absence d'activité des anticorps neutralisant a mis en avant l'existence possible d'une forme intracellulaire de la protéine LIF dans les cellules d'hépatome humain [579]. Le LIF existe au moins sous 3 isoformes, qui diffèrent au niveau du premier exon codant pour différents peptides signaux permettant le ciblage de la protéine [580][581] :

- Une forme soluble (LIF-D)
- Une forme localisée dans la matrice extracellulaire (LIF-M)
- Une forme intracellulaire nucléaire (LIF-i ou LIF-T) de 17kD résultant d'une absence de traduction de l'exon 1. Cette forme a des activités proapoptotiques dans les lignées COS et 293FT [582] mais sa fonction n'a pas été étudiée dans d'autres types cellulaires.

B. Cellules productrices

Le LIF est sécrété par de nombreux types cellulaires dont les fibroblastes, les lymphocytes T activés, les monocytes/macrophages, les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules ostéoblastiques, les cellules endothéliales, les astrocytes mais également les cellules tumorales [556][583][584].

C. Récepteur

Le récepteur du LIF est un hétérodimère formé de la chaîne réceptrice de faible affinité LIFR associée à la chaîne de haute affinité gp130. La structure du LIFR est très proche de celle de l'OSMR (Figure 30a). Des hétérodimères préformés peuvent être présents à la surface cellulaire en absence du ligand, toutefois la fixation du LIF augmente l'interaction entre ces sous-unités [585]. La stœchiométrie du complexe fonctionnel ligand/récepteur n'est pas connue mais des analyses de cristallographie récentes ont montré que ce complexe est un trimère de gp130, LIFR et LIF [507][586] (Figure 30b). Même si les formes humaines et murines de la cytokine et de son récepteur présentent

une grande identité de séquence (78% d'homologie entre mLIF et hLIF et 76% d'homologie entre mLIFR et hLIFR), il existe des problèmes de cross-réactivité entre espèces. Le LIF de souris ne peut se fixer qu'au LIFR de souris alors que le LIF humain peut se lier au LIFR humain et murin [587].

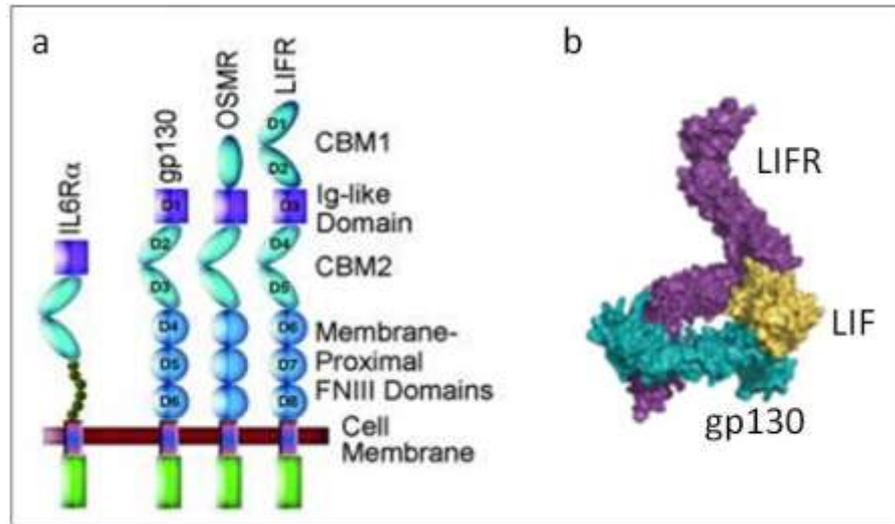


Figure 30: Le récepteur du LIF

a- Représentation des domaines qui constituent les chaînes réceptrices LIFR, OSMR, gp130 et IL-6R [586]. b- Représentation du complexe LIF/LIFR/gp130 [507]

D. Activités biologiques

1. Effets sur la différenciation

Inhibition de la différenciation. Le LIF maintient la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Il a en effet un rôle majeur en contrôlant la prolifération et la différenciation des ESC murines via STAT3, et est utilisé en routine pour cultiver ces cellules. Cet effet est dépendant de l'espèce puisque les ESC humaines n'ont pas besoin de LIF mais plutôt d'activin et de FGF pour maintenir leur statut indifférencié [588] mais ceci pourrait être dû au fait que les embryons utilisés pour obtenir des ESC humaines sont un peu plus matures que ceux utilisés chez la souris [589]. Dans les ESC de souris, la signalisation LIF/STAT3 induit l'expression de différents facteurs de transcription de souche. Selon le contexte cellulaire, STAT3 pourrait être associé à différents partenaires tels que NANOG comme cela a été montré dans certaines cellules tumorales [590]. Le LIF induit l'expression de C-MYC [39][591] et KLF4 [40], tous les deux importants pour l'autorenouveau des ESC murines. Le LIF régule également la différenciation des MSC de la moelle osseuse. En effet, la sécrétion de LIF par les MSC humaines diminue au cours de leur différenciation dans les lignées adipogéniques et ostéoblastiques [592]. De plus, le LIF favorise la prolifération et la survie des cellules germinales, des progéniteurs hématopoïétiques, des mégacaryocytes, des myoblastes et des cellules neurales [593][594][595].

Induction de la différenciation. A l'inverse, le LIF induit par exemple la différenciation:

- d'une lignée de cellules de leucémie myéloïde M1 en macrophages [596]
- de préadipocytes en adipocytes via la voie MAPK [597]
- d'ESC en cellules musculaires cardiaques, en association avec la BMP-2 via STAT3 et ERK [598]
- de cellules souches cardiaques en cellules endothéliales en activant STAT3 et ERK [599].

2. Fonctions inflammatoires et immunitaires

La production de LIF est maintenue au cours de la gestation par la progestérone, vraisemblablement pour induire un environnement de tolérance immunitaire [600]. Des taux élevés de LIF sont associés à une meilleure tolérance dans le cadre d'une transplantation, en régulant la fonction cellulaire des cellules Treg [601]. A l'inverse, la production de LIF peut être associée à des pathologies inflammatoires ou autoimmunes et notamment dans l'arthrite ou le psoriasis [602][603].

3. Rôle dans le développement tumoral

Effets procancéreux. Les effets procancéreux du LIF ont été décrits dans de nombreux types de tumeurs. Le LIF est un facteur de croissance in-vitro dans des lignées de tumeur mammaire. Une expression importante du LIF a été observée dans ces tumeurs [604] et celle-ci est induite par des mécanismes épigénétiques au cours du développement du cancer du sein [605]. La fonction immunosuppressive du LIF peut être délétère en permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Ceci a pu être montré dans un modèle de cancer ovarien où le LIF, sécrété par les cellules tumorales, induit la différenciation des monocytes en TAM ayant des propriétés très immunosuppressives [606]. Le LIF apparaît comme un facteur prométastatique dans les rhabdomyosarcomes in-vitro et in-vivo en favorisant le chimiotactisme et l'adhésion des cellules tumorales au niveau du foie et en augmentant la résistance à des agents cytostatiques [607]. Le LIF est décrit comme un facteur pro-oncogénique dans le développement initial des gliomes [608], il favorise la dissémination métastatique des mélanomes au niveau de l'os [609] et est un facteur de croissance pour les cellules de carcinome pancréatique [610].

Inhibition de prolifération. Toutefois, quelques études décrivent à l'inverse des effets antitumoraux du LIF puisque cette cytokine inhibe la prolifération de lignées de gliome in-vitro [611] ou de cellules de cancer thyroïdien [612].

4. Autres fonctions

Le LIF est naturellement produit par la paroi utérine, sous le contrôle du pic d'œstradiol et est particulièrement important pour l'implantation du blastocyste [613][473]. Le LIF a un rôle essentiel

dans l'involution de la glande mammaire après la lactation en induisant l'apoptose des cellules épithéliales de la glande mammaire [396]. D'autre part, le rôle du LIF dans la physiologie de l'os n'est pas très clair puisque selon les cas, cette cytokine peut stimuler la différenciation ostéoclastique [452] ou l'inhiber [455] et stimuler la différenciation ostéoblastique [400] ou l'inhiber [449].

VI. Résumé : Cytokines et tumorigenèse

De manière générale, nous pouvons dire que les cytokines de la famille de l'IL-6 présentent un effet dual en cancérologie.

- Tout d'abord il s'agit d'un effet dual sur la prolifération cellulaire puisqu'une même cytokine peut induire la prolifération de certaines tumeurs et inhiber la prolifération d'autres.
- Mais il s'agit également d'un effet dual sur le processus de tumorigenèse car pour une même tumeur, ces cytokines peuvent d'un côté inhiber la prolifération, mais d'un autre côté favoriser le développement tumoral en jouant sur l'inflammation, l'adhésion, l'endothélium et la dissémination métastatique.

Cette balance est dépendante de chaque type de cancer et peut varier selon le stade de développement de celui-ci. Dans le contexte du développement de stratégies antitumorales, ces cytokines peuvent être soit des cibles soit des agents thérapeutiques.

- L'utilisation de cytokines recombinantes requiert le contrôle des effets secondaires liés à leur administration. En effet, l'injection d'OSM à des animaux induit une inflammation généralisée et une cachexie.
- Des agents tels que des anticorps monoclonaux ou petites molécules inhibitrices peuvent permettre de cibler ces cytokines, leurs récepteurs ou les voies de signalisation [614].

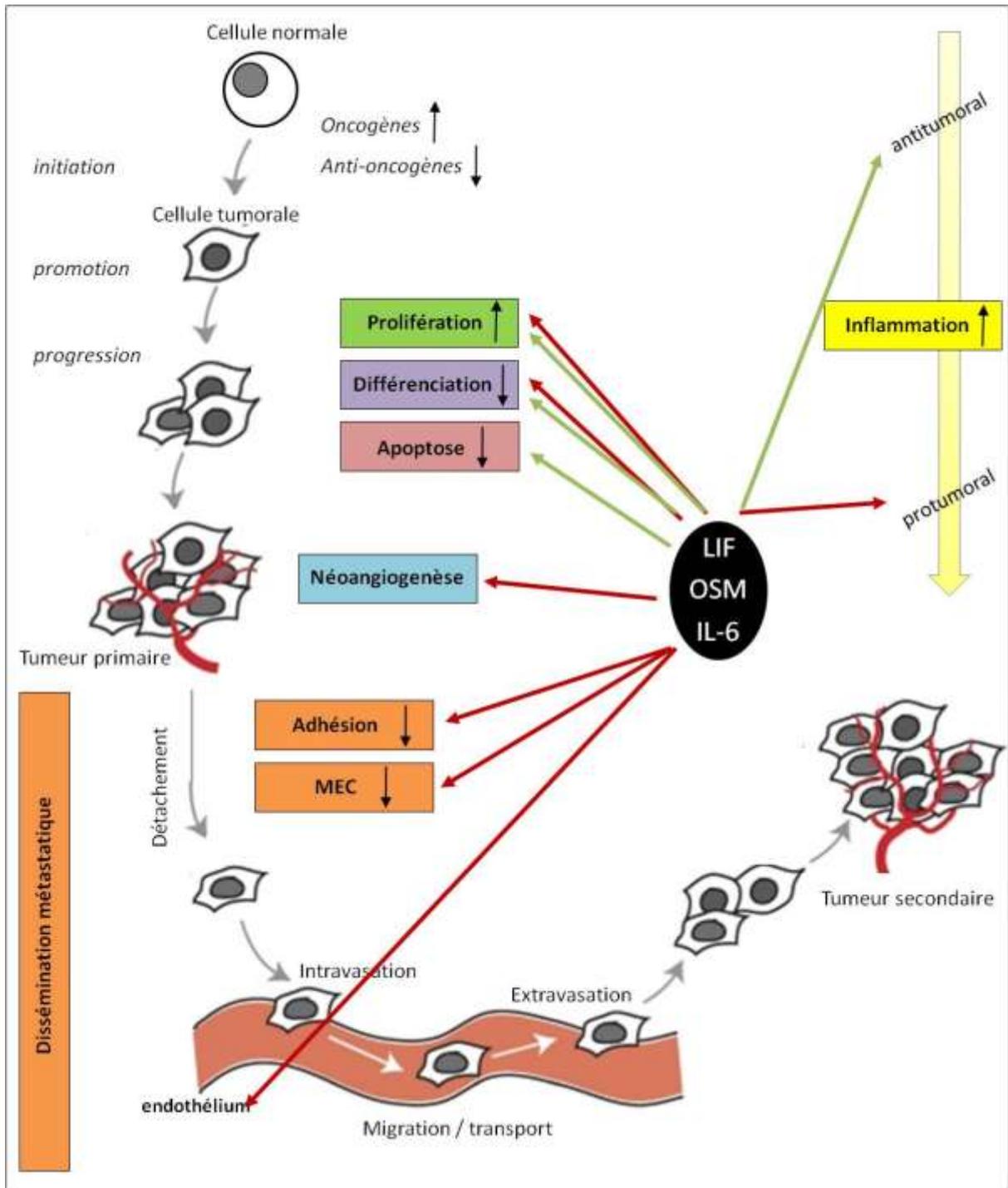


Figure 31: Implication des cytokines OSM/LIF/IL-6 sur le processus de tumorigenèse

Ce schéma synthétise les effets de l'OSM, du LIF et de l'IL-6 sur les différentes phases de la tumorigenèse. Les flèches vertes indiquent des effets antitumoraux et les flèches rouges des effets protumoraux. Ce schéma met en évidence l'effet dual de ces cytokines sur le développement tumoral.

5^{ème} Partie : Objectifs de la thèse

L'os est un tissu vivant en constant renouvellement et les cellules le composant peuvent subir des mutations et dérèglements à l'origine d'un processus tumoral. On compte trois grands types de tumeurs osseuses primitives : les ostéosarcomes, les chondrosarcomes et les sarcomes d'Ewing, qui semblent tous finalement dériver d'une seule et même cellule, la cellule souche mésenchymateuse. Ces tumeurs diffèrent par leur statut de différenciation, leur localisation, leurs caractéristiques histologiques et la population touchée.

L'OSM et le LIF sont des cytokines de la famille de l'interleukine 6, médiateurs solubles pléiotropes et redondants, impliqués notamment dans le développement, l'inflammation et la réparation tissulaire. L'OSM et dans une moindre mesure le LIF ont déjà démontré leur activité sur divers types tumoraux. L'OSM est capable d'inhiber la prolifération de certaines tumeurs solides, cependant dans d'autres types tumoraux, l'OSM favorise la prolifération tumorale ou la dissémination métastatique. Mais les raisons de cette dualité vis-à-vis du processus de tumorigenèse ne sont à ce jour par encore connues. Notamment au laboratoire, l'effet anticancéreux de l'OSM sur les ostéosarcomes a été démontré. In-vitro l'OSM inhibe la prolifération de lignées d'ostéosarcome, induit leur différenciation et les sensibilise à la mort induite par des agents comme la Staurosporine ou la Doxorubicine [460]. Cette synergie entre OSM et inducteur de mort a également été observée in-vivo. Dans un modèle syngénique d'ostéosarcome de rat en site osseux, l'association d'OSM (administré par adénovirus) avec la Midostaurine (un dérivé de la Staurosporine) est capable de réduire le développement de la tumeur primaire ainsi que la dissémination métastatique pulmonaire et d'augmenter la survie [562]. L'OSM a donc un effet anticancéreux direct sur les ostéosarcomes.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier le rôle potentiel de l'OSM, et dans un second temps du LIF, sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des sarcomes d'Ewing et des chondrosarcomes, afin de définir si les résultats obtenus sur les ostéosarcomes pouvaient être étendus aux autres tumeurs osseuses primitives.

Je me suis intéressée dans un premier temps au rôle de l'OSM dans la biologie des chondrosarcomes. La cytokine s'étant révélée antitumorale in-vitro et in-vivo, les objectifs ont alors été de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'OSM dans les chondrosarcomes, en comparaison de ce qui était déjà connu sur ses effets antiprolifératifs dans d'autres tumeurs. Le but était également d'évaluer l'impact osseux de l'OSM dans le contexte du chondrosarcome ainsi que ses éventuels effets protumoraux liés à la dissémination métastatique.

Dans un second temps, mes études se sont portées sur les sarcomes d'Ewing, où l'OSM mais également le LIF se sont montrées des cytokines protumorales. Dans ce contexte, outre la compréhension du mécanisme d'action de l'OSM dans les sarcomes d'Ewing, l'objectif a été de comprendre quelles différences moléculaires entre les 3 types de tumeurs osseuses primitives pouvaient expliquer des réponses inverses vis-à-vis de l'OSM. Cette étude fondamentale sur des tumeurs rares pourrait potentiellement apporter des réponses à l'effet dual de l'OSM sur les autres types de tumeurs.

RÉSULTATS

1^{ère} partie : Effet antitumoral de l'OSM
sur les chondrosarcomes

I. Introduction

Les CS sont des tumeurs osseuses primitives caractérisées par la formation d'une matrice cartilagineuse importante et par une faible vascularisation. Les cellules tumorales dérivent des MSC et sont plus ou moins différenciées dans la voie chondrocytaire. L'objectif était d'étudier l'effet de l'OSM sur des modèles cellulaires et précliniques de CS présentant ces caractéristiques.

A. Etudes in-vitro

Malgré le faible nombre de lignées de CS établies et disponibles à la vente, notre étude est basée sur 4 lignées humaines et 1 lignée de rat représentant différents grades, statuts de différenciation et statuts p53 (Tableau 1). La moyenne d'âge des patients est de 71 ans.

Lignée cellulaire			Tumeur d'origine			
Espèce	Nom de la lignée	Statut p53	Classification	Grade	Localisation	Age du patient
Humain	SW-1353	Muté	Conventionnel	II	Humérus	72 ans
	CAL-78	Muté	Dédifférencié	III	Récurrence musculaire	76 ans
	OUMS-27	Muté	Conventionnel	III	Humérus	65 ans
	BCS-CH-03	Muté	Dédifférencié	III	Fémur	73 ans
Rat	SRC	Sauvage	Conventionnel	II		

Tableau 1: Caractéristiques des lignées de chondrosarcome

Tout comme les chondrocytes, ces 5 lignées de CS cultivées en 2D sont caractérisées par :

- une morphologie très étalée
- la production d'une matrice (rendant difficile leur décollement lors des repiquages)
- leur faible taux de division cellulaire (temps de doublement de 2 à 7 jours selon les lignées)
- l'expression de marqueurs chondrocytaires *COLL2*, *COLL10*, *ACAN*, *SOX9* et *CBFA1* (qui reste toutefois faible dans ces conditions de culture)

Du fait de l'absence de cross-réactivité entre espèces, les cellules humaines ont été traitées avec l'OSM recombinante humaine (R&D, 295-OM, 22kD) et les cellules de rat avec l'OSM murine (R&D, 495-MO, 21kD) à 50ng/mL.

L'objectif est alors d'étudier l'effet de l'OSM sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des lignées de chondrosarcome.

- La prolifération a été appréhendée par des tests de viabilité cellulaire (colorimétrique « XTT » ou luminescent « Vialight »), des comptages cellulaires, l'étude de la répartition des cellules au sein du cycle par cytométrie en flux ou l'analyse des protéines du cycle cellulaire par Western blot. Les voies de signalisation impliquées ont été déterminées par Western-blot et en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des kinases et facteurs de transcription activés classiquement par l'OSM.
- L'apoptose a été évaluée par comptage cellulaire, mesure d'activité caspase ou étude des protéines de l'apoptose par western blot.
- La différenciation a pu être mise en évidence en étudiant la morphologie, l'adhésion et l'expression de marqueurs de la différenciation chondrocytaire dans les cellules.

B. Etudes in-vivo

Les études in-vivo ont ensuite été réalisées en utilisant le modèle syngénique de chondrosarcome de Swarm chez le rat (SRC). Les rats utilisés pour ce modèle sont des Sprague Dawley OFA mâles de 5 semaines.

Le protocole consiste à prélever la tumeur après euthanasie d'un rat donneur, puis d'en implanter un fragment de 2x2x2mm en paratibial chez un rat receveur. Pour ce faire, une incision de 5 mm est réalisée dans le muscle paratibial sur une profondeur permettant d'atteindre l'os tibial. Le fragment tumoral est alors déposé dans la logette créée, au contact de l'os. Les plans musculaires et cutanés sont ensuite suturés. La tumeur commence à être palpable/mesurable environ 15 jours après cette transplantation (Figure 32a). Si le geste chirurgical est correctement réalisé, l'incidence atteint les 100%.

La tumeur est composée de lobules non vascularisés constitués uniquement de cellules chondrosarcomateuses volumineuses enchâssées dans une matrice cartilagineuse abondante (coloration bleu alcian). Les cellules tumorales présentent un index mitotique plutôt faible (Ki67) et les cellules en division sont uniquement localisées à la périphérie des lobules tumoraux. Ces lobules sont séparés par un tissu stromal tumoral ne contenant pas de matrice cartilagineuse mais des fibroblastes, des cellules inflammatoires et quelques vaisseaux sanguins. (Figure 32b et c). Mis à part au centre des gros lobules, cette tumeur est peu sujette à la nécrose. Le développement tumoral induit une formation osseuse ectopique mais ne donne pas ou peu de métastases pulmonaires (probablement dû à la faible vascularisation).

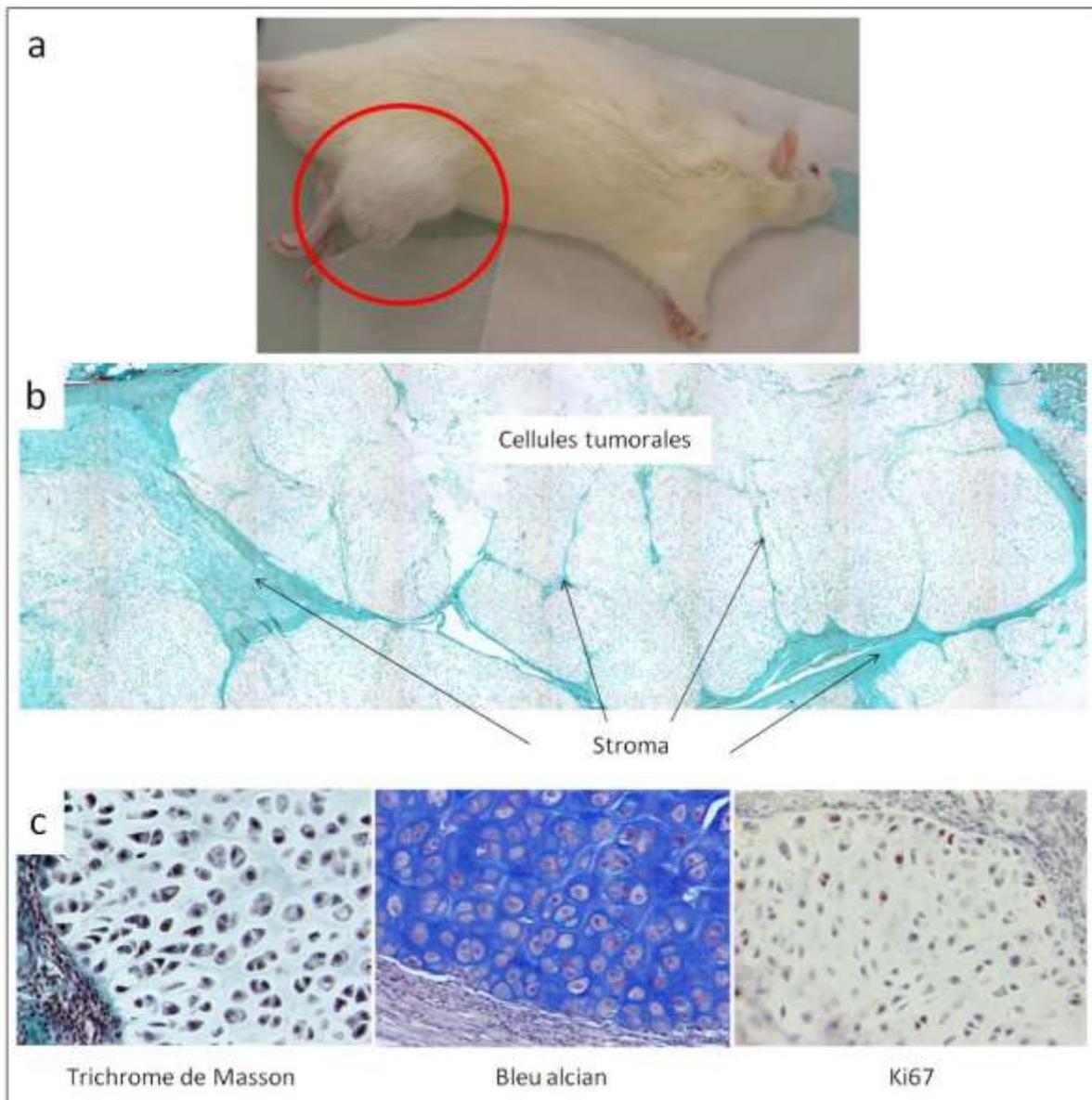


Figure 32: Caractéristiques du modèle de chondrosarcome de Swarm

a- développement de la tumeur 35 jours après son implantation chez un rat. b- Histologie, aspect général de la tumeur sous forme de lobules (Trap + contre coloration vert lumière) grossissement x40. c- Histologie de la périphérie d'un lobule (Trichrome de Masson, Bleu alcian, Ki67) grossissement x100.

A défaut d'OSM recombinante de souris en quantité, le traitement a été réalisé par injection d'un adénovirus codant pour l'ADNc de l'OSM murine (AdOSM) [615]. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire, possédant une capsid mais pas d'enveloppe. Les particules virales peuvent pénétrer par endocytose dans une cellule hôte, et après décapsidation, leur ADN pénètre dans le noyau mais n'est pas intégré dans le génome. La technique de thérapie génique consiste à ajouter une séquence d'intérêt à un virus rendu non pathogène, dans le but que les cellules transduites par ce virus expriment la protéine d'intérêt. La production protéique est limitée dans le temps et l'adénovirus ne peut être réadministré de par son potentiel immunogène.

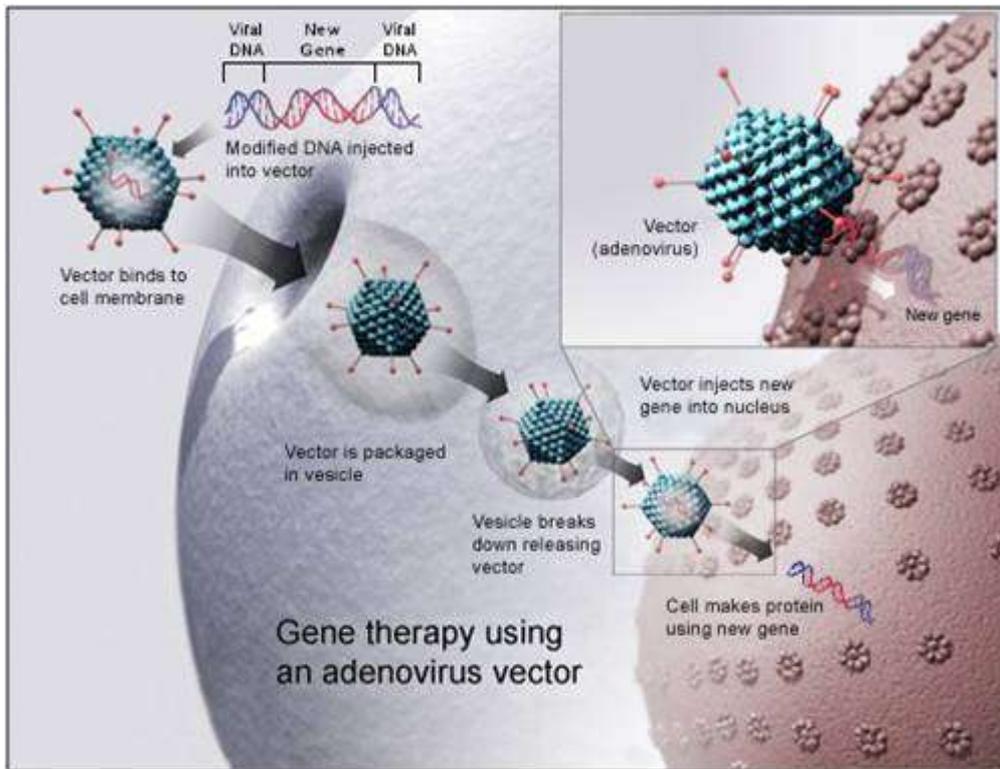


Figure 33: Principe du transfert de gène par technique adénovirale
http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Gene_therapy.jpg

L'objectif est d'établir la preuve de concept préclinique des effets de l'OSM sur le développement du chondrosarcome de rat. Nous avons opté pour un protocole curatif, consistant à injecter l'AdOSM quand le volume tumoral atteint les 2000mm³. Deux sites d'injection ont été testés : le muscle tibial de la patte controlatérale ou la tumeur elle-même.

- L'effet de l'OSM sur la croissance tumorale a été évalué par la mesure du volume tumoral, la survie des animaux, et par immunohistochimie Ki67 ou marquage TUNEL.
- L'effet sur la différenciation cellulaire, le remodelage osseux, ou l'angiogenèse a été mis en évidence par microCT, marquage TRAP et ALP ou immunohistochimie VEGF, CD34 et RANKL.

II. Article 1

Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma.

David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, Gouin F, Ponsolle S, Bot RL, Richards CD, Heymann D, Rédini F, Blanchard F.

Int J Cancer. 2011 Apr 15;128(8):1822-35. doi: 10.1002/ijc.25776. Epub 2011 Jan 6.

L'oncostatine M a un effet anticancéreux direct sur les chondrosarcomes

Résumé

L'Oncostatine M (OSM) est une cytokine cytotatique, proapoptotique et induisant la différenciation ostéocytaire des ostéosarcomes, suggérant son utilisation possible en tant que nouveau traitement adjuvant des sarcomes osseux. Toutefois, la surexpression de l'OSM au niveau systémique pourrait entraîner des effets indésirables tels qu'une inflammation généralisée et favoriser la néoangiogenèse et l'ostéolyse.

Nous étudions ici l'effet de l'OSM sur les chondrosarcomes, un autre type de tumeur osseuse primitive caractérisé par la production d'une matrice cartilagineuse abondante, et une altération du remodelage osseux. Les chondrosarcomes étant résistants à la radiothérapie et la chimiothérapie conventionnelle, l'exérèse chirurgicale large constitue le seul traitement disponible.

In-vitro, l'OSM induit un blocage du cycle cellulaire dans 4 des 5 lignées de chondrosarcome testées, indépendamment de p53 et vraisemblablement via la voie JAK3/STAT1. Dans 2 lignées testées, l'OSM induit la différenciation chondrocytaire hypertrophique en inhibant l'expression de *SOX9* et en induisant l'expression de *CBFA1*, *COLL10*, *MMP13* et *RANKL*.

In-vivo, le transfert du gène de l'OSM murine par méthode adénovirale (AdOSM) dans le modèle de chondrosarcome de Swarm chez le rat (SRC) indique que la surexpression de l'OSM localement dans la tumeur réduit le développement du chondrosarcome. Cet effet anti-tumoral est lié à une réduction de la prolifération tumorale, une induction de l'apoptose, une surexpression de RANKL, un accroissement de la formation des ostéoclastes et une réduction du volume osseux. L'injection d'AdOSM chez les animaux induit un syndrome pseudogrippal mais ne modifie pas l'angiogenèse de la tumeur.

Par conséquent, l'OSM pourrait être considérée comme un nouvel agent adjuvant anticancéreux pour les chondrosarcomes. L'administration locale de cette cytokine serait vraisemblablement nécessaire pour contourner le problème de la faible vascularisation des chondrosarcomes et pour limiter les effets délétères sur les autres tissus. Les effets secondaires sur le remodelage osseux pourraient être pris en charge par des agents anti-résorption.

III. Complément de discussion

A. Effets de l'OSM in-vitro

1. Inhibition de prolifération et blocage du cycle cellulaire

L'OSM inhibe la prolifération de 4 lignées de CS in-vitro (OUMS-27, CAL78, BCS-CH-03 et SRC). L'étude de 5 lignées (en tenant compte du faible nombre de lignées établies) apporte un poids important aux observations, d'autant qu'elles sont issues de chondrosarcomes de haut grade dont le pronostic vital est le plus médiocre.

L'effet antiprolifératif peut certes paraître négligeable à 3 jours (par des tests mesurant l'ATP ou l'activité mitochondriale), mais il faut tenir compte du faible taux de division des cellules de chondrosarcome. Les études par comptage cellulaire après 15 jours de traitement confirment largement cet effet antiprolifératif de l'OSM. De plus, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux montre une modification de la répartition des cellules dès 1 jour de traitement par l'OSM. Parmi les techniques testées, l'étude du cycle cellulaire permet donc de détecter le plus précocement l'effet de l'OSM sur la prolifération. Des mesures par incorporation de thymidine tritiée ou par time-lapse pourraient également être réalisées.

L'inhibition de prolifération par l'OSM est classiquement associée à un blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et met en jeu p21 ou p27, notamment dans le cadre de l'ostéosarcome ou du cancer du sein [400][561][563]. Nous avons observé ce blocage en G0/G1 dans les chondrosarcomes (CAL78 et OUMS-27) mais l'arrêt du cycle peut également intervenir au niveau S/G2/M (SRC). L'augmentation du nombre de cellules en phase S/G2/M dans ce cas est bien le reflet d'un blocage et non d'une activation du cycle car cette répartition est maintenue dans le temps et de plus en plus de cellules se retrouvent bloquées en phase G2/M. L'étude des protéines impliquées dans le passage des différents checkpoints du cycle montre des modifications à la fois dans le passage de G1 à S (induction de p27 et parfois p21, accumulation de cycline D1, de la forme phosphorylée et inactive de cdc2 et de cdc25a) et dans le passage de G2 à M (induction de la kinase inhibitrice wee1, de P-cdc25c et de P-cdc2). La résultante semble dépendre de la cinétique d'apparition de ces modifications.

L'OSM inhibe également la prolifération des chondrocytes normaux, cet effet n'est donc pas spécifique des cellules tumorales et laisse présager des effets secondaires sur le cartilage en croissance. Or les chondrosarcomes se développant majoritairement chez l'adulte, l'utilisation de l'OSM dans ce contexte n'affecterait pas les chondrocytes (qui ne prolifèrent plus).

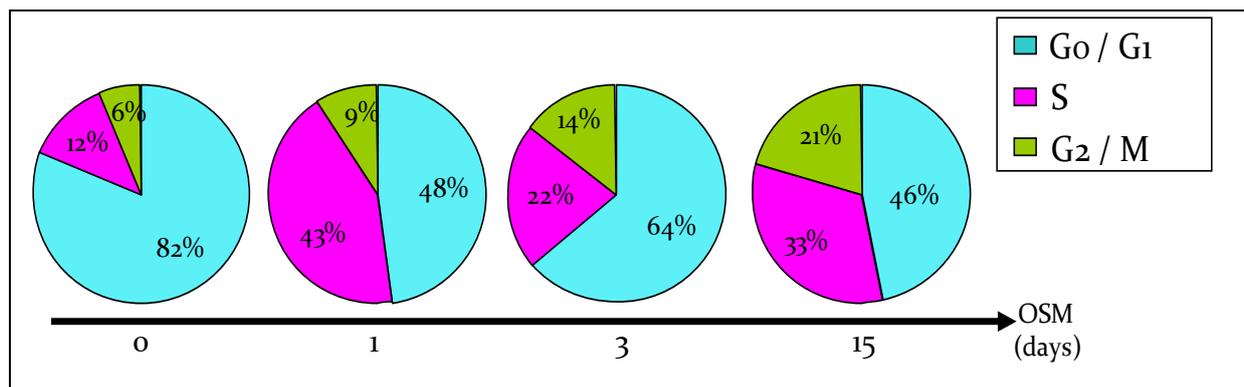


Figure 34: L'OSM bloque les cellules SRC en phase S/G2/M
Répartition des cellules SRC au sein du cycle cellulaire après 1, 3 ou 15 jours de traitement par l'OSM.

2. Résistance de la lignée SW1353

Seule la lignée SW1353 apparaît totalement résistante à l'effet anti-prolifératif de l'OSM, et l'étude de l'origine de cette résistance permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'OSM. Parmi les facteurs que nous avons recherchés, aucune anomalie ne nous est apparue dans cette lignée mais des études supplémentaires seraient nécessaires.

Cette lignée exprime bien les chaînes réceptrices de l'OSM (OSMR, LIFR et gp130). L'OSM induit une signalisation dans la lignée SW1353 via la phosphorylation de STAT1, STAT3, ERK et Akt et est capable de modifier la morphologie et l'adhérence de ces cellules tout comme les autres lignées de chondrosarcome.

Il pourrait ainsi s'agir d'un défaut spécifique des régulateurs du cycle cellulaire, par exemple de p21 ou p27 comme cela a pu être montré dans des lignées de mélanome résistantes [616].

Parmi les lignées de chondrosarcome, les cellules SW1353 sont celles qui prolifèrent le plus rapidement et qui présentent une morphologie la moins étalée. Elles expriment toutefois les marqueurs chondrocytaires. Une différenciation épithéliale de ces cellules a pu être mise en évidence [617]. Le statut peut être un peu moins différencié des SW1353 est une hypothèse à creuser pour expliquer la résistance de ces cellules à l'effet antiprolifératif de l'OSM.

3. Rôle du statut p53 dans la prolifération et l'apoptose

Parmi nos lignées de chondrosarcome, nous disposons de 4 lignées humaines p53 mutées et 1 lignée de rat p53 sauvage. Il serait intéressant de posséder au moins 1 ou 2 lignées humaines p53 sauvage afin de mieux représenter l'occurrence de cette mutation chez les patients, et confirmer les résultats obtenus sur la lignée de rat.

L'effet antiprolifératif de l'OSM sur les CS est tout à fait indépendant du statut p53, en revanche la sensibilisation à l'apoptose induite par un agent de chimiothérapie requiert une p53 fonctionnelle. Ces observations avaient également été observées dans le cadre de l'OS [460].

L'OSM sensibilise uniquement les cellules SRC (lignée de rat p53 sauvage) à l'apoptose induite par la staurosporine. Contrairement aux ostéosarcomes, dans cette lignée, l'apoptose n'est pas liée à l'augmentation du ratio Bax/Bcl2 ni à l'activation significative des caspases 3 et 9. Il serait intéressant d'étudier d'autres protéines de l'apoptose telles que Bid, Bim, Bcl-xL ou la caspase 8.

Outre l'utilisation d'autres lignées p53 sauvage, le rôle crucial de p53 dans l'apoptose induite par l'OSM pourrait être établi grâce à un inhibiteur pharmacologique de p53 (la pifithrin α) [460], en inactivant p53 dans une lignée sauvage ou réintroduisant p53 dans une lignée mutée.

4. Induction de la différenciation

L'OSM induit des modifications morphologiques, à savoir un aspect moins étalé mais plus allongé, dans toutes les lignées de chondrosarcome. Ceci est vraisemblablement le reflet d'une induction de la différenciation tout comme l'induction de la différenciation par l'OSM dans les ostéosarcomes et cancers du sein [618][619].

L'OSM induit l'expression des marqueurs hypertrophiques (*COLL10*, *RANKL*, *VEGF*, *MMP13*), augmente le ratio *CBFA1/SOX9* mais ne modifie pas l'expression de *COLL2* et *ACAN*, suggérant une différenciation en cellules de types chondrocytes pré-hypertrophiques.

Une limite à l'étude de la différenciation in-vitro provient des conditions de cultures (2D et normoxie). En effet, la structure tridimensionnelle et les conditions d'hypoxie sont particulièrement importantes pour se rapprocher des conditions physiologiques de croissance des chondrocytes. La culture des chondrosarcomes sous forme de pellet [620] pourrait améliorer l'expression des marqueurs chondrocytaires au niveau basal et potentiellement favoriser une différenciation terminale hypertrophique des cellules lors d'un traitement par l'OSM.

5. Voies de signalisation

La voie de signalisation impliquée dans l'inhibition de prolifération par l'OSM dans les chondrosarcomes a été mise en évidence en utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques (ciblant Akt, p38, ERK1/2, JAK1, JAK2, JAK3). Seul le WHI-P131 est capable de prévenir l'inhibition de prolifération et diminue la phosphorylation de STAT1. Toutefois cet inhibiteur n'est pas très spécifique, et il serait intéressant de confirmer ces résultats avec des SiRNA ciblant JAK1, JAK2, JAK3, STAT1 et STAT3. Ces SiRNA pourraient également être utilisés pour déterminer la voie de signalisation impliquée dans l'induction de la différenciation.

6. Effets duals de l'OSM ?

Outre l'effet antitumoral direct de l'OSM par inhibition de prolifération, cette cytokine pourrait favoriser d'autres aspects du développement des chondrosarcomes en jouant sur l'environnement osseux, la néoangiogenèse ou la dissémination métastatique.

L'OSM augmente l'expression de *RANKL* mais pas de l'*OPG*, ce qui pourrait favoriser l'ostéolyse, et du fait du cercle vicieux, induire indirectement la prolifération tumorale.

L'OSM augmente l'expression du *VEGF* et de la *MMP13* et diminue l'adhérence des cellules. Ceci pourrait favoriser la néoangiogenèse et le détachement de cellules de la tumeur, facilitant ainsi la dissémination métastatique. Toutefois on peut également imaginer que la diminution d'adhérence pourrait être un frein à l'attachement à un site secondaire. L'adhésion a été testée sur différents types de supports : alors que l'OSM diminue significativement l'adhésion sur plastique, fibronectine et vitronectine (reflétant le tissu conjonctif en général), cet effet est beaucoup moins important sur le collagène de type I (reflétant la matrice osseuse) (Figure 35). Cette réduction d'adhésion peut expliquer le changement de morphologie. Mais contrairement aux ostéosarcomes [562], si l'adhésion des SRC est diminuée, la capacité de migration des cellules ne semble pas modifiée par l'OSM aussi bien après 15 minutes ou 3 jours de traitement par l'OSM.

Seul le recours à des modèles in-vivo peut alors permettre de répondre à ces suppositions.

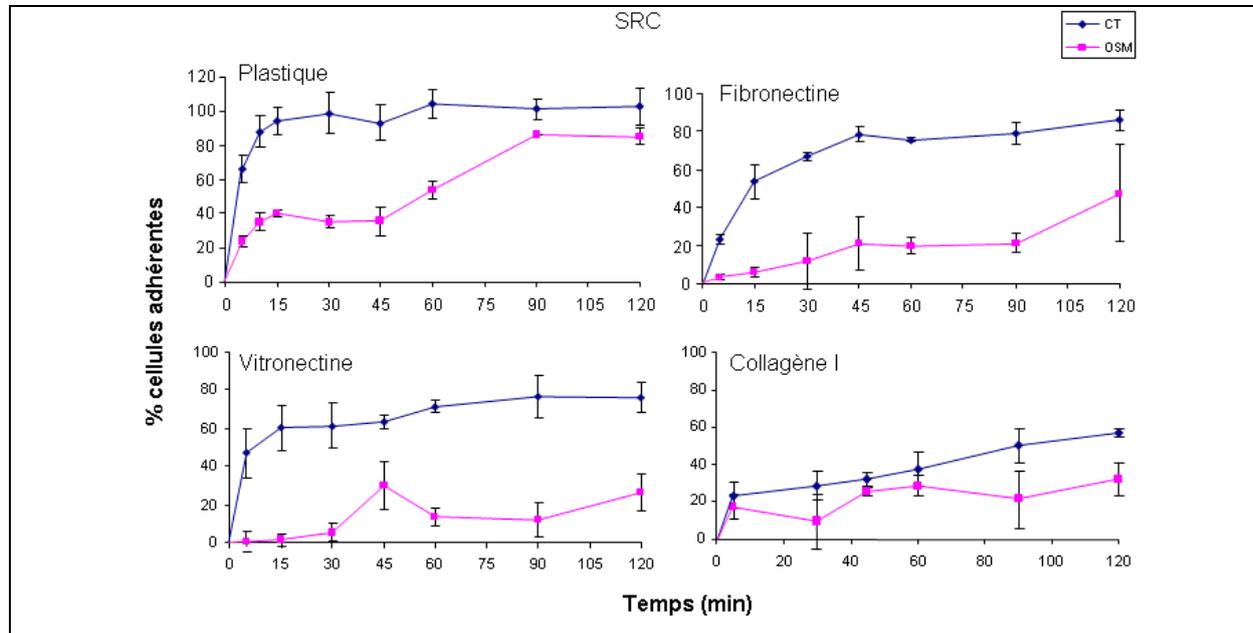


Figure 35: Adhésion des cellules SRC

Cinétique d'adhésion réalisée sur 2 heures sur 4 supports différents. Les cellules ont été prétraitées pendant 3 jours par l'OSM puis ensemencées en plaque 96 puits. A chaque temps de la cinétique les cellules non adhérentes sont éliminées par retrait du milieu et rinçage au PBS. A la fin de la cinétique, le % de cellules adhérentes dans chaque puits est évalué par test XTT.

B. Effets de l'OSM in-vivo

1. Pertinence du modèle de chondrosarcome

Ce modèle de chondrosarcome de Swarm chez le rat a l'avantage d'être un modèle syngénique (chez un animal immunocompétent), permettant de tenir compte du versant immunitaire dans la réponse à l'OSM. Ce modèle regroupe les caractéristiques de la pathologie humaine et a une cinétique de croissance compatible avec notre protocole thérapeutique.

Toutefois, afin de confirmer les résultats il serait intéressant d'étudier l'effet de l'OSM dans un autre modèle de chondrosarcome. De plus il se trouve que la lignée SRC était la lignée la plus sensible in-vitro à l'effet antiprolifératif, la seule présentant un statut p53 sauvage où l'OSM induisait un effet proapoptotique en association. Les autres modèles utilisables seraient des modèles de xéno greffe par injection de lignées humaines de chondrosarcome (en intramusculaire ou intraosseux) chez la souris Nude (immunodéficiente). Ces modèles doivent préalablement être mis au point mais seront critiquables car il s'agit d'une tumeur humaine dans un environnement de rat ce qui pose des problèmes de crossréactivité. Dans ce cas il faudra administrer la forme humaine de l'OSM, et la cytokine naturellement présente chez le rat ne pourra par interagir. Le modèle CAL78 a notamment déjà été décrit [621].

2. Modalités d'injection de l'AdOSM et effet anti-tumoral

Injection intra-tumorale

L'injection d'un adénovirus codant pour l'OSM murine en intratumoral réduit le développement tumoral des CS et induit même quelques régressions. Les différences de réponse entre les animaux dépendent vraisemblablement du ratio [Quantité d'OSM/Volume tumoral]. En effet, la taille initiale de la tumeur au moment de l'administration du traitement est variable selon les animaux et les tumeurs ayant régressé correspondaient aux plus petites. De plus, bien que l'injection d'adénovirus ait été réalisée en 3 points de la tumeur afin de mieux répartir l'adénovirus, il est possible que l'efficacité de transduction ne soit pas équivalente chez tous les animaux, mais nous ne disposons malheureusement pas des outils nécessaires pour doser l'OSM murine et confirmer cette hypothèse.

L'analyse histologique de ces tumeurs montre que l'effet antitumoral est lié aux effets antiprolifératifs de l'OSM (diminution du marquage Ki67 dans les tumeurs ayant régressé) déjà observés in-vitro, mais aussi aux effets proapoptotiques de la cytokine (augmentation du marquage TUNEL), ce qui n'avait pas pu être mis en évidence in-vitro avec l'OSM seule. Ceci pourrait être lié à une synergie d'action de l'OSM avec d'autres facteurs du microenvironnement (système immunitaire, inflammation, ostéolyse, matrice collagénique). Ceci peut aussi être dû à une différenciation plus terminale vers l'hypertrophie in-vivo que in-vitro (facilité par l'architecture 3D et l'hypoxie) puisque

le chondrocyte hypertrophique meurt ensuite par apoptose. Une diminution de la coloration au bleu alcian (mettant principalement en évidence les mucopolysaccharides de l'aggrécane) a été mise en évidence dans les tumeurs régressant après traitement par l'OSM. Ce phénomène peut être expliqué par une diminution d'expression de l'aggrécane (synonyme de différenciation terminale et non observé in-vitro), une induction d'aggrécane ou peut être la conséquence de la mort de cellules.

Ce mode d'injection induit des effets toxiques systémiques de l'OSM (perte de poids, inflammation généralisée) et le décès de 2 animaux sur 14 à J5 ou J7. L'adénovirus ou la cytokine produite ont donc pu diffuser au niveau systémique, même si la vascularisation de la tumeur est assez faible.

Injection dans le muscle controlatéral

L'injection de l'adénovirus dans le muscle tibial de la patte controlatérale à la tumeur n'induit aucun effet sur la croissance tumorale. 2 hypothèses sont proposées pour expliquer cette différence.

- La production d'OSM par les cellules musculaires est moins importante que par les cellules tumorales, car les effets toxiques systémiques sont moins sévères. Nous n'observons pas de perte de poids des animaux mais seulement une prise de poids moins importante que les rats contrôles. De plus, aucun animal n'est décédé.
- La cytokine ne pénètre pas dans la tumeur du fait de la matrice cartilagineuse et de la faible vascularisation.

Pour répondre à ces questions, des dosages d'OSM murine au niveau sanguin et tumoral seraient nécessaires.

3. Effets secondaires

Toxicité générale

Les animaux semblent souffrir d'une inflammation généralisée reflétée par une perte de poids, une conjonctivite, des diarrhées et un état de cachexie, pouvant entraîner la mort. Ce type d'effets toxiques a déjà été observé chez les animaux, toutefois les mécanismes ne sont pas clairement élucidés. Si la mort des animaux ne semble pas liée à des atteintes hépatiques (le taux des transaminases n'est pas modulé par l'OSM chez les animaux), elle pourrait être la conséquence de l'inflammation et de la fibrose induite au niveau pulmonaire [622] [623] ou au niveau rénal [624] [625] ou à des accidents cardio-vasculaires [626]. De plus l'OSM peut induire des atteintes de la barrière hématoencéphalique [627]. D'autre part, la cachexie est couramment décrite lors d'un développement tumoral, et l'OSM pourrait être impliquée dans ce phénomène [628].

Effets sur le remodelage osseux

L'OSM induit l'expression de RANKL par les cellules tumorales et une augmentation de la surface ostéoclastique (coloration TRAP) à l'interface entre l'os et la tumeur. En revanche, la surface ostéoblastique (coloration ALP) n'est pas modifiée. Les analyses par micro-CT montrent que la surexpression d'OSM réduit le volume osseux périosté formé lors du développement du chondrosarcome.

Outre l'effet antitumoral direct, l'OSM induit donc une ostéolyse (suite à l'activation des ostéoclastes par RANKL) pouvant à son tour favoriser la prolifération tumorale (via le relargage de facteurs de croissance impliqués dans le cercle vicieux). Ce phénomène met en évidence l'effet dual de l'OSM sur un même type tumoral.

Effets sur l'angiogenèse

Contrairement aux études in-vitro, l'OSM n'induit pas le VEGF in-vivo et n'augmente pas la vascularisation des tumeurs. De plus, dans nos conditions d'étude, l'OSM n'induit pas la dissémination métastatique, qui reste très faible.

Echappement de la réponse

La surexpression d'OSM réduit la progression tumorale pendant les 9 jours qui suivent l'injection de l'adénovirus. Ensuite, le développement tumoral reprend son cours et même de manière accélérée puisqu'à la fin de l'étude les tumeurs qui ont été traitées (OSM) ont un volume équivalent aux tumeurs contrôles (GFP).

Il est à noter que les analyses de microCT ont été réalisées sur les animaux après échappement, et la résultante sur l'os dépend à la fois de l'action de l'OSM pendant les 9 jours et de l'échappement tumorale pendant les jours suivants.

Diverses hypothèses pourraient expliquer cet échappement :

- Même si ne nous pouvons pas la doser, la production d'OSM est transitoire pendant vraisemblablement 7 jours. Dans ce cas, l'étude après J9 correspond au suivi des tumeurs après l'arrêt du traitement
- L'OSM pourrait avoir un effet dual à long terme en sélectionnant les cellules souches cancéreuses. Pendant la phase initiale de traitement, l'OSM inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules tumorales. On peut penser que les cellules les plus affectées sont celles qui sont le plus différenciées, mais que les cellules souches tumorales sont protégées. Après l'arrêt du traitement, ces cellules souches se mettent à proliférer et sont encore plus agressives, expliquant une croissance tumorale accrue.
- L'ostéolyse induite par l'OSM pourrait secondairement favoriser la prolifération tumorale via la mise en place du cercle vicieux. Dans les 7 premiers jours, l'effet antitumoral direct de

l'OSM prend le dessus sur cet effet pro-tumoral indirect, mais on peut penser qu'à l'arrêt du traitement, seul cet effet pro-tumoral persiste puisque l'ostéolyse est déjà engagée.

4. Amélioration du protocole thérapeutique

Pour répondre aux questions de l'échappement tumoral à J9, il faudrait pouvoir maintenir des taux d'OSM suffisants pendant toute la durée de l'étude.

- Les adénovirus ayant un fort potentiel immunogène, leur réinjection n'est pas envisageable.
- D'autres vecteurs viraux pourraient alors être utilisés tels que les lentivirus, qui sont des rétrovirus et qui s'insèrent dans le génome de la cellule et permettent une expression stable de la protéine dans le temps. Toutefois l'insertion aléatoire du transgène peut perturber les fonctions cellulaires, et ces virus n'infectent que les cellules en division.
- L'utilisation de vecteurs synthétiques non viraux (lipoplexes, nanoparticules inorganiques...) pourrait également être envisagée tout comme le recours à l'électrotransfert.
- Une méthode plus simple serait d'administrer directement l'OSM recombinante.

Afin d'étudier l'impact de l'ostéolyse induite par l'OSM sur l'échappement tumoral, il serait intéressant d'associer ce protocole d'AdOSM ou l'OSM recombinante à un agent inhibiteur de la résorption osseuse comme le Zolédronate.

Puisque nous envisageons l'intérêt thérapeutique de l'OSM comme adjuvant aux chimiothérapies conventionnelles, il faudrait associer l'OSM à un agent de chimiothérapie comme cela avait été réalisé pour l'ostéosarcome [562]. L'objectif serait d'établir une synergie d'action, même si actuellement peu de chondrosarcomes sont traités par chimiothérapie.

Afin de se rapprocher de la clinique, l'OSM pourrait être administrée dans le modèle SRC après curetage de la tumeur dans le but d'étudier les récurrences locales [629].

5. Application chez l'homme

Avant d'envisager une utilisation de l'OSM chez l'homme, il est impératif de comprendre et de pouvoir prévenir ses effets toxiques généraux. Une application locale (par exemple la perfusion de membre) pourrait permettre d'augmenter la concentration locale et de diminuer les effets secondaires.

Dans le cadre de cette étude, l'utilisation d'adénovirus a simplement pour but d'établir la preuve de concept des effets de l'OSM. Bien que le transfert de gène par adénovirus commence à être envisageable chez l'homme (quelques études cliniques de phase I sont en cours, par exemple avec un adénovirus codant l'IL-12 dans les cancers de la prostate ou du sein), cette technique est beaucoup plus compliquée à mettre en place par rapport à l'utilisation d'une cytokine recombinante.

2^{ème} partie : Effet protumoral de l'OSM
et du LIF sur les sarcomes d'Ewing :
implication des récepteurs

I. Introduction

Les sarcomes d'Ewing sont des tumeurs osseuses primitives de l'enfant très agressives de la catégorie des tumeurs à petites cellules rondes et caractérisées par une translocation chromosomique typique. L'objectif est d'étudier l'effet de l'Oncostatine M sur le développement de ces tumeurs.

A. Lignées de sarcome d'Ewing

Les études sont réalisées sur un panel de 10 lignées humaines de sarcome d'Ewing ayant différents statuts p53, présentant toutes la translocation EWS-FLI1 (de type I ou de type II) et dont la moyenne d'âge des patients est de 17 ans (Tableau 2).

Lignée cellulaire			Tumeur d'origine			
Espèce	Nom de la lignée	Statut p53	Type d'ESFT	Localisation	Type EWS-FLI1	Age du patient
Humain	TC71	Muté	Sarcome d'Ewing	Humérus (recurrence)	I	22
	SK-N-MC	Muté	pPNET	Metastase en site supraorbital	I	14
	EW24	Sauvage	Sarcome d'Ewing		I	
	A-673	Muté	Sarcome d'Ewing extra-osseux	Muscle	I	15
	TC32	Fonctionnel	Sarcome d'Ewing extra-osseux	Intestin	I	17
	SK-ES-1	Muté	Sarcome d'Ewing	Site osseux	II	18
	RD-ES	Muté	Sarcome d'Ewing	Humérus	II	19
	STAET1	Sauvage	pPNET	Humérus	I	
	EW7		Sarcome d'Ewing	Omoplate	I	
	BRZ		Sarcome d'Ewing		I	

Tableau 2: Caractéristiques des lignées de sarcome d'Ewing

Ces cellules en culture prolifèrent très rapidement, adhèrent faiblement au plastique (ce qui nécessite parfois le recours au coating de collagène de type I) et ont une morphologie de petites cellules rondes réfringentes. Les études transcriptomiques que nous avons réalisées sur ces cellules nous montrent qu'elles expriment des gènes de souche (*ID2*, *SOX2*, *NANOG*, *C-MYC*) de manière beaucoup plus importante que les chondrosarcomes ou les ostéosarcomes. Ces cellules expriment également des marqueurs neuronaux [153].

B. Objectifs

L'objectif était d'étudier l'effet de l'OSM recombinante humaine sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des lignées de sarcome d'Ewing in-vitro. L'OSM et le LIF se révélant proprolifératifs dans ces conditions nous sommes alors plus particulièrement intéressés à comprendre l'origine de cette différence de réponse entre d'un côté les OS et CS (où l'OSM est anti-prolifératif) et les ES en émettant plusieurs hypothèses :

- Le rôle d'EWS-FLI1
- L'implication des récepteurs
- L'impact du niveau de différenciation
- Des voies de signalisation distinctes
- Un contexte de facteur de transcription différent

Pour les études in-vitro, outre les techniques classiques de viabilité, QPCR, cytométrie en flux, western blot, des outils plus spécifiques ont été utilisés:

- Un plasmide codant pour la luciférase sous la dépendance du promoteur de l'OSMR [559].
- Un plasmide codant pour la luciférase sous la dépendance d'un promoteur contenant de multiples sites de fixation pour STAT3.
- Des SiRNA ciblant LIFR, OSMR, STAT3, LIF.
- Une lignée stablement modifiée pour exprimer un ShRNA ciblant EWS-FLI1 inductible lors d'un traitement par doxycycline [153].

Même si ce travail est principalement une étude mécanistique in-vitro, certaines observations ont pu être confirmées dans des modèles animaux ou sur des fragments de tumeurs issus de patients.

C. Modèle A673 1c ShRNA EWS-FLI1

Le clone A673 1c, transfecté stablement par un ShRNA EWS-FLI1, nous a été fourni par l'Institut Curie, Paris [153]. Ces cellules sont maintenues sous pression sélective par Blasticidine (10µg/mL) et Zéocine (100µg/mL). Le ShEWS-FLI1 est induit par la Doxycycline (1µg/mL) de manière indirecte par blocage du répresseur tet (Figure 36).

Le Sh (Short hairpin) est une séquence d'ARN en épingle à cheveux utilisée pour bloquer l'expression d'un gène par le mécanisme d'ARN interférence. La ShRNA est introduit dans les cellules par un vecteur plasmidique, intégré au génome de la cellule hôte puis sera transmis aux cellules filles (transfection stable). Le ShRNA est clivé par la machinerie cellulaire en siRNA, se fixe

à la séquence d'ARNm qui lui est spécifique (ici : le transcrite EWS-FLI1 de type 1) et recrute le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) afin de cliver cet ARNm et donc de le dégrader.

La séquence du ShEWS-FLI1 est :

Sens : 5'-GATCCCGGCAGCAGAACCCCTTCTTATTCAAGAGATAAGAAGGGTCTGCTGCCTTTTGGAAA-3'

Antisens : 5'-AGCTTTTCCAAAAGGCAGCAGAACCCCTTCTTATTCTTGAATAAGAAGGGTCTGCTGCCGG-3'

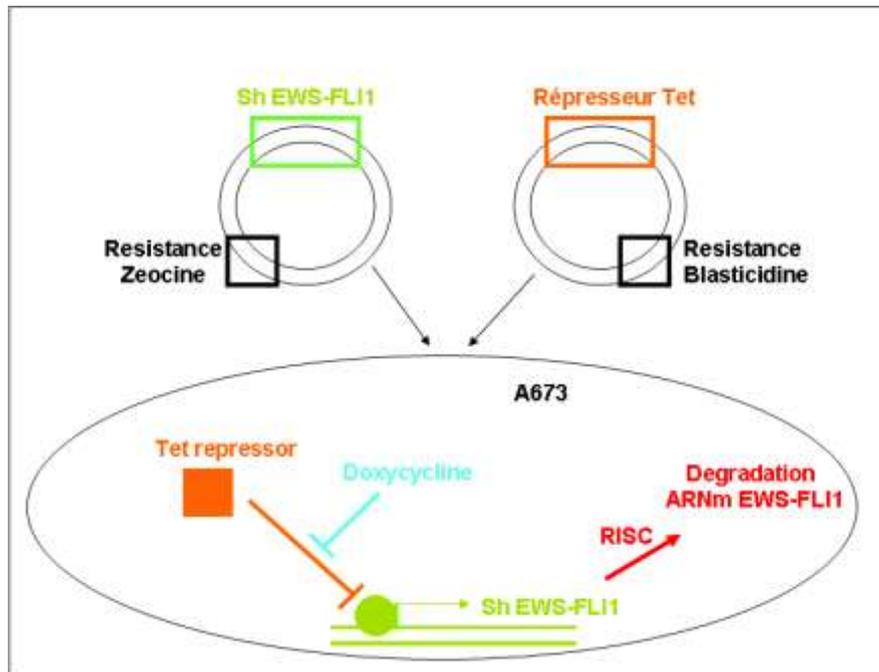


Figure 36: Mécanisme d'action du ShEWS-FLI1 inducible par la doxycycline

Dans ces cellules, le traitement par la doxycycline réduit rapidement et de manière stable l'expression d'EWS-FLI1. Dès quelques jours de traitement nous observons une diminution de la prolifération cellulaire, directement liée à la perte du facteur oncogénique EWS-FLI1.

II. Article 2

Oncostatin M and Leukemia inhibitory factor are growth factors for Ewing sarcoma.

Emmanuelle David, Franck Tirode, Pierre Guihard, Karine Laud, Olivier Delattre, Marie Françoise Heymann, Dominique Heymann, Françoise Redini and Frédéric Blanchard
Soumis à Oncogene

Paru dans Am J Pathol. 2012 Nov;181(5):1782-95

[Oncostatin m is a growth factor for ewing sarcoma.](#)

David E, Tirode F, Baud'huin M, Guihard P, Laud K, Delattre O, Heymann MF, Heymann D, Redini F, Blanchard F. . doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.023. Epub 2012 Sep 13.

PMID: 22982441

L'OSM et le LIF sont des facteurs de croissance pour les sarcomes d'Ewing

Les ostéosarcomes, chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing représentent la majorité des tumeurs osseuses primitives et leur traitement doit être amélioré. Les OS et CS dérivent des cellules souches mésenchymateuses, différenciées respectivement dans la voie ostéoblastique et chondrocytaire. Dans les ES, présentant des caractéristiques mésenchymateuses et neuroectodermiques, la protéine de fusion oncogénique EWS-FLI1 inhibe la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire.

L'Oncostatine M et le Leukemia inhibitory factor sont des cytokines de la famille de l'IL-6 capables de moduler la prolifération et la différenciation dans divers types cellulaires. L'origine de l'effet pro ou antiprolifératif de ces cytokines n'est pas connue même si un effet dual du facteur de transcription STAT3 est envisagé.

Nous montrons ici que contrairement aux OS et CS où l'OSM est cytotatique, cette cytokine induit la prolifération de 9 lignées d'ES sur 10. Les autres cytokines de la famille de l'IL-6 apparaissent moins actives, hormis le LIF. De plus, les lignées, les xenogreffes et les biopsies de patients d'ES expriment des taux plus importants de LIFR (récepteur à l'OSM de type I) et plus faibles d'OSMR (récepteur à l'OSM de type II) par rapport aux OS et CS. Ceci est en partie dû à une faible expression du LIF dans ces tumeurs, le LIF induisant la dégradation lysosomale du LIFR et activant la

transcription de l'OSMR. Des expériences par SiRNA montrent que les deux récepteurs sont essentiels à l'induction de prolifération par l'OSM, caractérisée par une activation importante de STAT3, l'induction de *C-MYC* mais pas de *C/EBPbeta*. L'inhibition de EWS-FLI dans les cellules d'ES par un ShRNA inductible induit leur différenciation mésenchymateuse, l'expression du LIF et réduit le ratio LIFR/OSMR.

Au sein des tumeurs osseuses primitives, l'OSM présente donc des effets opposés sur la prolifération tumorale qui corrélerent avec le statut de différenciation et le ratio LIFR/OSMR. Puisque d'autres tumeurs neuroectodermiques (gliome, médulloblastome, neuroblastome) semblent proches des ES, cette étude sur des pathologies rares pourrait permettre d'établir des mécanismes plus généraux de régulation du cancer et proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

III. Complément de discussion

A. Description des effets de l'OSM sur les sarcomes d'Ewing

1. Effets de l'OSM sur la prolifération

Après 3 jours de traitement, l'OSM induit la prolifération de 9 lignées de sarcome d'Ewing sur 10 testées. Seule la lignée SKNMC apparaît résistante à 3 jours mais après 15 jours de traitement, l'OSM induit la prolifération dans cette lignée également.

L'induction de prolifération est certes parfois faible mais elle est reproductible et retrouvée dans un grand nombre de lignées. L'effet proprolifératif est indépendant du statut p53.

Cet effet proprolifératif est dû à une accélération du cycle cellulaire qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules en phase S et une diminution du nombre de cellules quiescentes en phase G₀, associé à une induction transitoire de *C-MYC* qui est connu pour activer l'entrée dans le cycle. Une étude plus poussée des protéines du cycle activées par l'OSM pourrait permettre de préciser ce mécanisme. Parmi les protéines p21, p27 et la cycline D1, nous avons noté une induction de p21 dès 4h de traitement par l'OSM dans la majorité des lignées d'ES. Les données de bibliographie montrent qu'EWS-FLI1 inhibe l'expression de p21 en bloquant directement son promoteur [233]. Ceci n'est pas retrouvé dans les ES testés car ni les taux de base ni les taux induits par l'OSM n'apparaissent plus faibles que ceux observés dans les CS et OS. La seule différence significative a été trouvée au niveau de *C/EBPbeta*, induit dans les CS et OS par l'OSM mais pas dans les ES. Ce facteur de transcription est important pour la différenciation mésenchymateuse et est donc lié à l'inhibition de prolifération. En absence d'induction de *C/EBPbeta* dans les ES, l'effet proprolifératif induit par C-MYC pourrait l'emporter. De plus, il a récemment été montré qu'une forte expression de C-MYC pouvait favoriser l'effet pro-cancéreux de l'OSM au dépend de son effet anti-cancéreux dans les cellules épithéliales mammaires [630]. La manipulation des taux de C-MYC dans les ES, OS et CS pourrait confirmer cette hypothèse.

Si l'OSM stimule toujours la prolifération de nos lignées de référence SKES1 et RDES après 15 jours de traitement, des études préliminaires sur d'autres lignées ont révélé que cet effet pouvait disparaître et que l'OSM pouvait même devenir antiprolifératif dans certains cas. Ceci ne dépend pas du statut p53 et aucune apoptose n'a été observée. Une hypothèse est que l'expression des récepteurs LIFR et OSMR est modifiée lors du traitement par l'OSM. Les études préliminaires montrent une augmentation des taux d'OSMR et une diminution du LIFR au niveau membranaire après 3 jours de traitement par l'OSM dans les lignées RDES et SKES1. Des études complémentaires seront donc nécessaires concernant les effets de l'OSM à plus long terme sur l'ensemble des lignées.

2. Effet de l'OSM sur l'apoptose et la différenciation

Contrairement aux OS et CS, dans les lignées d'ES, l'OSM n'induit jamais l'apoptose en association avec la Staurosporine, même dans les lignées où p53 est sauvage ou fonctionnel. De plus l'OSM ne modifie pas la morphologie, l'adhésion cellulaire (Figure 37) ou la migration de ces cellules. L'étude de l'expression des marqueurs de la différenciation chondrocytaire, ostéoblastique, adipocytaire ou des gènes de souchitude (*CBFA1*, *SOX9*, *PPAR γ* , *FABP4*, *CEBPbeta*, *ID2*, *SOX2*, *OCT3/4*) montre que l'OSM ne modifie pas le statut de différenciation de ces cellules. EWS-FLI pourrait directement inhiber ces mécanismes.

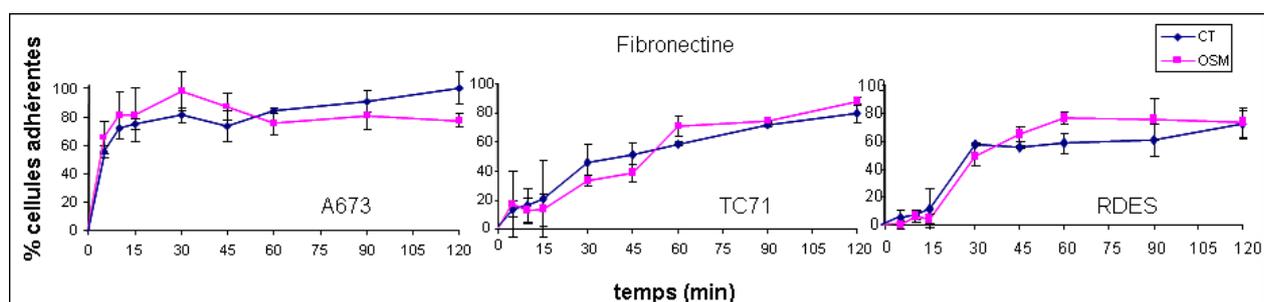


Figure 37: Adhésion de cellules de sarcome d'Ewing
Cinétique d'adhésion de 3 lignées de sarcome d'Ewing. Protocole identique à la figure 35

3. OSM et LIF

Dans les ostéosarcomes, après 3 jours de traitement, l'OSM inhibe la prolifération alors que le LIF n'a aucun effet. L'association d'OSM et de LIF inhibe la prolifération de manière équivalente à l'OSM seule. Ceci suggère que l'effet antiprolifératif de l'OSM dans les OS passe par le récepteur OSMR/gp130.

Dans les sarcomes d'Ewing, après 3 jours de traitement, l'OSM induit la prolifération de façon supérieure ou équivalente au LIF. L'association d'OSM et de LIF induit la prolifération de façon équivalente à l'OSM seule, nous n'observons pas d'effet synergique, additif ou antagoniste entre les 2 cytokines. Ceci indique que l'OSM induit la prolifération des sarcomes d'Ewing via le LIFR/gp130 et que l'OSMR/gp130 peut accentuer cet effet. Les doses d'OSM étant déjà saturantes, l'ajout de LIF ne permet pas d'amplifier l'effet de l'OSM pour des questions de biodisponibilité des récepteurs.

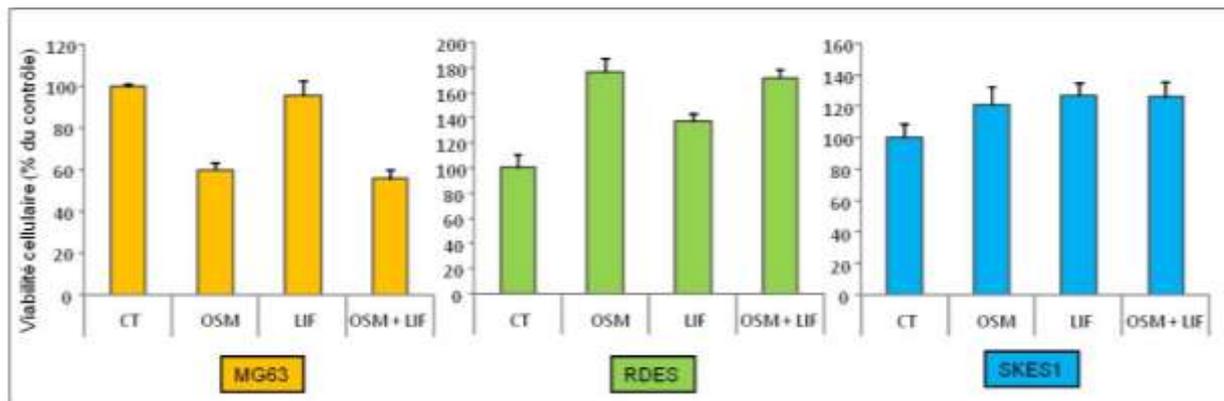


Figure 38: Effets de l'OSM et du LIF sur la prolifération
 Etude de la prolifération d'un ostéosarcome (MG63) ou de 2 sarcomes d'Ewing (RDES et SKES1). Le pourcentage de cellules viables a été évalué par la méthode Vialight après 3 jours de traitement par les cytokines.

B. Etude comparative des ES versus OS et CS

1. Comparaison du statut de différenciation

L'étude de l'expression de facteurs de transcription et marqueurs de différenciation montre que :

- *COLL1*, *CBFA1*, *SOX9*, *PPARg* et *CEBPdelta* sont plus exprimés dans les OS et CS que les ES.
- *ALP* est plus exprimé dans les ES
- *ID2*, *SOX2*, *NANOG* et *C-MYC* sont plus exprimés dans les ES.

L'étude de ces gènes montre une différence très nette entre les ES d'un côté qui apparaissent très peu différenciés, et les OS et CS de l'autre qui sont beaucoup plus différenciés. En revanche, en culture, aucun de ces marqueurs ne permet de distinguer clairement les CS par rapport aux OS.

2. Comparaison de l'expression des récepteurs

Les ES expriment de manière plus importante le LIFR (au niveau protéique principalement) et moins l'OSMR (au niveau des transcrits). Le poids de cette étude repose sur le nombre important de lignées testées, ainsi que sur la confirmation dans des modèles de xénotransplante et chez les patients (Figure 40). Parmi les OS et CS, la lignée SW1353 résistante à l'effet antiprolifératif est celle qui exprime le LIFR en plus grande quantité.

Régulation de l'OSMR

L'OSMR est principalement régulé au niveau transcriptionnel et l'utilisation du modèle A673 ShRNA EWS-FLI1 montre que la protéine de fusion régule négativement l'expression de l'OSMR dans les ES. De plus, la protéine de fusion régule négativement l'expression du LIF, qui est un

inducteur de l'expression de l'OSMR. La faible expression de l'OSMR dans les ES semble liée à un effet direct d'EWS-FLI1 sur le promoteur de l'OSMR (confirmé par les CHIP et par l'existence de sites potentiels de fixation d'EWS-FLI1 sur le promoteur de l'OSMR) mais aussi à un effet indirect d'EWS-FLI1 via le LIF. Cependant d'autres inducteurs de l'OSMR sont vraisemblablement impliqués, comme par exemple l'IL-6 qui est lui aussi largement exprimé dans les ostéoblastes mais pas dans les cellules d'ES.

La différence d'expression de l'OSMR étant détectable au niveau des transcrits mais pas au niveau de la protéine membranaire, on peut se demander si cette observation peut avoir réellement un impact sur l'effet pro ou antiprolifératif de l'OSM. Dans les OS et CS, plusieurs hypothèses pourraient expliquer que la surexpression de l'OSMR ne se traduit pas à la surface des cellules :

- La machinerie cellulaire est limitée et les taux maximaux d'OSMR sont déjà atteints.
- Il existe d'autres mécanismes de régulation post-traductionnelle.

Régulation du LIFR

La surexpression du LIFR dans les ES est majoritairement liée à une régulation post-transcriptionnelle. Le LIF induit la dégradation du LIFR par le lysosome et il apparaît que le LIF est beaucoup plus exprimé dans les lignées d'OS et CS que les ES. Cette différence d'expression du LIF a également pu être confirmée dans des modèles de xéno greffes et dans des biopsies de patients.

La régulation du LIF en revanche a lieu au niveau transcriptionnel et l'utilisation du modèle A673 ShRNA EWS-FLI1 et les CHIP FLI1 montrent que la protéine de fusion régule négativement l'expression du LIF mais de manière indirecte. La TSA (Tricostatine A), un inhibiteur des HDAC mais également de NFkB [631], inhibe l'expression du LIF dans l'ostéosarcome MG63 (Figure 39). Etant donné que NFkB est induit dans les cellules souches embryonnaires lors de la différenciation [632], notre hypothèse de travail est que NFkB est plus exprimé dans les OS et CS que dans les ES, induisant ainsi l'expression du LIF et secondairement l'expression de l'OSMR et la dégradation du LIFR.

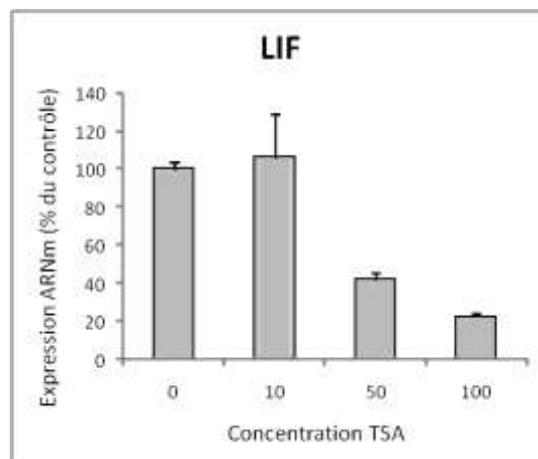


Figure 39: Régulation de l'expression du LIF par la TSA
Expression des transcrits LIF après un traitement par la TSA (10 à 100nM) dans la lignée MG63.

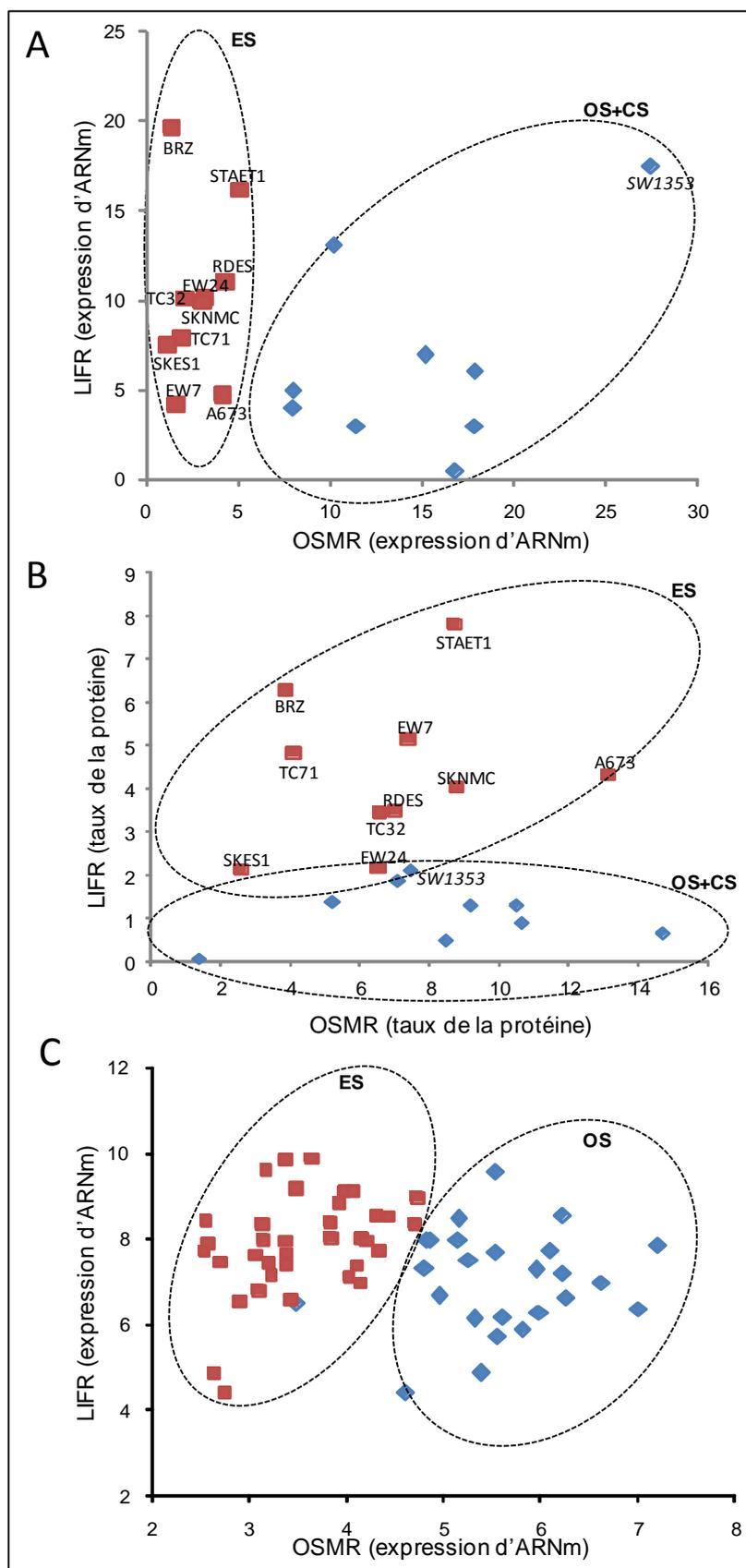


Figure 40: Expression du LIFR et de l'OSMR dans les TOP

A- Expression des transcrits dans les lignées déterminée par Q-PCR. B- Quantification des protéines membranaires dans les lignées par cytométrie en flux. C- Expression des transcrits dans les biopsies de patients par puce à ADN.

3. Comparaison des voies de signalisation activées

STAT

L'étude par western blot de la phosphorylation de STAT3 sur tyrosine ou sérine montre que l'OSM induit la phosphorylation de STAT3 dès 15 minutes de traitement dans les OS, CS et ES. Cette phosphorylation est transitoire mais réapparaît au bout de 4 à 6h. Nous n'observons pas de différence tant dans l'intensité que dans la cinétique de la phosphorylation entre les OS+CS et les ES (Figure 41). De plus, un SiRNA ciblant STAT3 prévient aussi bien l'effet pro que anti-prolifératif de l'OSM. L'effet dual de STAT3 sur la prolifération, déjà observé dans d'autres types de tumeurs, est également applicable aux tumeurs osseuses primitives.

L'étude complémentaire utilisant un promoteur artificiel dépendant de STAT3 montre que STAT3 est activé de manière plus importante par l'OSM dans les ES. Ce promoteur est normalement activé spécifiquement par STAT3 mais dans les faits STAT5 est également capable de se fixer sur le promoteur.

L'OSM induit également la phosphorylation de STAT1 en 15 minutes dans toutes les lignées, avec une intensité équivalente.

L'effet protumoral de l'OSM dans les ES pourrait ainsi être lié à une hyperactivation de STAT3 et à des interactions de STAT3 avec des co-facteurs présents uniquement dans le contexte cellulaire des ES.

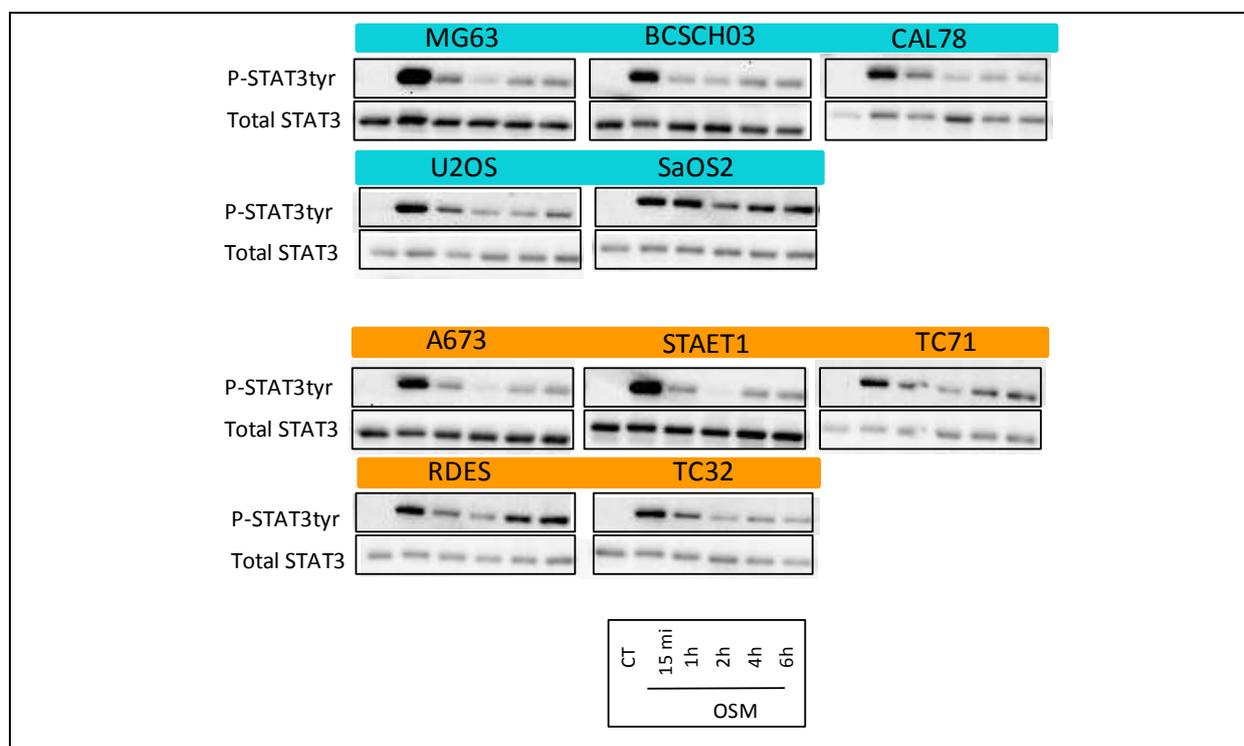


Figure 41: Phosphorylation de STAT3 dans les lignées

Etude de la phosphorylation de STAT3 par western blot après 15 minutes à 6 heures de traitement par l'OSM

Akt

La même étude par western blot montre que l'OSM induit la phosphorylation d'Akt sur thréonine dès 15 minutes de traitement, mais de manière plus importante dans les OS et CS que les ES. Le taux basal d'Akt apparaît également plus élevé dans les OS et CS (Figure 42). Mais cette différence d'activation ne semble pas dicter l'effet pro ou anti-prolifératif de l'OSM car un inhibiteur pharmacologique de la voie PI3K/Akt (Ly294002 à 20 μ M) ne prévient pas l'effet de l'OSM sur la prolifération des OS, CS et ES.

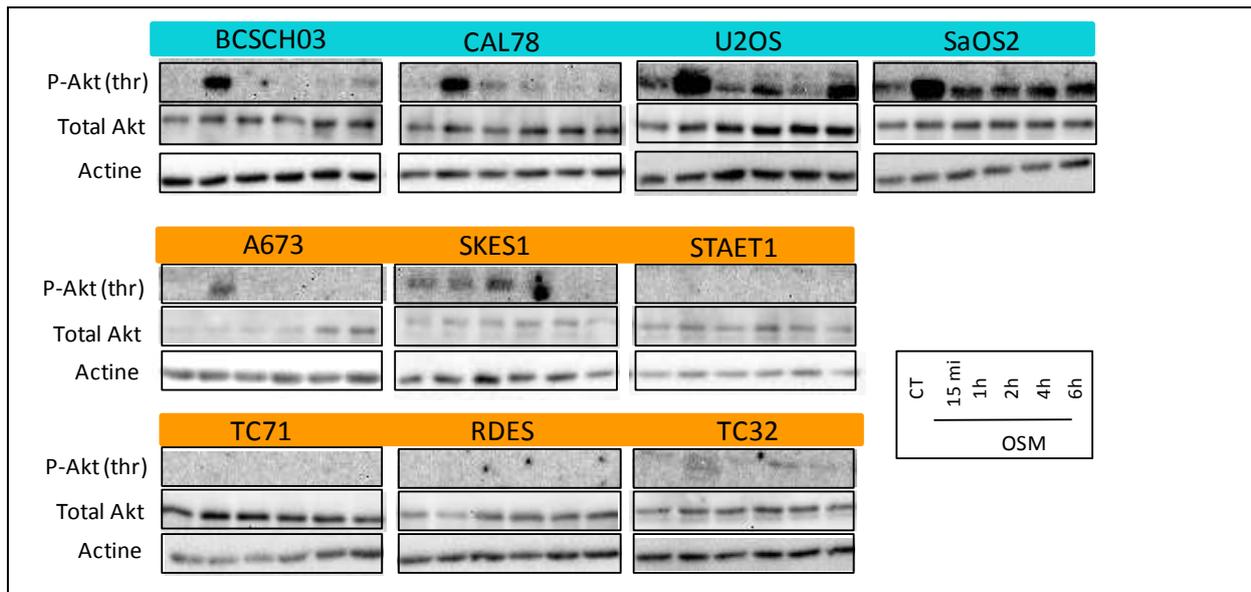


Figure 42: Phosphorylation d'Akt dans les lignées

Etude de la phosphorylation d'Akt par western blot après 15 minutes à 6 heures de traitement par l'OSM

ERK1/2

L'OSM induit également la phosphorylation d'ERK1/2 à 15 minutes dans toutes les lignées. Le taux basal et l'activation de ERK1/2 semble identique dans les OS, CS et ES et un inhibiteur pharmacologique de la voie MEK/ERK (UO126 à 10 μ M) ne prévient pas l'effet de l'OSM sur la prolifération de ces 3 types de tumeurs.

C. Modèles permettant de switcher entre un effet pro- et anti-prolifératif?

Le seul moyen d'impliquer catégoriquement 1 ou plusieurs facteurs dans l'orientation de l'effet pro ou anti-prolifératif de l'OSM est de trouver un modèle dans lequel la modification de ce(s) facteur(s) permet de transformer l'effet proprolifératif de l'OSM en effet antiprolifératif ou l'inverse. Dans cette étude, nous avons en effet pu inhiber l'effet proprolifératif ou inhiber l'effet antiprolifératif de l'OSM, ce qui nous permet de mettre en évidence des facteurs participant à l'effet de cette cytokine sur la prolifération. En revanche nous n'avons jamais pu switcher entre un effet pro- et anti-prolifératif en manipulant ces facteurs. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

- nous n'avons pas trouvé le facteur clé dictant l'effet de l'OSM sur la prolifération.
- l'effet est dicté par le cumul de plusieurs facteurs.

Une approche possible serait de réaliser des analyses transcriptomiques ou protéomiques globales (non dédiées) comparant les OS et CS versus les ES afin d'identifier un ensemble de gènes associés aux effets anti- ou pro-prolifératif de l'OSM. Les données transcriptomiques sont accessibles pour les biopsies d'OS et ES.

Comme indiqué précédemment, un facteur clé capable de contrôler l'effet de l'OSM sur la prolifération est C-MYC. Son invalidation dans les ES ou sa surexpression dans les OS pourrait confirmer cette possibilité.

1. Modification de l'expression d'EWS-FLI1

Pour déterminer si EWS-FLI est le facteur dictant l'effet proprolifératif de l'OSM, l'objectif était d'étudier l'effet de l'OSM sur la prolifération après inhibition d'EWS-FLI dans un ES et après surexpression d'EWS-FLI1 dans un OS.

Le modèle A673 ShEWS-FLI1 aurait pu nous apporter une réponse mais de base, l'OSM induit peu la prolifération de cette lignée. Nos tentatives de transduction du ShEWS-FLI1 dans d'autres lignées ont été vaines, et il serait intéressant de tester la transfection d'un SiRNA EWS-FLI1.

La surexpression d'EWS-FLI1 dans un OS par transfection transitoire d'un plasmide codant le gène de fusion ne nous a pas donné de résultats concluants.

Le fait que l'OSM puisse induire la prolifération d'autres types de tumeurs ne possédant pas EWS-FLI1, nous incite à penser que la protéine de fusion n'est pas un facteur clé mais pourrait jouer indirectement sur l'effet proprolifératif, par exemple en régulant le statut de différenciation des cellules, l'expression des récepteurs...

2. Modification du niveau de différenciation

Une seconde hypothèse consiste à dire que c'est le niveau de différenciation des cellules qui dicte l'effet de l'OSM sur la prolifération, indépendamment d'EWS-FLI1 et du statut tumoral. En effet l'OSM inhibe la prolifération des cellules différenciées (ostéosarcomes, chondrosarcomes, ostéoblastes et chondrocytes) et induit la prolifération de cellules peu différenciées (sarcomes d'Ewing et cellules souches mésenchymateuses) (Figure 43).

Puisqu'il est difficile de dédifférencier des cellules engagées dans une voie de différenciation, l'objectif était d'étudier l'effet de l'OSM après différenciation des ES ou des MSC dans la voie ostéoblastique.

Dans les cellules d'ES, EWS-FLI1 est responsable du statut peu différencié. Dans le modèle A673 ShEWS-FLI, le traitement par la doxycycline induit la différenciation cellulaire en augmentant l'expression de *CBFA1* et *SOX9* et en réduisant l'expression de *SOX2* et *NANOG* (mais pas *C-MYC*). Cette différenciation mésenchymateuse est améliorée si les cellules sont en plus cultivées dans un milieu de différenciation ostéoblastique (dexaméthasone, vitamine D3, acide ascorbique et Bglycerophosphate). Dans ce modèle, la différenciation met plusieurs jours à se mettre en place. Nous avons cultivé les cellules A673 ShEWS-FLI pendant 18 jours avec ou sans doxycycline et avec ou sans milieu de différenciation, puis traités ces cellules 3 jours avec l'OSM. Mais nous nous sommes encore heurtés au problème du très faible effet de l'OSM sur la prolifération de cette lignée. L'idéal serait d'avoir un modèle de ShRNA EWS-FLI1 inducible dans la lignée RDES (EWS-FLI1 de type 2) qui répond bien à l'OSM. Ici l'utilisation d'un simple SiRNA est à proscrire puisque son effet est transitoire.

Sur les MSC, nous avons observé que la différenciation ostéoblastique pendant 18 jours diminue l'effet proprolifératif de l'OSM mais les résultats ne sont pas toujours reproductibles.

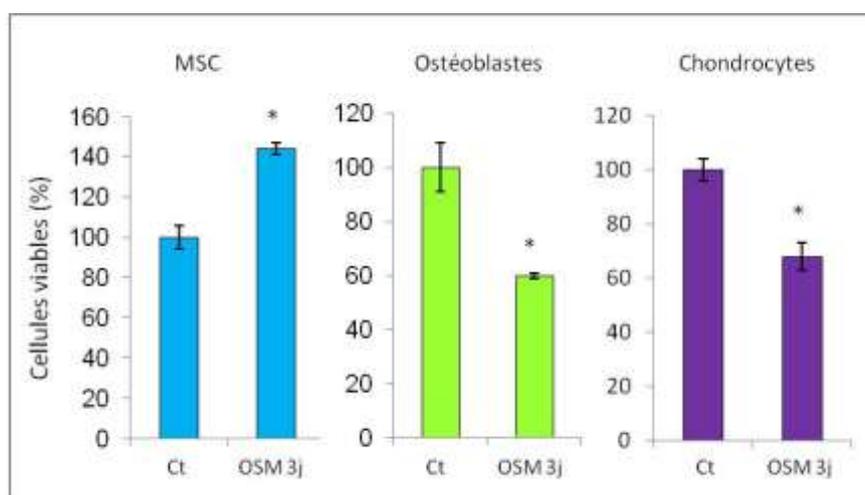


Figure 43: Effet de l'OSM sur la prolifération de cellules normales

La viabilité cellulaire de MSC, ostéoblastes et chondrocytes en culture primaire après 3 jours de traitement par l'OSM est révélée par méthode XTT.

3. Modification du ratio LIFR/OSMR

Sur les OS (exprimant beaucoup l'OSMR et peu le LIFR) l'OSM se montre antiprolifératif alors que sur les sarcomes d'Ewing (exprimant beaucoup le LIFR et peu l'OSMR) l'OSM se montre proprolifératif. L'objectif était de moduler positivement ou négativement l'expression des différentes chaînes réceptrices puis d'étudier l'impact sur l'effet de l'OSM sur la prolifération.

Les résultats présentés dans l'article concernent le ciblage des chaînes réceptrices grâce à un SiLIFR, un SiOSMR et un anticorps anti-gp130. Nous avons pu démontrer que l'effet antiprolifératif de l'OSM sur les OS dépend uniquement d'OSMR/gp130 alors que l'effet proprolifératif sur les ES nécessite LIFR/gp130 et OSMR/gp130. Dans ces modèles, nous avons simplement pu inhiber l'effet pro ou antiprolifératif de l'OSM mais pas passer d'un effet pro à antiprolifératif ou l'inverse. Il semble que les récepteurs ne soient pas le seul facteur influençant l'effet de l'OSM sur la prolifération ou que le taux d'extinction ne soit pas suffisant. De plus la stabilité de la transfection des SiRNA étant limitée dans le temps, nous n'avons pas pu étudier les effets de l'OSM à plus long terme.

Une autre approche consiste à surexprimer les chaînes réceptrices. Nous avons choisi de surexprimer le LIFR dans les OS et de surexprimer l'OSMR dans les ES par transfection d'un plasmide codant pour l'un ou l'autre récepteur puis sélection par antibiotique. Les tentatives de surexpression du LIFR ont été vaines, peut-être à cause des mécanismes de dégradation de ce récepteur induit par le LIF dans les OS. La surexpression de l'OSMR a pu être réalisée dans la lignée SKES1. Les clones obtenus surexprimaient 3 à 20 fois l'OSMR au niveau des transcrits, mais seulement 1,1 à 1,5 fois au niveau de la protéine membranaire. De plus, l'effet proprolifératif de l'OSM n'était pas altéré dans ces clones. On peut penser que la machinerie cellulaire des ES ne permet pas d'exprimer d'avantage le récepteur OSMR au niveau de la membrane ou qu'il existe des mécanismes de dégradation du récepteur.

Une perspective serait de développer des lignées surexprimant les LIFR et l'OSMR grâce à des techniques de transfert de gène par lentivirus notamment. Il serait également intéressant d'analyser l'expression du LIFR et de l'OSMR dans d'autres cellules comme les MSC ou dans les ESC puis de moduler leur expression avec les techniques citées précédemment et d'étudier l'effet de l'OSM sur la prolifération dans ces modèles.

4. Modification du taux de LIF

Le LIF étant surexprimé dans les OS et induisant la dégradation du LIFR, nous avons utilisé un SiRNA ciblant le LIF dans ces cellules. Si le SiLIF stabilise effectivement l'expression du LIFR à la surface des cellules, il ne permet pas d'altérer l'effet antiprolifératif de l'OSM. Par contre, un anticorps neutralisant le LIF extracellulaire ne stabilise pas l'expression du LIFR, suggérant une régulation intracrine.

D. Etude préclinique

Suite à l'observation de l'effet prolifératif de l'OSM sur les ES, nous souhaitions savoir si cette cytokine était également un facteur de croissance in-vivo dans un modèle d'ES. Les modèles disponibles au laboratoire sont réalisés par injection des lignées d'ES humaines précédemment décrites [633] en paratibial ou en intratibial chez la souris Nude. Les tumeurs se développant sont très ostéolytiques et peuvent induire des métastases pulmonaires. Nous avons réalisé 2 expérimentations.

Expérimentation n°1 : Effet de l'OSM dans le modèle SKES1

- A J0, le modèle de sarcome d'Ewing a été induit par injection de 2 millions de cellules SKES1 dans 50 μ L de PBS dans le muscle paratibial de 16 souris Nudes.
- A partir de J9, la tumeur étant palpable, les animaux ont été randomisés en 2 groupes de 8 souris et ont reçu 3 fois par semaine une injection intratumorale de 6 μ g d'OSM recombinante humain en PBS ou une injection intratumorale de PBS seul.

Expérimentation n°2 : Effet du LIF dans le modèle RDES

- A J0, le modèle de sarcome d'Ewing a été induit par injection de 2 millions de cellules RDES dans 50 μ L de PBS dans le muscle paratibial de 16 souris Nudes.
- Dès J0, les animaux ont été randomisés en 2 groupes de 8 souris et ont reçu 3 fois par semaine une injection intratumorale de 12 μ g de LIF recombinant humain en PBS ou une injection intratumorale de PBS seul.

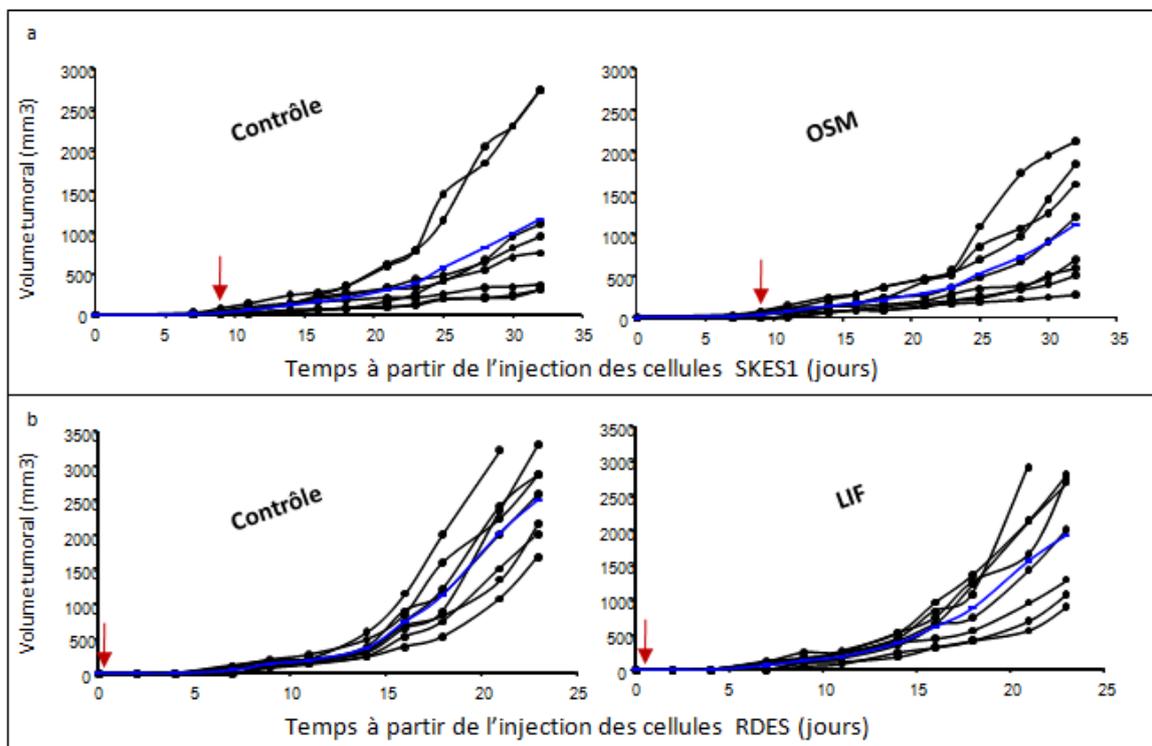


Figure 44: Suivi des volumes tumoraux lors d'un traitement par OSM ou LIF dans des modèles d'ES
a- expérimentation n°1 : Traitement par l'OSM versus PBS dans le modèle SKES1. b- Expérimentation n°2 : Traitement par le LIF versus PBS dans le modèle RDES. La courbe bleue représente le volume tumoral moyen dans chaque groupe.

Dans ces 2 expérimentations, l'incidence tumorale était de 100% dans tous les groupes et l'administration d'OSM ou de LIF n'a aucunement accéléré le développement tumoral (Figure 44). Ces cytokines n'ont eu aucun effet secondaire sur les animaux (inflammation, perte de poids, cachexie...) ce qui peut être expliqué par l'absence de crossréactivité interspèce.

L'activité des cytokines recombinantes utilisées pour cette étude a préalablement été vérifiée sur la prolifération des ES et notamment sur les lignées RDES et SKES1. Mais pourquoi l'effet pro-prolifératif du LIF ou de l'OSM n'est pas retrouvé in-vivo ?

- La quantité d'OSM ou de LIF au sein de la tumeur n'est peut être pas suffisante. La demi-vie de ces cytokines est en effet très courte (environ 30 min dans la circulation). L'utilisation de pompes mini-osmotiques permettrait d'administrer ces cytokines de façon beaucoup plus stable.
- D'autres facteurs de croissance in-vivo pourraient masquer l'effet pro-prolifératif de l'OSM. In-vitro, l'effet pro-prolifératif de l'OSM n'est significatif qu'en réduisant la concentration en sérum.

Ce modèle d'étude est critiquable puisqu'il consiste à tester l'effet d'une cytokine humaine sur une tumeur humaine induite chez une souris immunodéficiente, ce qui ne permet d'appréhender qu'une partie des effets de la cytokine en occultant l'action systémique de l'OSM et le versant immunitaire. Pour pallier aux problèmes d'espèce et d'immunodéfiance, il serait intéressant d'utiliser des modèles syngéniques, par exemple par injection de MSC modifiées pour exprimer EWS-FLI1 chez des souris immunocompétentes C57BL/6J [152]. Dans ce cas, il faudrait utiliser la cytokine murine mais l'OSM de souris ne se fixe pas sur le LIFR de souris.

Un autre modèle intéressant disponible consiste à injecter la lignée A673 ShEWS-FLI1 en paratibial chez la souris Nude. Chez ces souris, le traitement par doxycycline (dans l'eau de boisson) inhibe l'expression d'EWS-FLI1 et pourrait permettre d'étudier l'impact de l'OSM sur la prolifération des sarcomes d'Ewing en fonction de l'expression d'EWS-FLI1.

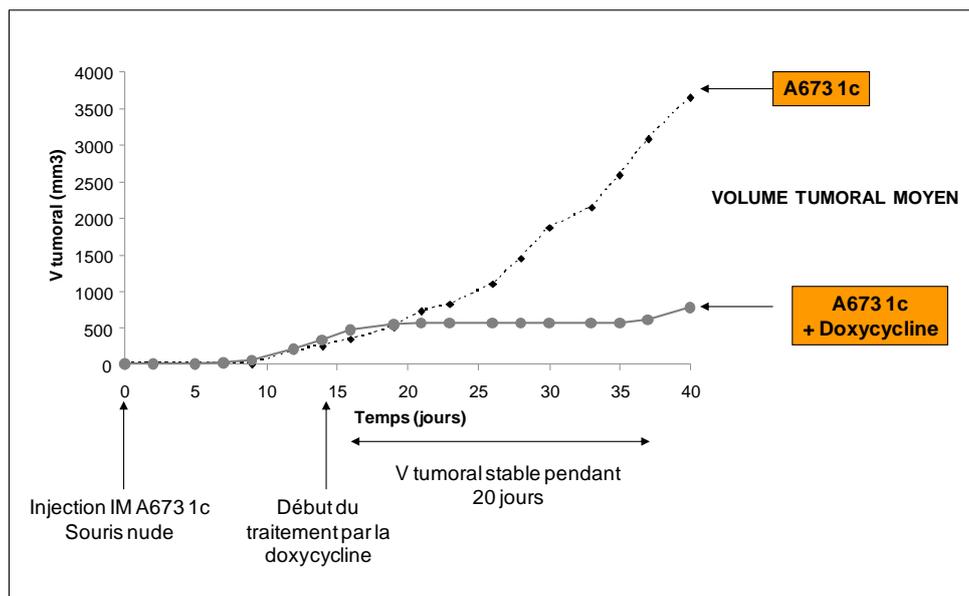


Figure 45: Développement tumoral dans le modèle A673 1c
 Mesure du volume tumoral dans le modèle syngénique de sarcome d'Ewing utilisant la lignée A673 ShEWS-FLI1 inductible lors du traitement par la doxycycline.

L'expérimentation la plus importante consistera à l'inverse à inhiber l'action de l'OSM dans un modèle de sarcome d'Ewing. Plusieurs protocoles peuvent être envisagés selon :

- La protéine ciblée : OSM, LIF, OSMR, LIFR, STAT3...
- La technique de ciblage : anticorps neutralisant, inhibiteur pharmacologique, nanofitine
- Le modèle de sarcome d'Ewing : xenogreffe ou syngénique. Le problème est que l'OSM est principalement produite par les cellules de l'hôte infiltrant la tumeur (TAM, lymphocytes et neutrophiles), il s'agit donc d'OSM murine. L'OSM de souris ne pouvant se fixer à aucun des récepteurs humains, cette cytokine n'aura aucun effet sur le développement de la tumeur humaine et le modèle par xenogreffe ne pourra pas être utilisé. Il faudrait donc choisir un modèle syngénique, non disponible actuellement au laboratoire et très difficile à mettre en œuvre.

E. Applications

Cette étude suggère que si l'OSM pourrait être un agent thérapeutique pour le traitement des ostéosarcomes et des chondrosarcomes, cette même cytokine doit être considérée comme une cible thérapeutique pour le traitement des sarcomes d'Ewing. Dans ce cas, le ciblage de la cytokine elle-même semble une bonne option en terme de spécificité. Si le ciblage de la gp130 serait beaucoup trop large avec de nombreux effets secondaires, celui de l'OSMR et du LIFR pourrait être envisageable.

Les études par puces à ADN montrent que le LIFR et l'OSMR sont également exprimés différemment dans d'autres types de tumeurs. L'objectif est maintenant de confirmer notre hypothèse selon laquelle l'expression des récepteurs et l'effet de l'OSM sur la prolifération des OS ou des ES pourraient être étendus respectivement aux tumeurs d'origine mésodermique (voire même à certains carcinomes) ou aux tumeurs d'origine neuroectodermique. Il serait intéressant d'obtenir des lignées tumorales autres que des tumeurs osseuses primitives et d'analyser dans les mêmes conditions l'expression du LIFR et de l'OSMR par Q-PCR et cytométrie en flux en parallèle de l'effet de l'OSM sur la prolifération de ces cellules. Si cette hypothèse est confirmée, notre étude sur des tumeurs rares pourrait avoir un intérêt beaucoup plus large en établissant un mécanisme commun de réponse à l'OSM dans différentes tumeurs.

3^{ème} partie : Effet protumoral de l'OSM
sur les sarcomes d'Ewing : implication
de JAK1

I. Introduction

A. Contexte

L'oncostatine M est une cytokine de la famille de l'interleukine 6 produite par les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T. La fixation de l'OSM sur ces récepteurs (gp130/LIFR ou gp130/OSMR) induit des voies de signalisation telles que les JAK, STAT, ERK et Akt. La fixation de l'OSM sur son récepteur va induire des modifications conformationnelles des chaînes réceptrices puis l'autophosphorylation des JAK qui leur sont associées. Les JAK activées pourront à leur tour phosphoryler des résidus tyrosine situés dans le domaine intra-cytoplasmique puis induire différentes voies de signalisation. L'OSM peut activer principalement les kinases ubiquitaires JAK1 et JAK2, l'expression de JAK3 étant principalement restreinte aux lignées myéloïdes et lymphoïdes [358].

Outre les propriétés communes avec les autres cytokines de type IL-6, l'OSM est la cytokine la plus active dans divers types tumoraux. Comme nous l'avons montré dans l'article précédent, l'OSM présente un effet dual sur les tumeurs osseuses primitives car elle inhibe la prolifération des OS et CS mais à l'inverse favorise la prolifération des ES. Différents facteurs semblent impliqués dans cette différence de réponse, tels que le taux d'expression des chaînes réceptrices de l'OSM, le statut de différenciation, la protéine EWS-FLI1 ou le taux d'activation de STAT3. Mais aucun de ces facteurs n'est strictement responsable de l'orientation de l'effet pro ou antiprolifératif de l'OSM et il convient de rechercher d'autres facteurs.

B. JAK1 et cancers

Diverses études ont pu montrer l'implication de la voie JAK/STAT3 dans plusieurs types de tumeurs.

1. Activation dans les cancers

L'activation constitutive de la voie JAK/STAT3 apparaît fréquente dans les cancers et contribue à l'oncogenèse. Il peut s'agir de mutations activatrices ou de surexpressions des JAK.

Des mutations et translocations dans les gènes des JAK pouvant induire l'activation constitutive de ces protéines sont principalement décrites dans différentes pathologies hématopoïétiques [634]:

- Les syndromes myéloprolifératifs (JAK2)
- Les leucémies aiguës lymphoblastiques (JAK2)

- Les leucémies aigües lymphoblastiques dérivées des précurseurs des lymphocytes T (JAK1)
- Les leucémies aigües myéloïdes (JAK1 et JAK2)
- Les leucémies aigües mégacaryoblastiques (JAK2 et JAK3)

Différentes mutations activatrices de JAK1 ont été rapportées chez les patients atteints de leucémies lymphoïdes aigües, de leucémies myéloïdes aigües mais aussi dans des cancers pulmonaires ou cancers du sein [635][636][637][638]. Ces mutations sont associées à une mauvaise réponse au traitement et à des tumeurs de mauvais pronostic. In-vitro, ces mutations favorisent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose induite par certains agents de chimiothérapie. La mutation de JAK2 la plus décrite (V617F) est caractéristique des syndromes myéloprolifératifs. Récemment il a été montré que cette mutation induit l'expression d'Oncostatine M par les cellules tumorales, contribuant à la fibrose et la néoangiogenèse dans la moelle osseuse [639].

La surexpression de JAK1 peut également participer au processus tumoral. JAK1 est surexprimé dans les cellules de cancer pulmonaire par rapport aux cellules normales [640]. La surexpression de JAK1 a été observée au cours de la transformation oncogénique d'une lignée lymphoïde (Ba/F3) et cette surexpression est un évènement oncogénique majeur induisant l'activation constitutive de la voie JAK1/STAT [641]. De plus la surexpression de JAK1 est un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes [642].

2. Inhibition dans les thérapies anticancéreuses

Certaines études mettent en évidence l'intérêt du ciblage direct de JAK1 dans des modèles tumoraux. Par exemple un SiRNA ciblant JAK1 inhibe la prolifération cellulaire et l'invasion d'une lignée de cancer pulmonaire in-vitro et inhibe la tumorigenèse in-vivo [640]. De même, l'inhibition des JAK par un agent pharmacologique inhibe la croissance, l'invasion et la migration de cellules de cancer colorectal [643].

L'inhibition de la voie JAK/STAT3 peut également intervenir dans l'effet antiprolifératif de différents agents notamment :

- L'inhibition de prolifération de lignées de cancer pulmonaire par un anticorps neutralisant l'IL-6 [644].
- L'apoptose induite dans une lignée de myélome multiple par un métabolite du ginseng [645].
- La diminution de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique induite par un composé extrait d'une plante dans un modèle de xenogreffe de cancer du sein [646].

C. Le Ruxolitinib

Suite à la découverte en 2005 de la mutation JAK2V617F dans une majorité des syndromes myéloprolifératifs [647][648], des inhibiteurs de JAK2 sont entrés en essais cliniques dès 2007. Actuellement, 10 inhibiteurs de JAK2 (présentant différents degrés de spécificité pour la kinase JAK2) ont été testés dans la myélofibrose et permettent tous de diminuer la splénomégalie et les symptômes associés à la pathologie.

Parmi ces agents, le Ruxolitinib (INCB18424) est un inhibiteur sélectif de JAK1 et JAK2, utilisable par voie orale, ayant montré son efficacité dans le traitement des pathologies myéloprolifératives dans des études cliniques de phase III [344] et commercialisé sous ATU nominative depuis 2011 dans cette indication. Les principales toxicités observées sont l'anémie et la thrombocytopénie qui peuvent être limités en contrôlant le dosage du médicament.

Cet agent pourrait potentiellement être utilisable dans d'autres pathologies. Des études précliniques ont d'ores et déjà montré l'intérêt du Ruxolitinib dans les pathologies inflammatoires cutanées [649]. Outre la myélofibrose, des études cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité du Ruxolitinib par voie orale dans l'adénocarcinome pancréatique, la leucémie aigüe lymphoblastique, le myélome multiple mais également en administration topique dans le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde.

D. Objectifs

L'objectif de ce travail est de proposer de nouvelles stratégies de prise en charge des sarcomes d'Ewing en inhibant les voies de signalisation impliquées dans l'effet proprolifératif de l'OSM. Dans ce cadre nous sommes plus particulièrement intéressés aux kinases JAK, sachant que des inhibiteurs pharmacologiques les ciblant ont déjà été développés. Nous avons ainsi étudié l'expression des JAK dans les sarcomes d'Ewing et leur implication dans l'induction de prolifération par l'OSM.

II. Matériel et méthodes

Matériel tumoral

Lignées. 19 lignées humaines de TOP ont été utilisées dont 4 CS (SW1353, CAL78, OUMS27, BCSCH03), 5 OS (MG63, SaOS2, U2OS, HOS, CAL72) et 10 ES (TC71, SKNMC, EW24, A673, TC32, SKES1, RDES, STAET1, EW7, BRZ). L'origine, les caractéristiques et le milieu de culture de ces cellules est présenté dans le tableau additionnel 1 de l'article précédent.

Xenogreffes. Pour les études utilisant des fragments de xenogreffes, des souris Nudes Rj :NRMI de 4 semaines (Elevages Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) ont reçu une injection dans le muscle paratibial de 2 millions de cellules HOS, SW1353, A673, STAET1, TC71 ou SKES1 dans 50µL de PBS. Quand les tumeurs ont atteint 3000 mm³, les souris ont été euthanasiées au CO₂ et des fragments de tumeurs ont été collectés.

Biopsies de patients. Les fragments de tumeurs d'OS (n=5) et d'ES (n=4) utilisés pour les études par Q-PCR ont été collectés au CHU de Nantes, notamment dans le cadre du projet BCS (Bone Cell Supplier Project) en collaboration avec la société Atlantic Bone Screen (Nantes).

Cytokine et inhibiteur

L'OSM recombinante humaine (R&D system, Minneapolis, USA) a été utilisée à la concentration de 50ng/mL et le Ruxolitinib (Euromedex) entre 0,1 et 25µM.

Test de viabilité

Le nombre de cellules viables a été quantifié par le kit Vialight plus (Lonza). Les cellules ont étéensemencées en plaque 96 puits à une densité de 3000 à 6000 cellules par puits puis cultivées pendant 3 jours dans 1 % SVF en présence ou non d'OSM. Le réactif du kit (contenant la luciférase et la luciférine) a ensuite été ajouté. Le principe consiste à évaluer la quantité d'ATP dans chaque puits (théoriquement proportionnel au nombre de cellules) en mesurant la quantité de photon émis (luminescence) grâce au luminomètre Tristar (Berthold technologies, Wildbad, Allemagne).

RT-QPCR

Extraction des ARN. Pour les lignées cellulaires, les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Pour les fragments de xenogreffes et les biopsies de patients, les échantillons ont tout d'abord été broyés mécaniquement au Turrax (IKA, Staufen, Switzerland) dans 1mL de réactif TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) puis les ARN totaux ont été extraits suivant le protocole préconisé par le fournisseur. Brièvement, les ARN totaux ont été isolés dans la phase aqueuse de la solution TRIzol®/chloroforme

suite à la lyse des cellules. Les ARN ont ensuite été précipités puis lavés par de l'isopropanol absolu et de l'éthanol 75%. Les culots d'ARN ont finalement été repris dans 20 µl d'eau DNase et RNase free (Braun) et conservés à -20°C.

Transcription inverse. L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 1µg d'ARN total, en utilisant le kit de RT-PCR ThermoScript (Invitrogen), dans un volume final de 20µL. Le protocole utilisé est le suivant :

- 1µg d'ADNc + 1µL oligo DT + 2µL dNTP + H2O qsp 12µL
- 5 minutes à 65°C
- Rajouter 4µL de tampon 5X + 1µL de DTT + 1µL de RNase OUT + 1µL H2O + 1µL Reverse transcriptase thermoscript
- 1 heure à 50°C puis 5 minutes à 85°C

PCR quantitative. La réaction de PCR contenait 20 ng d'ADNc, 300nM des amorces sens et antisens (Tableau 3) et du SYBR green (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) dans un volume final de 10µL. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicat, en plaque 96 puits, dans le thermocycleur de PCR quantitative CFX96 (Biorad). Cyc1 (cytochrome c-1) et HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) ont été utilisés comme gènes de référence.

Gène humain	Séquence des amorces
EWS-FLI1	Sens : 5'- gccaagctccaagtcaatatagc -3' Antisens : 5'- gaggccagaattcatgttattgc -3'
JAK1	Sens : 5'- cggataacatcagcttcatgc -3' Antisens : 5'- caccagcaggttgagattt -3'
JAK3	Sens : 5'- cgtgacctcaatagcctcatc-3' Antisens : 5'- attccacagcccatcacg -3'
Cyc1	Sens : 5'- gcatggtggtgaggactacg -3' Antisens : 5'- ggccaggaaagtaggggttg -3'
HPRT	Sens : 5'- tgaccttgattattttgcatacc -3' Antisens : 5'- cgagcaagacgttcagtcct -3'

Tableau 3: Séquences des amorces utilisées en PCR quantitative

Western blot

Les lysats cellulaires sont réalisés en plaque 6 puits sur des cellules à environ 70% de confluence. Les cellules sont cultivées pendant 2 heures en l'absence de SVF puis lysées par une incubation de 30 minutes à 4°C dans 200µL de tampon de lyse. Les lysats cellulaires sont récupérés, centrifugés (10 minutes, 12000 tours/minute, 4°C) et conservés à -20°C.

Le dosage protéique de chaque échantillon est réalisé par la technique BCA. En plaque 96 puits, 10µL de lysat cellulaire dilué au 1/5e ou d'une gamme étalon de BSA sont mis en présence de 200µL de réactif BCA (Sulfate de cuivre dilué au 1/50^{ème} dans une solution d'Acide bicinchoninique, Sigma). Après 30 minutes d'incubation, les densités optiques sont mesurées à 570 nm par le lecteur de plaques VICTOR 2 (Beckman).

Le Western blot est réalisé en plusieurs étapes:

- Dépôt de 15µg de lysat protéique (dilué au demi dans le bleu de chargement et porté à ébullition 5 minutes) par puits dans un gel à 10 % de polyacrylamide.
- Migration et séparation par électrophorèse en fonction du poids moléculaire dans un tampon dénaturant avec une intensité de 15mA par gel pendant environ 2h.
- Transfert sur membrane de PDVF (polyfluorure de vinylidène, Immobilon™, Millipore, Billerica, USA) dans une cuve contenant le tampon de transfert, par un courant de 100mA sur 2h.
- Incubation 1 nuit à 4°C avec les anticorps ciblant l'Actine (Sigma), JAK1 ou JAK2 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA) en PBS, Tween 0,05%, BSA 3%.
- Incubation 1h avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase en PBS, Tween 0,05%, lait 5%.
- Révélation des protéines grâce à une solution ECL (Pierce, Rockford, USA) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase puis mesure de la Chemiluminescence sur une caméra G-box (Syngene, Cambridge, USA).

Puces à ADN

Des données de puces à ADN publiques et accessibles ont été utilisées selon le protocole indiqué dans l'article précédent.

Modèle A6731c dox

La lignée de sarcome d'Ewing A673 a été modifiée stablement pour exprimer un ShRNA ciblant EWS-FLI1 inducible par la doxycycline. Les cellules sont maintenues dans un milieu de sélection contenant la Blastidicine (10 µg/ml, Merck) et la Zéocine (100 µg/ml, Invitrogen). L'inhibition d'EWS-FLI1 est induite lors du traitement par la doxycycline (1µg/mL, Sigma).

Transfection SiRNA

Les cellules sont transfectées par l'Interférine (PolyPlus-transfection, Illkirch, France) et 10nM de SiRNA CT ou SiRNA JAK1 (s7647, Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur.

Analyse statistique

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

III. Résultats

A. JAK1 est surexprimé dans les sarcomes d'Ewing

Puisque les effets inverses de l'OSM sur la prolifération des sarcomes d'Ewing par rapport aux ostéosarcomes et chondrosarcomes peuvent être dus à un contexte différent de kinases et facteurs de transcriptions impliqués dans la signalisation de l'OSM, l'expression des JAK a notamment été analysée dans nos lignées. Le transcrite *JAK1* est 4 fois plus exprimé dans les lignées de sarcome d'Ewing par rapport aux ostéosarcomes et chondrosarcomes ($p < 0,01$) (Figure 46a). Ce résultat est confirmé au niveau protéique puisque l'étude par western blot montre que l'expression de la forme totale de JAK1 dans des cellules à l'état basal est nettement plus importante dans les sarcomes d'Ewing (Figure 46b).

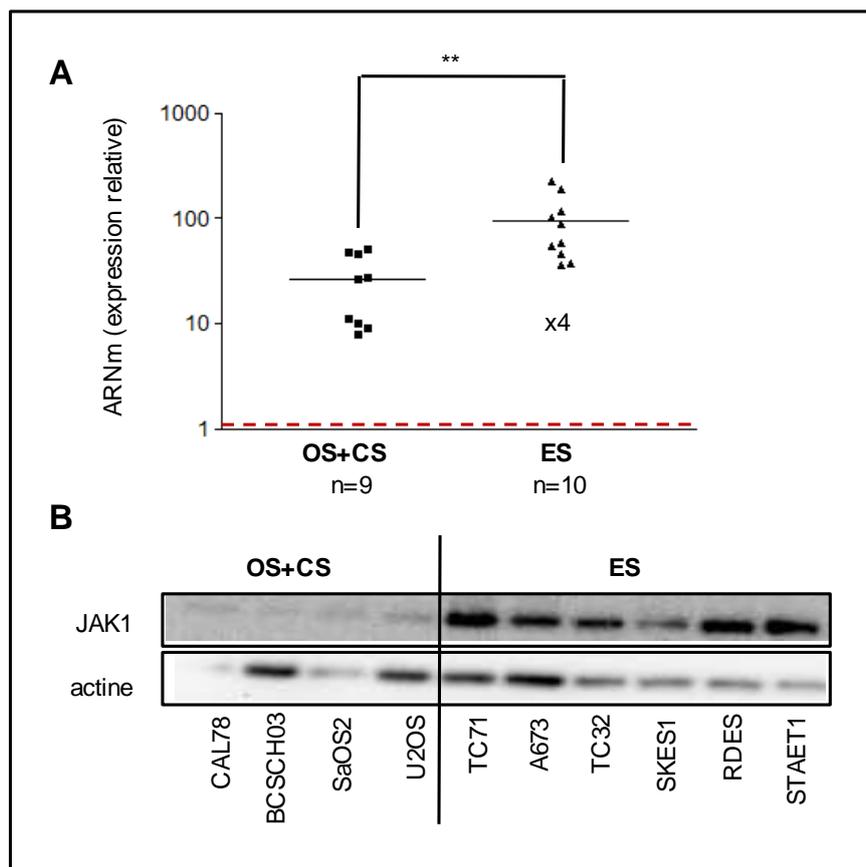


Figure 46: JAK1 est surexprimé dans les lignées de sarcome d'Ewing

A- l'expression de l'ARNm JAK1 a été mesurée par PCR quantitative dans 19 lignées de tumeurs osseuses primitives. La ligne rouge correspond à un Ct de 30, limite en dessous de laquelle un gène est considéré comme non exprimé. L'analyse par Mann whitney indique une significativité $p < 0,01$. B- l'expression de la forme totale de JAK1 a été analysée dans 10 lignées par western blot.

L'expression de *JAK1* a ensuite été étudiée au sein de tumeurs issues de patients ou de xénogreffes chez la souris. En comparant différentes tumeurs pédiatriques par puces à ADN, il apparaît que les sarcomes d'Ewing sont les tumeurs qui expriment le plus *JAK1* (Figure 47a). L'étude par Q-PCR de quelques tumeurs confirme cette observation et indique que les sarcomes d'Ewing expriment en moyenne 10 fois plus *JAK1* que les ostéosarcomes ($p < 0,01$). Le même rapport a été établi en comparant l'expression de *JAK1* dans quelques tumeurs chez la souris (Figure 47b).

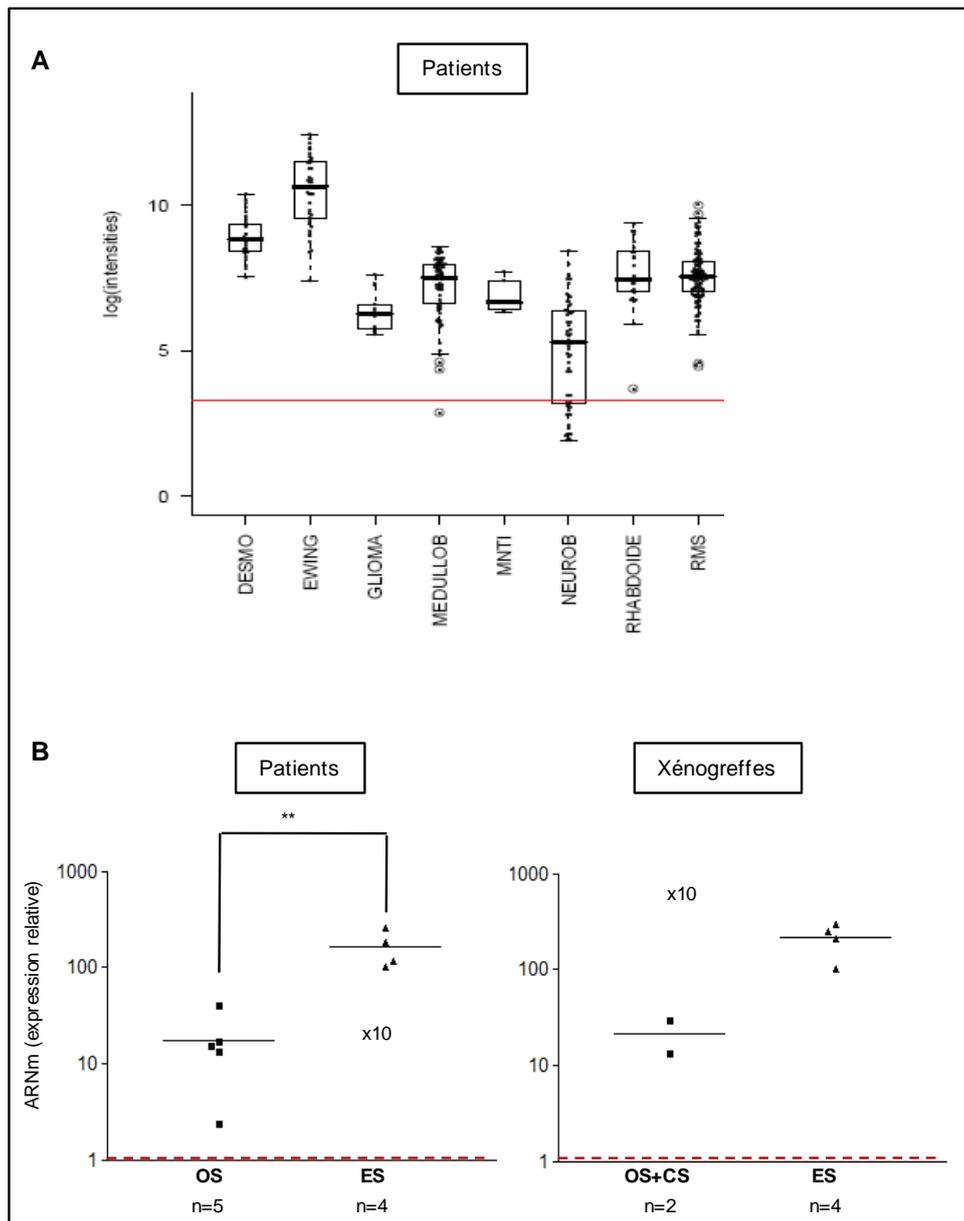


Figure 47: JAK1 est surexprimé dans les tumeurs de sarcome d'Ewing

A- L'expression de *JAK1* a été mesurée par puce à ADN dans des biopsies de tumeurs pédiatriques. B- L'expression de l'ARNm *JAK1* a été mesurée sur des biopsies humaines (n=9) ou des xénogreffes (n=6) de tumeurs osseuses primitives. La ligne rouge correspond à la limite en dessous de laquelle un gène est considéré comme non exprimé. Les lignes noires représentent les moyennes et l'analyse statistique a été réalisée par la méthode Mann whitney.

B. JAK2 et JAK3 ne sont pas différenciellement exprimés

L'étude par western blot montre que l'expression de la forme totale de JAK2 dans des cellules à l'état basal est très variable selon les lignées, mais ne dépend pas du type de tumeur (Figure 48a). L'étude des transcrits JAK3 montre que ce gène est très peu exprimé dans toutes les lignées et n'est pas significativement différent entre les ES, OS et CS (Figure 48b). L'expression de JAK2 et JAK3 a ensuite été étudiée au sein de différentes tumeurs pédiatriques par puces à ADN. Les sarcomes d'Ewing expriment JAK2 et JAK3, à des taux similaires aux autres tumeurs (Figure 48c).

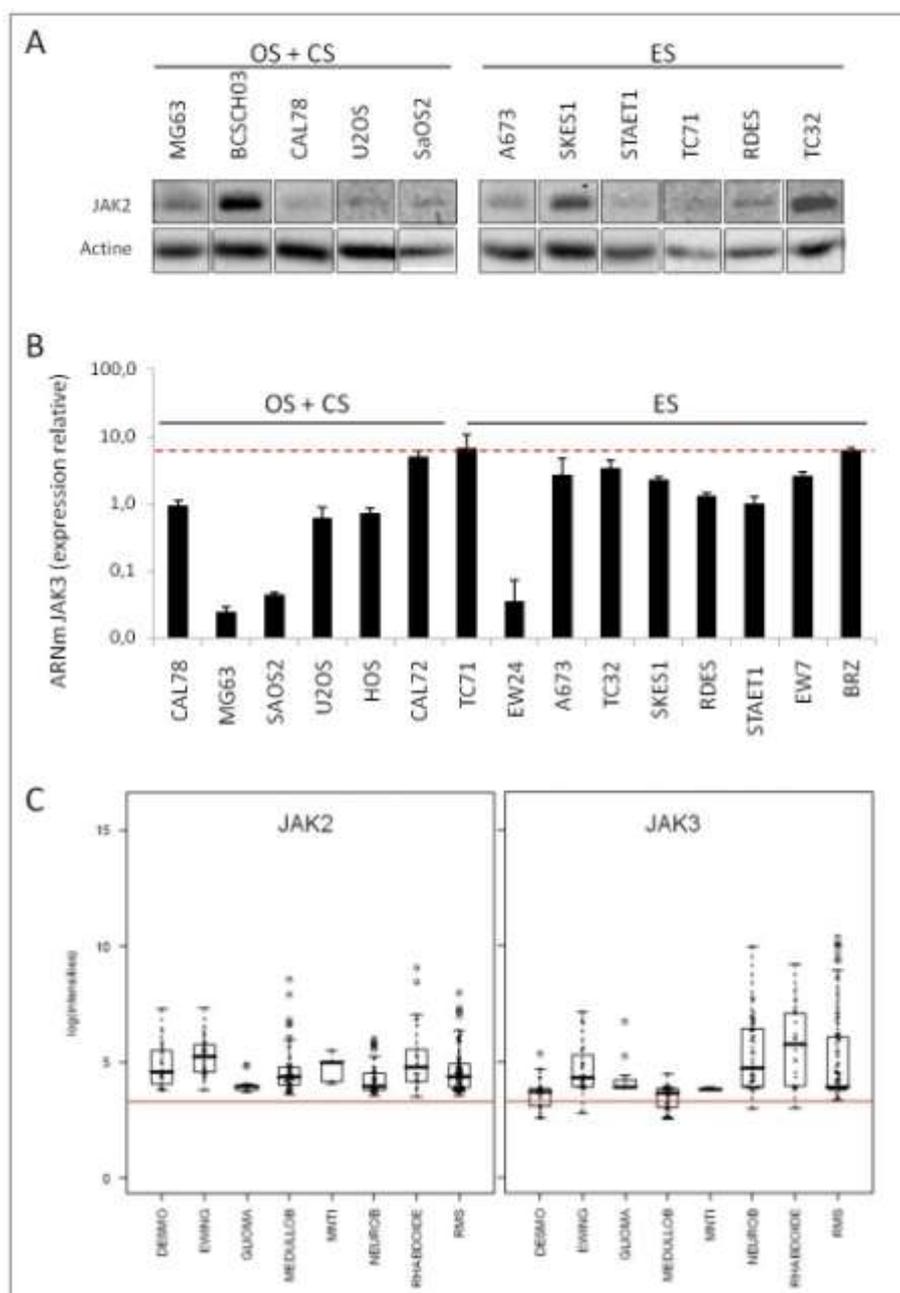


Figure 48: Expression de JAK2 et JAK3 dans les lignées et les tumeurs

A- L'expression de la forme totale de JAK2 a été analysée dans 11 lignées par western blot. B- l'expression de l'ARNm JAK3 a été mesurée par PCR quantitative dans 15 lignées de tumeurs osseuses primitives. La ligne rouge correspond à un Ct de 30, limite en dessous de laquelle un gène est considéré comme non exprimé. C- L'expression de JAK2 et JAK3 a été mesurée par puce à ADN dans des biopsies de tumeurs pédiatriques.

C. La surexpression de JAK1 est dépendante d'EWS-FLI1

Le rôle d'EWS-FLI1 dans la régulation de l'expression de *JAK1* a été évalué dans la lignée A673 ShEWS-FLI1 inductible par la doxycycline. Le traitement par la doxycycline diminue rapidement et stablement les taux d'EWS-FLI1 (-50 à 60%) et diminue en parallèle significativement l'expression de *JAK1* (-40%) avec une cinétique similaire (Figure 49).

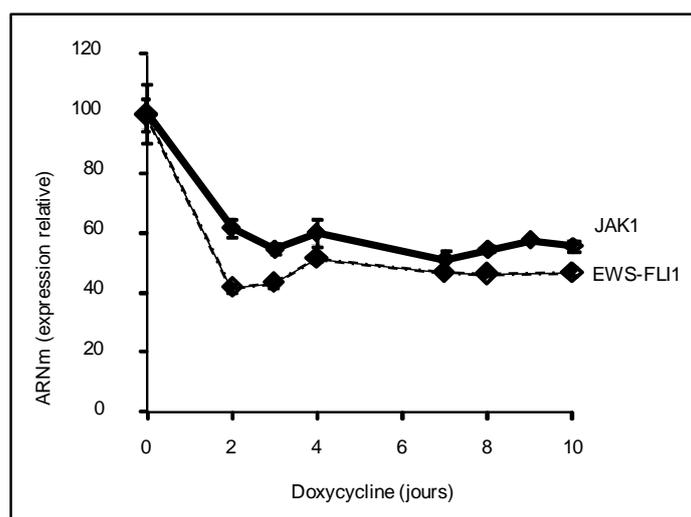


Figure 49: L'inhibition d'EWS-FLI1 diminue l'expression de JAK1

Les cellules A673 ShEWS-FLI1 ont été traitées pendant 2 à 10 jours avec la doxycycline. L'expression de l'ARNm *JAK1* a été mesurée par PCR quantitative (n=3). Le résultat représente le pourcentage d'expression comparé aux cellules non traitées par la doxycycline.

D. L'inhibition de JAK1 prévient l'effet proprolifératif de l'OSM dans les sarcomes d'Ewing

Le rôle de *JAK1* dans l'induction ou l'inhibition de prolifération par l'OSM a été évalué en utilisant un SiRNA et un inhibiteur pharmacologique. L'inhibition de *JAK1* par le SiJAK1 a été tout d'abord validée par Q-PCR (Figure 50a). Le SiJAK1 prévient presque totalement et de manière significative l'effet proprolifératif de l'OSM dans la lignée SKES1 ainsi que l'effet antiprolifératif de l'OSM dans la lignée MG63 (Figure 50b). Le Ruxolitinib utilisé à 0,25µM prévient complètement l'effet proprolifératif de l'OSM dans la lignée SKES1 ainsi que l'effet antiprolifératif de l'OSM dans la lignée MG63 (Figure 50c). De plus cet effet du Ruxolitinib est dépendant de la dose. De 0,1 à 2,5µM, le Ruxolitinib n'affecte pas le taux de prolifération basal des cellules, mais prévient de façon dose-dépendante l'effet de l'OSM sur la prolifération. De 10 à 25µM, le Ruxolitinib diminue de façon dose dépendante la prolifération basale des cellules et l'OSM n'a plus aucun effet sur la prolifération des deux lignées (Figure 50d).

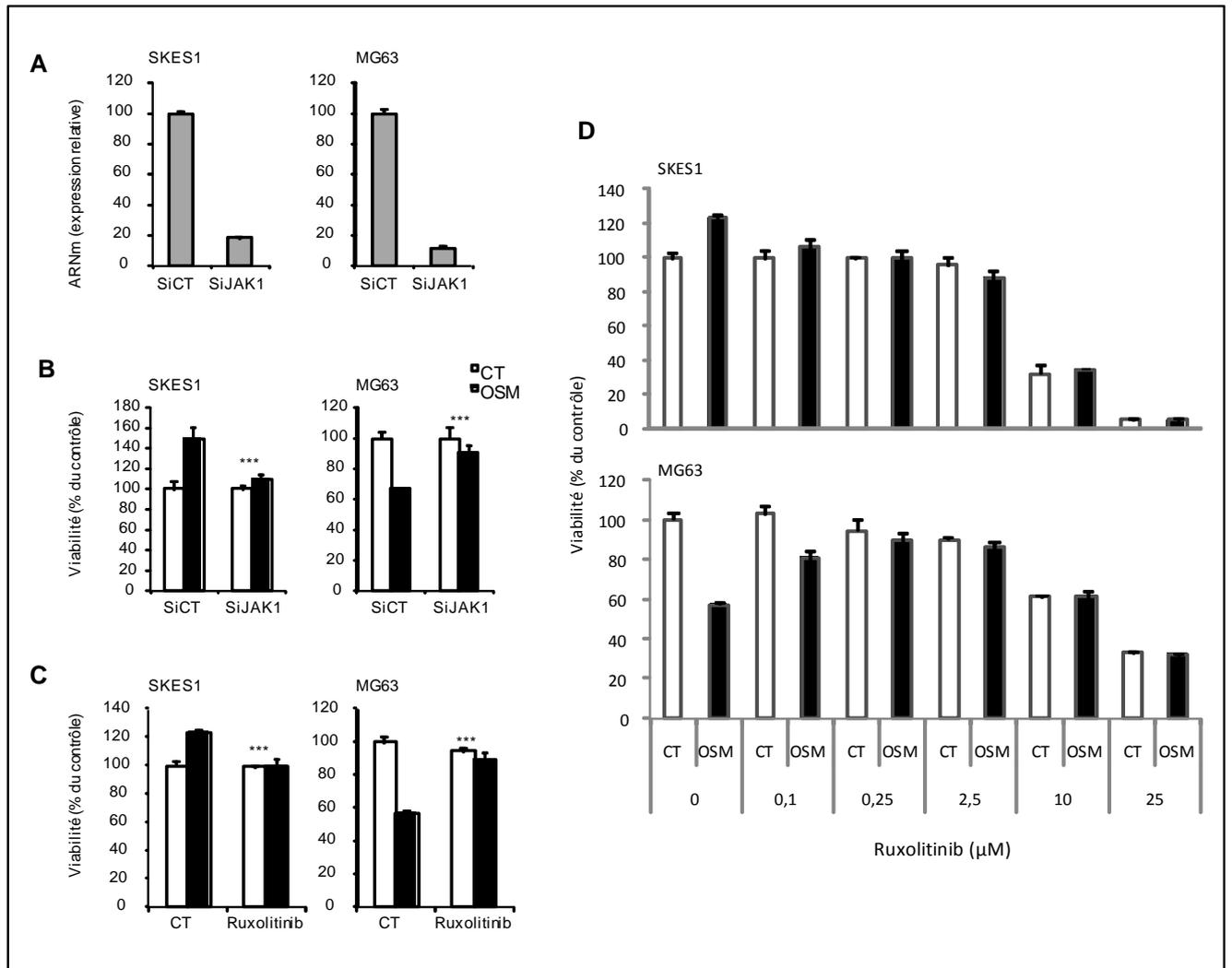


Figure 50: L'inhibition de JAK1 prévient l'effet prolifératif de l'OSM sur les ES

Etude réalisée sur 1 lignée d'ES (SKES1) et 1 lignée d'OS (MG63). A- l'expression de l'ARNm JAK1 a été mesurée par Q-PCR 48 heures après la transfection par un SiCT ou un SiJAK1. B- Les cellules ont été transfectées avec les SiRNAs indiqués en plaque 24 puits. 48 heures plus tard, ces cellules ont été décollées, réensemencées en plaque 96 puits puis traitées ou non par l'OSM humaine pendant 3 jours dans un milieu contenant 1% de SVF. La quantité de cellules viables a été évaluée par le test Vialight. L'analyse statistique compare l'induction ou l'inhibition de prolifération par l'OSM dans les cellules transfectées par le SiJAK1 par rapport aux cellules transfectées par le SiCT. C- Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits, prétraitées ou non pendant 1 heure par le Ruxolitinib à 0,25μM (C) ou par différentes concentrations de Ruxolitinib (D) puis traitées pendant 3 jours avec ou sans OSM et 1% SVF. La quantité de cellules viables a été évaluée par le test Vialight. L'analyse statistique compare l'induction ou l'inhibition de prolifération par l'OSM dans les cellules traitées avec le Ruxolitinib par rapport aux cellules non traitées.

IV. Discussion

A. Surexpression de JAK1 dans les sarcomes d'Ewing

Cette étude préliminaire démontre la surexpression de JAK1 dans les sarcomes d'Ewing. Cette surexpression a pu être mise en évidence aussi bien dans les lignées, les modèles animaux et chez les patients notamment en comparaison d'autres tumeurs osseuses primitives, ce qui signifie que l'expression de JAK1 est constitutive et n'est pas modifiée par le microenvironnement tumoral.

De plus la surexpression de JAK1 dans les sarcomes d'Ewing est induite au niveau transcriptionnel et se répercute au niveau protéique. Cette surexpression est dépendante de l'expression d'EWS-FLI1 mais le caractère direct ou indirect de la régulation n'a pas pu être mis en évidence. Une première étude par ChIP avec immunoprécipitation FLI1, n'a pas montré de fixation du facteur de transcription EWS-FLI1 sur le promoteur de JAK1 mais seul 2 couples d'amorces ont été dessinés. Il serait nécessaire de réaliser des études complémentaires pour confirmer ce résultat.

Des taux importants de JAK1 pourraient résulter en une activation constitutive de la voie JAK1/STAT3 comme cela a déjà été démontré dans d'autres types de tumeurs [640][641]. De fait, nous avons pu mettre en évidence dans l'article précédent une activation plus importante de STAT3 dans les sarcomes d'Ewing par rapport aux autres tumeurs osseuses primitives en réponse à l'OSM.

Outre la surexpression de JAK1, il serait intéressant de rechercher d'éventuelles mutations activatrices dans les gènes de cette kinase, pouvant également résulter en une activation accrue de la voie JAK/STAT.

Les taux de la protéine JAK1 totale ne sont pas modifiés lors d'un traitement par l'OSM, mais il serait important d'étudier par western blot le taux de cette protéine sous forme phosphorylée et donc active, avant et après un traitement par l'OSM dans les ES en comparaison des OS et CS. Les premiers essais ne nous ont pas permis de mettre en évidence la forme P-JAK1 dans nos lignées.

Concernant les autres types de JAK, les études ne montrent pas de différences d'expression entre les ES et les autres tumeurs (dans les lignées ou chez les patients). Nous avons également observé une induction de l'expression des transcrits JAK3 lors d'un traitement par l'OSM mais de façon similaire dans les ES, CS et OS. En revanche l'expression de la protéine JAK2 n'est pas modifiée par l'OSM. Les premiers essais par western blot ne nous ont pas permis de mettre en évidence les formes P-JAK2, P-JAK3 et JAK3 total dans nos lignées. De plus l'expression des transcrits JAK2 reste à analyser dans les lignées.

B. JAK1 et prolifération

Le rôle de JAK1 dans la prolifération des tumeurs osseuses primitives a été évalué par un SiRNA ciblant JAK1 et par le Ruxolitinib. Ces deux agents préviennent l'induction de prolifération par l'OSM dans les sarcomes d'Ewing.

Le SiRNA ciblant JAK1 diminue de 80% l'expression des transcrits JAK1 et il serait intéressant de confirmer cette inhibition au niveau protéique. De plus la spécificité du ciblage de JAK1 n'a pas été évaluée, notamment par Q-PCR JAK2 et JAK3. L'intérêt de l'utilisation du SiJAK1 est simplement d'établir la preuve de concept.

Le Ruxolitinib est un inhibiteur de JAK1 et JAK2. Les résultats de prolifération montrent que le Ruxolitinib est un peu plus efficace que le SiJAK1. Ceci pourrait être dû à une inhibition plus importante de JAK1 ou à l'association de l'inhibition de JAK1 et JAK2.

A faibles concentrations (0,1 à 2,5 μ M), dans les sarcomes d'Ewing, le Ruxolitinib inhibe spécifiquement l'effet proprolifératif de l'OSM de façon dose-dépendant mais à des concentrations plus élevées, il diminue également le taux basal de prolifération des cellules. De façon inattendue, le SiJAK1 ou le Ruxolitinib à faibles concentrations sont, à l'inverse, capables de prévenir l'inhibition de prolifération induite par l'OSM dans une lignée d'ostéosarcome ne surexprimant pas JAK1. A des concentrations élevées, tout comme dans les ES, le Ruxolitinib diminue le taux basal de prolifération des cellules.

Il faudra déterminer l'implication du SiJAK1 et du Ruxolitinib sur l'activation de STAT3, ERK et Akt dans les lignées lors d'un traitement par l'OSM.

JAK1 participe donc à la fois à l'effet pro et à l'effet antiprolifératif de l'OSM. Le niveau d'expression de JAK1 pourrait médier soit l'inhibition de prolifération (si son taux est faible) soit une induction de prolifération (si son taux est élevé). Mais JAK1 n'est pas le seul facteur dictant la réponse à l'OSM car son inhibition dans un sarcome d'Ewing empêche l'effet proprolifératif mais ne permet pas d'induire un effet antiprolifératif.

Les effets du Ruxolitinib à fortes doses pourraient être liés à l'inhibition de JAK2, au fait que JAK1 ne soit pas uniquement impliqué dans la signalisation par l'OSM, ou à des effets toxiques non spécifiques. Les JAK participent à la transduction du signal de différentes familles de récepteurs cytokiniques : les récepteurs liant JAK1 incluent la famille de la gp130 mais également la famille à chaîne γ commune (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R) et les récepteurs cytokiniques de type II (IL-10R, récepteurs des interférons) (Figure 51).

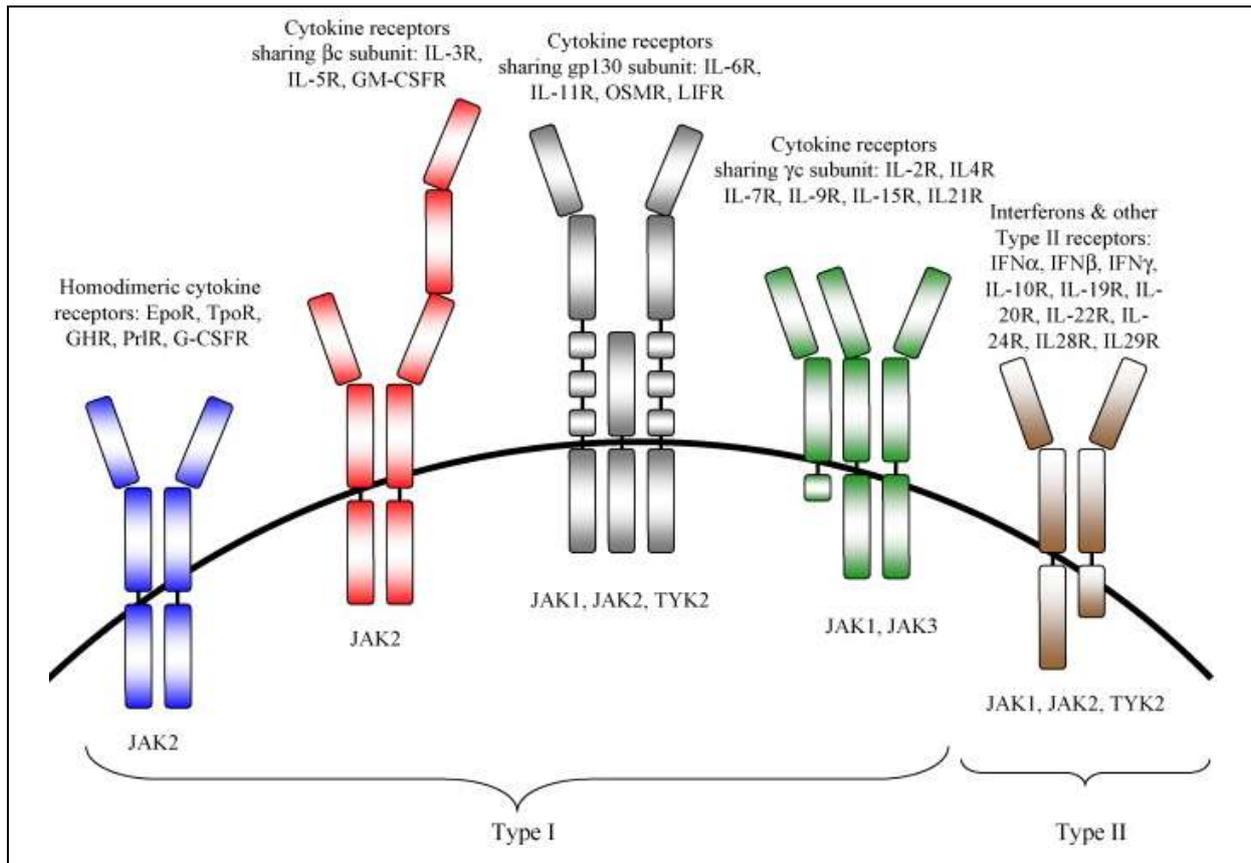


Figure 51: Récepteurs capables d'activer les JAK
D'après [634]

Le rôle prédominant des JAK au niveau cytoplasmique est la phosphorylation et l'activation des STAT induisant l'expression de gènes liés au stress cellulaire, à la prolifération et la différenciation. Il a récemment été mis en évidence la présence de JAK1 et JAK2 au niveau nucléaire dans certaines cellules dans des conditions de croissance cellulaire rapide [650]. Les JAK nucléaires affectent l'expression génique en activant d'autres facteurs de transcription que les STAT ou par des mécanismes épigénétiques (par exemple en phosphorylant les histones H3). Les JAK nucléaires pourraient également avoir un rôle dans la biologie des cellules souches. Outre les différences d'expression des JAK entre les tumeurs osseuses primitives, il pourrait exister des différences de localisation de ces kinases, induisant des effets inverses sur la prolifération. De plus les JAK pourraient interagir avec des voies de signalisation différentes notamment avec la voie PI3K/mTOR [640].

Dans les ES, l'OSM et ses voies de signalisation doivent être considérés comme des cibles thérapeutiques. Parmi celles-ci, JAK1 semble une cible intéressante bénéficiant d'un inhibiteur pharmacologique. Le Ruxolitinib est déjà commercialisé chez l'homme, ce qui facilite la réalisation d'études précliniques notamment sur les sarcomes d'Ewing. La prochaine étape serait d'étudier l'effet du Ruxolitinib, administré par voie orale, dans un modèle de sarcomes d'Ewing chez la souris.

CONCLUSION

GÉNÉRALE

I. Rôle de l'OSM dans la biologie des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing

Suite aux travaux réalisés notamment au laboratoire démontrant l'effet anticancéreux de l'OSM sur les ostéosarcomes [400][561][460][562], ce travail de thèse avait pour objectif initial d'étudier le rôle de l'OSM et des cytokines de la famille de l'IL-6 dans la biologie de deux autres tumeurs osseuses primitives : les sarcomes d'Ewing et les chondrosarcomes. Le but était de mieux comprendre l'impact de ces cytokines dans le développement de ces tumeurs en vue de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques.

OSM et chondrosarcomes

In-vitro, l'OSM inhibe la prolifération et induit un blocage du cycle cellulaire dans plusieurs lignées de chondrosarcome, indépendamment de p53. La signalisation fait vraisemblablement intervenir les JAK (1 et 3) et les STAT (1 et 3). Cette cytokine sensibilise la lignée p53 sauvage à l'apoptose induite par un agent cytotoxique. De plus, l'OSM induit la différenciation chondrocytaire (pré)hypertrophique des cellules de chondrosarcome.

In-vivo, l'injection intratumorale d'AdOSM dans le modèle de chondrosarcome de Swarm chez le rat réduit le développement tumoral en diminuant la prolifération et en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Cet effet antitumoral est associé à une réduction du volume osseux périosté.

Dans les chondrosarcomes, l'injection d'OSM humaine recombinante pourrait ainsi être une nouvelle approche de thérapie anticancéreuse adjuvante.

Toutefois différentes limites devront être prises en compte dans ce type de thérapie :

- L'importante matrice cartilagineuse et la faible vascularisation des chondrosarcomes limite l'accessibilité des agents de chimiothérapie aux cellules tumorales. L'injection de la cytokine directement au sein de la tumeur améliorerait la biodisponibilité et l'efficacité du traitement.
- Les fréquentes altérations de p53 dans les chondrosarcomes [258] pourraient limiter l'efficacité de l'OSM.

- L'OSM présente des effets toxiques généraux (inflammation généralisée, syndrome pseudogrippal). Une meilleure compréhension de ces effets toxiques apparaît nécessaire. Ceux-ci pourraient être limités en diminuant au maximum les doses de la cytokine en systémique par exemple avec une administration locale par perfusion de membre (au même titre que ce qui est pratiqué avec le TNF- α) [314][315]. Un autre moyen d'augmenter la concentration locale d'OSM et de diminuer la concentration systémique serait de cibler la cytokine au niveau osseux ou cartilagineux en l'associant chimiquement à un bisphosphonate [651] ou à un ammonium quaternaire [652] par exemple.
- L'OSM pourrait favoriser la dissémination métastatique en facilitant le détachement de la cellule tumorale de son milieu d'origine (diminution d'adhésion), en favorisant l'invasion de la matrice environnante (induction de la synthèse de protéases) et en induisant la néoangiogenèse tumorale (augmentation de l'expression du VEGF). Cet effet dual de l'OSM a déjà été mis en évidence dans les astrogliomes [570], les cancers du sein [573] ou les carcinomes squameux du col de l'utérus [574]. Ces modifications ont été observées in-vitro dans les chondrosarcomes mais l'OSM n'a pas induit la dissémination métastatique in-vivo.
- L'OSM pourrait indirectement stimuler la prolifération tumorale en induisant une ostéolyse (surexpression de RANKL, accroissement de la formation des ostéoclastes et réduction du volume osseux). L'association avec un agent anti-résorption osseuse (bisphosphonate, dénosumab) pourrait contourner ce problème et améliorer l'efficacité de l'OSM

Les perspectives d'étude in-vitro consisteront à:

- Préciser la signalisation en utilisant des SiRNA (JAK, STAT)
- Etudier des lignées humaines p53 sauvage
- Déterminer l'origine de la résistance de la lignée SW1353
- Cultiver les lignées en 3D et anoxie

In-vivo je propose de :

- Tester un autre mode d'administration de l'OSM permettant un traitement plus long (lentivirus, vecteurs synthétiques non viraux, électrotransfert, OSM recombinante)
- Utiliser un modèle autre que SRC. Des modèles de xéno greffe de lignées humaines sont notamment en cours d'établissement au laboratoire et collaboration avec Atlantic Bone Screen dans le cadre du projet BCS.
- Associer l'OSM à un agent anti-résorption osseuse ou à un agent de chimiothérapie
- Etudier l'effet de l'OSM sur les cellules souches cancéreuses

OSM et sarcomes d'Ewing

In-vitro, l'OSM favorise la prolifération des lignées de sarcome d'Ewing et accélère le cycle cellulaire, indépendamment de p53. L'induction de prolifération par l'OSM est dépendante de JAK1 et est caractérisée par une activation importante de STAT3, l'induction de C-MYC mais pas de C/EBPbeta. L'OSM ne sensibilise pas les lignées à l'apoptose et n'induit pas leur différenciation. Chez les patients atteints de sarcome d'Ewing, la cytokine est effectivement retrouvée au sein des tumeurs, pouvant participer à leur développement.

Dans les sarcomes d'Ewing, le ciblage de l'OSM pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique.

Les modalités de ce ciblage restent à définir car il peut être réalisé à différents niveaux.

Ciblage de la cytokine (OSM / LIF)

L'OSM (ou le LIF) endogène pourrait être directement « piégé » par des anticorps monoclonaux ou des nanofitines. Les nanofitines, également appelées affitines, sont des petites protéines synthétiques capables de fixer un antigène, mais beaucoup plus stables que les anticorps. Théoriquement, l'avantage du ciblage de l'OSM découle de la pléiotropie et de la redondance des cytokines de la famille de l'IL-6. En effet, le blocage de l'OSM endogène en systémique empêche les activités physiologiques de cette cytokine (inflammation, hématopoïèse, régénération hépatique...) mais ces propriétés peuvent être supportées par d'autres cytokines. En revanche, l'OSM est la cytokine la plus active sur les tumeurs, et les autres cytokines de la famille de l'IL-6 ne pourront pas contrebalancer l'inhibition de l'OSM (à part peut-être le LIF).

Ciblage du récepteur (OSMR / LIFR / gp130)

L'OSM induisant la prolifération dans les sarcomes d'Ewing via sa fixation aux récepteurs de type I (LIFR/gp130) et de type II (OSMR/gp130), les 3 sous unités réceptrices pourraient être ciblées (par des anticorps, nanofitines ou formes solubles du récepteur).

Le ciblage de la gp130 est applicable mais cette chaîne permet la transduction du signal de toutes les autres cytokines de la famille de l'IL-6. Son utilisation laisse présager de nombreux effets secondaires, au regard du phénotype létal des souris gp130^{-/-} qui présentent de nombreuses anomalies [497][498]. L'utilisation d'une forme soluble de gp130 associé au fragment Fc d'une IgG est actuellement en développement préclinique et a montré son efficacité dans des pathologies inflammatoires ainsi que dans le cancer du colon [334].

Le ciblage de l'OSMR (également utilisé par l'IL-31) ou du LIFR (faisant aussi partie du récepteur du LIF, CT-1, CNTF, NP et CLC) augmenterait la spécificité d'action par rapport au ciblage de la gp130. Au regard des études in-vitro, le ciblage simultané du LIFR et de l'OSMR améliorerait l'efficacité.

Ciblage de la signalisation (JAK1 / STAT3)

Nos études in-vitro mettant en évidence l'importance de JAK1 et de STAT3 dans l'induction de prolifération par l'OSM, ces protéines pourraient être ciblées par des inhibiteurs pharmacologiques (ou des techniques de SiRNA) afin de bloquer la signalisation de l'OSM.

Concernant JAK1, le Ruxolitinib pourrait être une approche thérapeutique rapidement envisageable puisque cet inhibiteur pharmacologique est déjà commercialisé dans d'autres pathologies tumorales [344] et présente des effets secondaires limités.

Concernant STAT3, différents inhibiteurs en cours de développement préclinique peuvent être envisagés [653] :

- Des peptides ciblant le domaine SH2 de STAT3
- Des petites molécules chimiques inhibitrices de STAT3
- Des oligonucléotides leurres représentant la séquence de fixation de STAT3 à l'ADN
- Des inhibiteurs de STAT3 dérivés du platine

Les perspectives d'étude consisteront in-vitro à:

- Préciser les gènes modulés par l'OSM responsables de l'induction de prolifération, en premier lieu *C-MYC*
- Comprendre les effets de l'OSM lors d'un traitement à plus long terme

et in-vivo à:

- Tester un autre mode d'administration de l'OSM pour établir la preuve de concept de son effet pro-tumoral
- Administrer le Ruxolitinib dans un modèle de sarcome d'Ewing
- Cibler les cytokines ou récepteurs [OSM ou LIF ou OSMR ou LIFR] dans un modèle de sarcome d'Ewing

Effets de l'OSM	Chondrosarcomes	Sarcomes d'Ewing
Prolifération	--	++
Signalisation	JAK1, JAK3, STAT1, STAT3	JAK1, STAT3
Cycle cellulaire	Blocage G0/G1 ou S/G2/M	Entrée en cycle des cellules en G0
Différenciation	hypertrophique	0
Morphologie	Allongement	0
Adhésion	Réduction	0
Apoptose	Sensibilisation (p53 sauvage)	0
In-vivo	Réduction du volume tumoral	?

Tableau 4: Récapitulatif des effets de l'OSM observés sur les principales fonctions cellulaires des ES et CS
Synthèse des résultats obtenus sur un panel de 5 lignées de chondrosarcome et 10 lignées de sarcome d'Ewing.

II. Rôle des autres cytokines de la famille de l'IL-6

dans ces tumeurs

Si l'OSM est apparue la cytokine la plus active pour inhiber la prolifération des ostéosarcomes et chondrosarcomes ou stimuler la prolifération des sarcomes d'Ewing, d'autres cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent également modifier la prolifération des lignées de tumeurs osseuses primitives in-vitro.

LIF et CT-1

Alors que le LIF n'a aucun effet sur la prolifération des ostéosarcomes et chondrosarcomes, il est capable d'induire la prolifération des sarcomes d'Ewing. L'absence de réponse des OS et CS provient vraisemblablement de la très faible expression du LIFR dans ces tumeurs, or le LIF ne peut transduire le signal que par le récepteur LIFR/gp130. Les effets du CT-1 sur la prolifération des tumeurs osseuses primitive sont identiques à ceux du LIF, ces deux cytokines utilisant exactement le même récepteur.

Dans d'autres types de tumeurs, le LIF est principalement décrit comme un facteur de croissance. C'est le cas pour les cancers du sein [604], rhabdomyosarcomes [607], gliomes [608], mélanomes [609] et carcinomes pancréatiques [610]. Toutefois, le LIF peut inhiber la prolifération des cancers thyroïdiens [612].

Il serait intéressant de surexprimer le LIFR dans des lignées d'OS ou CS pour déterminer si le LIF devient pro ou anti-tumoral. La faible expression du LIFR est la conséquence d'une forte expression endogène de LIF par les cellules d'OS et CS entraînant une désensibilisation. Ce mécanisme de résistance au LIF a été démontré dans des cellules d'astrocytome pour lesquelles, à l'inverse, la production endogène d'OSM ne modifie pas la réponse à cette cytokine [654].

Le ciblage du LIFR dans les sarcomes d'Ewing permettrait ainsi d'inhiber les effets proprolifératifs de l'OSM, de LIF et du CT-1

IL-6 + IL-6Rs

L'IL-6 seule ne montre aucun effet sur la prolifération des trois types de tumeurs probablement à cause d'une faible expression de l'IL-6R. L'association de l'IL-6 avec son récepteur soluble permet de contourner ce problème et ne requiert la présence que de la gp130 [352][562]. Dans ce contexte, tout comme l'OSM (mais avec une intensité moindre), l'IL-6 inhibe la prolifération des OS et CS et stimule la prolifération des ES. Le Tocilizumab, anticorps neutralisant l'IL-6Rs, pourrait ainsi représenter une autre approche thérapeutique des sarcomes d'Ewing rapidement applicable.

Dans d'autres types de tumeurs, l'IL-6 + IL-6Rs inhibe la prolifération des mélanomes [459], cancers du sein [520], ostéosarcomes [460], cancers pulmonaires ou métastases hépatiques [462] mais stimule la prolifération de cellules de mélanome à des stades avancés [466], de myélomes [467], de cancers de la prostate [468] ou de glioblastomes [522].

L'OSM, le LIF, le CT-1 et l'IL-6 semblent donc induire des voies de signalisation similaires pour réguler la prolifération cellulaire, mais des études complémentaires seraient nécessaires.

IL-27

Parmi les cytokines de la famille de l'IL-6, l'IL-27 est la seule capable d'inhiber la prolifération des ES ainsi que celle des OS et CS.

D'autres études ont déjà montré l'effet antitumoral de l'IL-27. Par exemple, cette cytokine inhibe la prolifération de cellules de mélanome [464] et la surexpression d'IL-27 dans des cellules de cancer pulmonaire inhibe la migration cellulaire et l'invasion [655].

Le récepteur de l'IL-27 étant strictement utilisé par cette cytokine, les propositions de ciblage de l'OSMR ou du LIFR dans les sarcomes d'Ewing n'affecteraient en rien les effets bénéfiques de l'IL-27. Dans ces tumeurs, les voies de signalisation induites par l'IL-27 doivent être rigoureusement différentes que celles décrites précédemment et des études complémentaires sont nécessaires. D'ores et déjà l'IL-27 est connue pour activer STAT1 plus que STAT3 [656][657]. L'IL-27 pourrait ainsi se révéler un nouvel adjuvant cytokinique des sarcomes d'Ewing.

Effets sur la prolifération	Chondrosarcomes et Ostéosarcomes	Sarcomes d'Ewing
OSM	--	++
LIF	0	+
CT-1	0	+
IL-6 + sIL-6R	-	0/+
IL-27	-	-

Tableau 5: Effets de cytokines de type IL-6 sur la prolifération des lignées de TOP in-vitro

Récapitulatif des tests vialight réalisés dans les articles 1 et 2 (+ : induction de prolifération ; - : inhibition de prolifération).

III. Facteurs dictant l'effet pro ou anti-prolifératif de l'OSM

La dualité de l'OSM sur le développement tumoral se situe à plusieurs niveaux:

- L'effet dual de l'OSM au sein d'un même type tumoral définit l'association d'un effet antiprolifératif direct avec un effet protumoral indirect via la dissémination métastatique, l'angiogenèse ou l'ostéolyse.
- L'effet dual de l'OSM entre différentes tumeurs caractérise la capacité de cette cytokine à inhiber ou stimuler la prolifération cellulaire en fonction du type cellulaire.
 - o L'OSM est capable d'inhiber la prolifération de :
 - Mélanomes [557][459]
 - Ostéosarcomes [400][562]
 - Chondrosarcomes [658]
 - Cancers du sein [563]
 - Adénocarcinomes pulmonaires [474][567]
 - Hépatocarcinomes [568]
 - Gliomes [569]
 - o L'OSM stimule la prolifération de :
 - Myélomes [348] [571]
 - Sarcomes de Kaposi [572]
 - Cancers de la prostate [659]
 - Sarcomes d'Ewing

Face aux résultats mettant en évidence des effets inverses de l'OSM sur le développement des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing, le second objectif était de comprendre les facteurs permettant de dicter l'effet pro ou antitumoral de l'OSM au sein des tumeurs osseuses primitives. Cette question apparaît en effet primordiale puisque si l'effet dual de l'OSM a été décrit dans de nombreuses tumeurs solides, les mécanismes impliqués ne sont à ce jour pas compris. L'étude des tumeurs osseuses qui sont proches et ont une origine cellulaire commune (la MSC) pourrait ainsi être un modèle applicable ensuite aux autres types de tumeurs.

La méthode a consisté à comparer les différences basales ou lors de la stimulation par l'OSM entre les OS+CS et les ES pouvant influencer la réponse pro ou antiproliférative. Plusieurs facteurs ont pu être mis en évidence par cette technique mais la manipulation de ces facteurs ne nous a pas permis de modéliser complètement l'effet dual de l'OSM sur la prolifération.

Les récepteurs

Les sarcomes d'Ewing expriment des taux plus importants de LIFR et plus faibles d'OSMR par rapport aux OS et CS, et ceci est en partie dû à une faible expression du LIF. Nos expériences par SiRNA montrent que seul le récepteur de type II est impliqué dans l'effet antiprolifératif de l'OSM, alors que l'induction de prolifération dans les ES nécessite une co-signalisation par les deux types de récepteurs.

L'importance de l'OSMR dans l'effet antiprolifératif de l'OSM a notamment déjà été démontré :

- dans les mélanomes, où les lésions plus avancées peuvent perdre leur sensibilité par perte du récepteur OSMR [559]
- Dans les cancers du sein, où seul l'OSMR est impliqué dans l'effet cytostatique de l'OSM [660]

En revanche, dans les sarcomes d'Ewing, ce même récepteur OSMR est cette fois impliqué dans l'effet pro-prolifératif de l'OSM, en association avec une signalisation par le LIFR. L'importance de l'OSMR avait déjà été mise en évidence dans l'effet proprolifératif de l'OSM sur les carcinomes prostatiques [659].

Le LIF ne signalisant que par le LIFR, cette chaîne réceptrice peut également être à la fois impliquée dans des effets proprolifératifs ou antiprolifératifs [661].

De plus, l'expression de formes solubles de ces récepteurs peut interagir avec le schéma classique de fixation de l'OSM sur ses récepteurs membranaires. Dans les adénocarcinomes pulmonaires, l'expression du récepteur leurre (OSMRs) réduit la sensibilité des cellules à l'effet antiprolifératif de l'OSM [535]. De même, il existe un récepteur LIFR soluble naturel pouvant inhiber la signalisation du LIF, notamment au cours de la grossesse [662]. Cette forme de LIFR pourrait donc également être impliquée dans les effets de l'OSM et du LIF dans un contexte tumoral [663][664].

En conclusion, le LIFR et l'OSMR peuvent être tous les deux impliqués dans des effets pro ou antiprolifératifs (on ne peut pas attribuer un type de réponse à un type de récepteur) mais il semble que ce soit le ratio de ces deux récepteurs qui dicte l'effet de l'OSM sur la prolifération. Un ratio LIFR/OSMR faible dicterait un effet antitumoral alors qu'un ratio LIFR/OSMR élevé dicterait un effet protumoral. Toutefois ce ratio de récepteur n'est pas le seul facteur impliqué dans l'effet dual de l'OSM au sein des tumeurs osseuses primitives et d'autres différences intrinsèques aux cellules doivent rentrer en jeu.

Les voies de signalisation

JAK1 est surexprimé dans les sarcomes d'Ewing et est indispensable à l'effet proprolifératif de l'OSM dans ces tumeurs. A l'inverse, dans les ostéosarcomes et chondrosarcomes, JAK1 (même s'il est plus faiblement exprimé), est indispensable à l'effet antiprolifératif de l'OSM. Tout comme les récepteurs, la même kinase JAK1 est impliquée dans des effets pro ou antitumoraux, peut-être en fonction de son taux d'expression.

STAT3 est activé de manière plus importante dans les sarcomes d'Ewing par l'OSM, mais est impliqué dans la signalisation des ES tout comme des OS et CS.

Le rôle dual de STAT3 a précédemment été décrit dans de nombreux types tumoraux : ce facteur de transcription participe à l'inhibition de la prolifération dans le cancer du sein [396] ou à l'induction de prolifération dans le cancer de l'ovaire [401].

L'effet pro ou antitumoral pourrait ainsi être dicté par le taux d'activation de STAT3. Une autre hypothèse serait qu'en fonction du contexte cellulaire au sein des ES, CS ou OS, STAT3 n'interagirait pas avec les mêmes facteurs de transcription, et ce sont ces interactions différentes qui dicteraient l'effet pro ou antiprolifératif de l'OSM.

Le taux basal et l'activation d'Akt sont plus faibles dans les sarcomes d'Ewing, mais cette kinase ne semble pas impliquée dans les effets pro ou anti-prolifératifs de l'OSM.

Les gènes cibles impliqués dans la régulation de la prolifération sont différents selon les types cellulaires. La stimulation de prolifération par l'OSM est caractérisée par l'induction de C-MYC mais pas de C/EBPbeta dans les sarcomes d'Ewing. Dans les OS et CS, l'inhibition de prolifération est associée à une induction transitoire de C-MYC et une induction prolongée de C/EBPbeta (Figure 52). Ces gènes sont connus pour pouvoir être régulés par STAT3 : C-MYC étant impliqué dans la transformation tumorale [630] et les C/EBP dans la différenciation ou l'inhibition de prolifération [397] par l'OSM.

Le statut de différenciation

Etude transcriptomique

L'étude de l'expression d'un grand nombre de facteurs de transcription et marqueurs de la différenciation mésenchymateuse ou marqueurs de souche permet de classer les lignées de tumeurs osseuses en 2 groupes :

- D'un côté les OS et les CS sont caractérisés par un statut bien différencié (ils expriment de manière importante *COLLI*, *CBFA1*, *SOX9*, *PPAR γ* et *CEBPdelta*).
- De l'autre les ES apparaissent très peu différenciés (ils expriment *ALP*, *ID2*, *SOX2*, *NANOG* et *C-MYC*)

In-vitro, les chondrosarcomes et ostéosarcomes apparaissent très proches (aucun de ces marqueurs ne permet de les distinguer) alors que les sarcomes d'Ewing sont clairement à part.

Cette étude est basée sur 3 types de tumeurs osseuses primitives, qui sont proches du point de vue de la pathologie et des signes cliniques, mais qui sont en réalité très éloignés d'après les études transcriptomiques. Le contexte cellulaire des sarcomes d'Ewing est en fait très différent de celui des chondrosarcomes et ostéosarcomes et finalement difficilement comparable. L'effet prolifératif de l'OSM dans ces tumeurs est probablement dû à un ensemble de facteurs.

Effets de l'OSM en fonction du statut de différenciation mésenchymateux

L'OSM inhibe la prolifération des OS et CS, qui sont des tumeurs dérivant du mésoderme, directement issues des MSC [139] et différenciées respectivement dans la voie ostéoblastique et chondrocytaire. L'OSM inhibe également la prolifération des ostéoblastes et des chondrocytes.

De l'autre côté, l'OSM stimule la prolifération des ES, qui sont des tumeurs qui semblent également issues des MSC mais dont EWS-FLI inhibe la différenciation mésenchymateuse au détriment d'une différenciation neuronale. L'OSM stimule également la prolifération des MSC.

L'OSM serait donc antiprolifératif sur des cellules bien engagées dans les voies de différenciation mésenchymateuse, mais prolifératif sur des cellules présentant un statut souche et/ou neuronal.

Lien entre niveau de différenciation et expression des récepteurs à l'OSM

L'étude transcriptomique par puce à ADN dans un grand nombre de biopsies de tumeurs semble établir une corrélation entre le ratio LIFR/OSMR et l'origine des tumeurs :

- Différentes tumeurs d'origine neuroectodermique (gliomes, médulloblastomes, neuroblastomes) présentent un ratio LIFR/OSMR proche des sarcomes d'Ewing
- Des tumeurs d'origine mésenchymateuse (liposarcomes et autres sarcomes) ont un ratio LIFR/OSMR plus proche des ostéosarcomes.

- Certaines tumeurs d'origine épithéliale (carcinome pulmonaire et rénal) présentent un ratio LIFR/OSMR également proche des ostéosarcomes.

Les résultats obtenus sur les tumeurs osseuses primitives pourraient ainsi être transposables à d'autres tumeurs, permettant d'établir des mécanismes plus généraux d'action de l'OSM.

OSM et cellules souches cancéreuses

Si l'OSM présente un effet pro ou antiprolifératif en fonction du statut de différenciation, un troisième type d'effet dual de l'OSM pourrait être décrit lié à l'existence de cellules souches cancéreuses. Au sein d'une tumeur différenciée, l'OSM aurait un effet antitumoral majoritaire, mais un effet protumoral sur les cellules souches cancéreuses représentant une très faible proportion de la tumeur. Le traitement favoriserait la sélection de ces CSC et donc les récurrences tumorales.

EWS-FLI1

D'après nos études, EWS-FLI n'est pas directement à l'origine de l'effet proprolifératif de l'OSM dans les sarcomes d'Ewing. En revanche, la protéine de fusion pourrait être impliquée indirectement en maintenant un statut peu différencié, en inhibant l'expression de LIF endogène et en augmentant le ratio LIFR/OSMR.

- EWS-FLI1 régule l'expression de différents gènes de différenciation mésenchymateuse et neuronale par des mécanismes directs (par exemple sur *RUNX2*) ou indirects (par des mécanismes épigénétiques notamment via *EZH2*) [237][227][146].
- EWS-FLI1 régule indirectement le LIF et le LIFR, vraisemblablement en inhibant la différenciation mésenchymateuse et l'expression/activation de facteurs de transcription tels que NFκB.
- EWS-FLI1 inhibe l'expression de l'OSMR en se fixant sur le promoteur de ce gène.

Perspectives d'étude

* Mettre en évidence d'autres facteurs impliqués dans la réponse à l'OSM.

- Les régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT n'ont pas été étudiés mais ils pourraient être différenciellement exprimés entre les ES et les OS+CS. En effet, dans les mélanomes, les lésions avancées peuvent perdre leur sensibilité à l'OSM par surexpression des SOCS [560]. Il serait intéressant d'étudier dans nos lignées de tumeurs osseuses primitives l'expression de CIS-1, SOCS-1, SOCS-3, SHP-2, PIAS-1 et PIAS-3.
- Rechercher les formes solubles des récepteurs

* Créer des modèles in-vitro artificiels permettant de moduler ces facteurs.

- Développer d'autres modèles de régulation de EWS-FLI1, notamment dans d'autres lignées que A673.
- Améliorer les modèles de régulation des récepteurs. L'inhibition stable pourrait être réalisée par un ShRNA, et la surexpression efficace par transfection lentivirale.
- Créer des modèles permettant de réguler plusieurs facteurs simultanément.

* Tester l'hypothèse de la différenciation et du ratio LIFR/OSMR en étudiant l'effet de l'OSM et l'expression du LIFR et de l'OSMR sur d'autres lignées tumorales de différentes origines (origine mésodermique, neuroectodermique, épithéliale), sur des cellules souches embryonnaires ou sur des cellules souches cancéreuses.

* Tester l'OSM dans des modèles de souris KO OSMR, LIFR, OSM ou LIF développant un OS, CS ou ES. Au laboratoire nous disposons de souris OSM^{-/-} et de souris OSMR^{-/-} sur un fond génétique C57BL/6J. Ces souris n'étant pas immunodéficientes, seuls des modèles syngéniques pourront être envisagés. L'unique modèle syngénique de tumeur osseuse primitive en C57BL/6J disponible au laboratoire est réalisé par injection de cellules d'ostéosarcome murin MOSJ en paratibial. Le modèle syngénique de sarcome d'ewing par injection de MSC surexprimant EWS-FLI1 est en cours de développement et nous ne disposons pas de lignée murine de chondrosarcome. Rappelons également que chez la souris, l'OSM ne peut se fixer que sur l'OSMR (mais pas sur le LIFR). Divers protocoles pourraient être envisagés en fonction de la question posée mais dans tous les cas, seules les cellules hôtes seront déficientes en OSM et/ou OSMR, mais les cellules tumorales ne seront pas modifiées. Une première expérience pourrait par exemple consister à injecter les cellules tumorales chez des souris OSM^{-/-} ou des souris normales puis de comparer le développement tumoral entre les groupes. Ceci permettrait d'étudier l'impact de l'OSM produite par les cellules infiltrant la tumeur sur le développement tumoral.

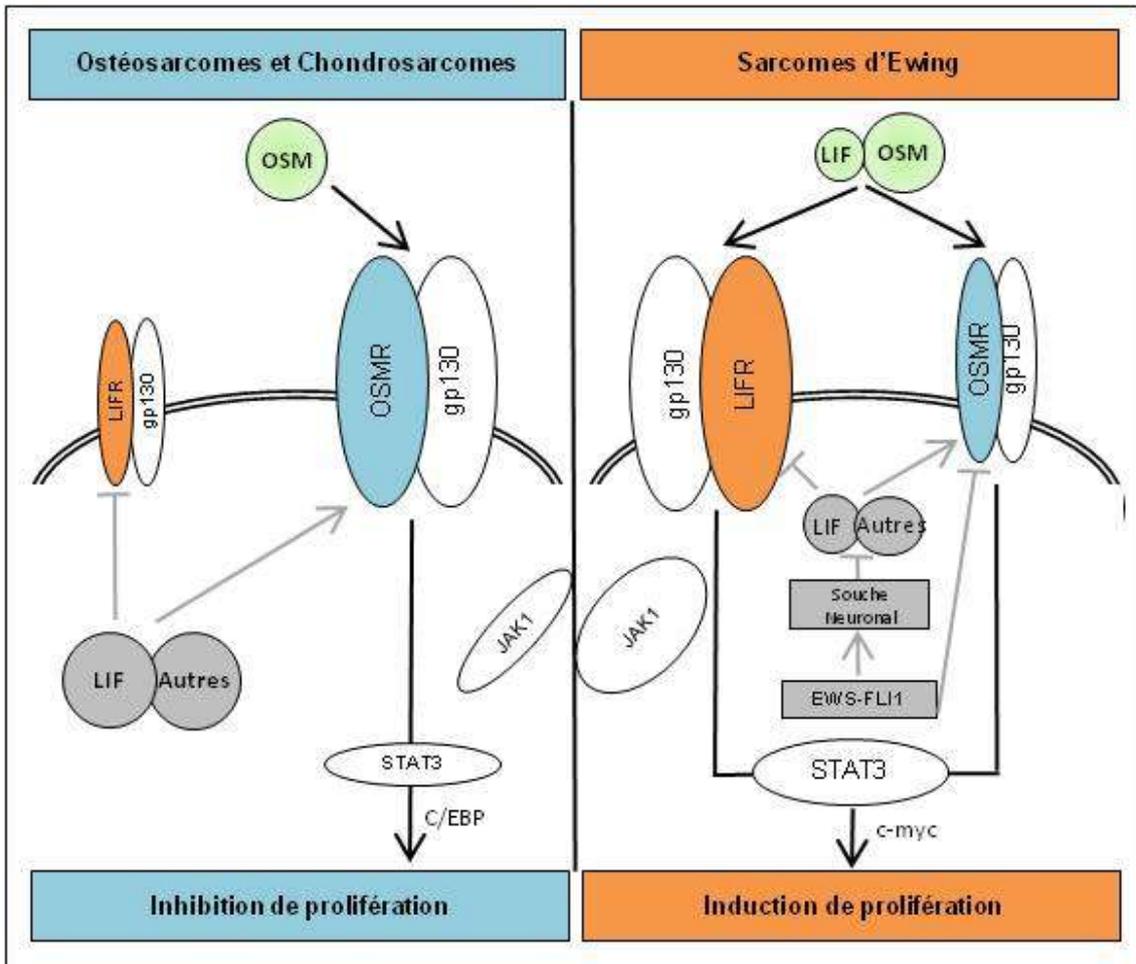


Figure 52: Mécanismes d'action proposés de l'OSM dans les tumeurs osseuses primitives
 Schéma récapitulatif des différences observées entre les CS, OS et CS et implication de ces facteurs dans l'effet de l'OSM sur la prolifération

ANNEXES

Annexe 1 : La niche osseuse des
chondrosarcomes

The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets.

David E, Blanchard F, Heymann MF, De Pinieux G, Gouin F, Rédini F, Heymann D. Sarcoma.

2011;2011:932451. Epub 2011 May 22.

La niche osseuse des chondrosarcomes : un sanctuaire permettant la résistance aux chimiothérapies, favorisant la croissance tumorale et proposant de nouvelles cibles thérapeutiques

Résumé

Les chondrosarcomes sont des tumeurs malignes formatrices de cartilage représentant 20% des tumeurs osseuses primitives malignes et touchent principalement l'adulte entre 30 et 60 ans. Malheureusement, les mécanismes moléculaires contrôlant la genèse et la croissance des cellules de chondrosarcome ne sont à ce jour pas bien définis. Il est communément admis que l'invasion du tissu osseux par les cellules tumorales modifie la balance entre formation et résorption osseuse et induit un environnement de type inflammatoire. Un dialogue est ainsi établi entre les cellules tumorales et leur environnement. L'environnement des tumeurs osseuses est décrit comme un sanctuaire qui contribue à la résistance aux chimiothérapies et contrôle au moins en partie la croissance tumorale. Le concept de « niche » a récemment émergé, et est défini comme un microenvironnement spécialisé favorisant l'émergence de cellules souches tumorales et fournissant aux cellules tumorales tous les facteurs nécessaires à leur développement. Cette revue a pour but de rassembler les principaux arguments en faveur de l'implication d'une niche osseuse spécifique dans le développement des chondrosarcomes.

Annexe 2 : Généralités sur les thérapies
anti-tumorales

I. Différentes approches thérapeutiques

La mortalité par cancer ne cesse d'augmenter du fait du vieillissement de la population et représente 250 000 nouveaux cas par an en France. Les cancers représentent la seconde cause de décès après les maladies cardiovasculaires avec 150 000 décès par an.

Chirurgie

La chirurgie est le traitement le plus ancien pour la plupart des tumeurs solides. L'exérèse de la tumeur est réalisée dans un premier temps pour retirer l'intégralité de la masse tumorale ainsi qu'une marge de tissu sain autour de la tumeur. La chirurgie de réhabilitation ou réparatrice peut être pratiquée dans un second temps ou au cours de la même intervention chirurgicale afin de conserver l'esthétique ou la fonction de l'organe.

Dans le cas des tumeurs osseuses, l'objectif est de pratiquer l'ablation de la tumeur tout en conservant la fonction de l'os touché. La chirurgie de reconstruction consiste principalement en des endoprothèses (prothèses métalliques) ou des allogreffes (par exemple greffe autologue du péroné pour remplacer l'humérus).

Radiothérapie

La radiothérapie externe consiste à irradier la zone tumorale par des photons X ou des électrons pour entraîner des lésions importantes de l'ADN puis l'apoptose des cellules. La radiothérapie exclusive n'est pas pratiquée dans le cadre des tumeurs osseuses, mais elle peut être associée à la chimiothérapie.

Chimiothérapie

L'agent de chimiothérapie idéal est un produit fortement **cytotoxique** présentant une grande **sélectivité** pour les cellules tumorales (afin de limiter les effets secondaires liés à l'apoptose des cellules saines). Puisqu'il n'existe pas une molécule parfaite, la polychimiothérapie consiste à associer plusieurs agents de chimiothérapie ayant des mécanismes d'action différents afin d'augmenter le potentiel cytotoxique (possibilité de synergie) et de diminuer les effets secondaires (en utilisant des doses plus faibles de chaque molécule).

Les 2 objectifs de la chimiothérapie, en association à la chirurgie, sont :

- la réduction de la masse tumorale pour faciliter la résection tumorale et la conservation du membre et diminuer le risque de récurrence locale

- l'éradication des micrométastases pour limiter le risque de récurrence à distance. La chimiothérapie a pour but de prévenir l'apparition de métastases dans les formes localisées ou de les stériliser dans les formes métastatiques.

En fonction du but et du moment de la chimiothérapie, on compte 4 types de traitements :

- la chimiothérapie curative, en cas de chimiothérapie exclusive
- la chimiothérapie néoadjuvante, réalisée avant la phase locale (chirurgie ou radiothérapie) pour diminuer le volume tumoral et empêcher la dissémination métastatique
- la chimiothérapie adjuvante, après la phase locale pour éliminer les cellules tumorales restantes
- la chimiothérapie palliative, pour diminuer les douleurs liées à la masse tumorale sans toutefois pouvoir l'éradiquer en cas de cancer avancé.

Les agents de chimiothérapie ont des index thérapeutiques très faibles avec peu de marge entre la dose efficace et la dose toxique. Afin d'éradiquer le plus grand nombre de cellules tumorales, les doses utilisées sont importantes et engendrent de nombreux effets indésirables qui dégradent la vie du patient. Ces agents sont généralement administrés sur un mode séquentiel.

La toxicité aiguë apparaît de quelques heures à quelques jours après l'administration et dure de quelques heures à quelques semaines. Les effets indésirables sont généralement réversibles :

- La toxicité hématopoïétique est liée à la destruction des cellules souches hématopoïétiques en voie de différenciation et peut entraîner leucopénie, thrombopénie, anémie, lymphopénie.
- La toxicité gastrointestinale se traduit par des nausées, vomissements, mucites, troubles du transit.
- La neurotoxicité peut être périphérique (troubles de la sensibilité) ou centrale (crise d'épilepsie)
- La toxicité rénale
- La toxicité vésicale
- La toxicité dermatologique (alopécie)

La toxicité chronique peut se produire à plus long terme après plusieurs cures de chimiothérapie et est incomplètement réversible.

II. Agents de chimiothérapie

La classification des agents de chimiothérapie est basée sur leur mécanisme d'action (Tableau 6) :

- proapoptotique (cytotoxique) ou antiprolifératif (cytostatique)
- cycle dépendant (les alkylants sont actifs sur plusieurs phases du cycle cellulaire) ou phase dépendant (les poisons du fuseau et les antimétabolites ne sont actifs que sur une seule phase du cycle)
- interaction directe (alkylants, intercalants, scindants) ou indirecte (inhibiteurs de topoisomérases, antimétabolites, poisons du fuseau) avec l'ADN

1. Agents alkylants

Les alkylants sont des agents électrophiles permettant le remplacement d'un proton de l'ADN par un radical alkyl. Cette modification peut engendrer des modifications chimiques des bases, des défauts de liaisons entre les bases ou des liaisons inter/intrabrin. Si la désorganisation de l'ADN est trop importante, elle aboutira à l'apoptose des cellules. La résistance à ce type d'agent réside dans une accélération des processus de détoxification dans les cellules tumorales.

Le Cyclophosphamide et l'Ifosfamide sont deux molécules présentant des structures chimiques très proches. Leurs effets indésirables sont :

- la toxicité hématologique entraînant de fortes aplasies médullaires
- la toxicité neurologique centrale induisant la sécrétion d'hormones antidiurétiques
- la toxicité vésicale qui se traduit par des cystites hémorragiques. Celle-ci impose l'administration conjointe de MESNA, un uroprotecteur qui inactive l'acroléine, le métabolite irritant pour la muqueuse vésicale formé au cours du métabolisme des oxazophosphorines.
- A long terme, les fortes doses d'Ifosfamide peuvent entraîner une infertilité

Le Cisplatine est un complexe organométallique dont les effets secondaires sont :

- le fort pouvoir émétisant
- la toxicité rénale qui impose l'administration d'une hyperhydratation saline
- la toxicité neuropériphérique
- la toxicité cochléaire

2. Agents intercalents

Les agents intercalents ont des structures chimiques composées de plusieurs noyaux aromatiques condensés capables de s'insérer et de provoquer des distorsions de l'ADN. Cette modification conformationnelle empêche la progression des ARN et ADN polymérase, et inhibe de ce fait la réplication et la transcription de l'ADN. Ces agents exercent également leur action en générant des radicaux libres ou encore en se liant aux ADN topoisomérases II et entraînant des cassures mono et bicaténares.

La Doxorubicine (ou Adriamycine) a pour principal effet secondaire la cardiotoxicité, qui peut être atténuée en utilisant des formes liposomales (pour diminuer la captation par les tissus sains) et en associant le traitement avec un cardioprotecteur.

L'Actinomycine D a été isolée de *Streptomyces parvullus* en 1940.

3. Agents scindants

Les agents scindants se comportent comme des endonucléases et réalisent de multiples cassures de l'ADN. La Bléomycine est la principale molécule de cette catégorie. Les effets secondaires sont une toxicité pulmonaire (car les poumons n'expriment pas l'hydrolase capable d'inactiver la molécule) et un épaissement cutané.

4. Antimétabolites

Les antimétabolites sont des analogues structurels des acides nucléiques dont le ribose a été modifié ; ils sont alors inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques. Ces molécules n'agissent pas directement sur l'ADN des cellules mais indirectement en amont. La résistance aux antimétabolites est engendrée par les cellules tumorales en altérant l'enzyme cible ou les enzymes activatrices de la molécule.

Le Méthotrexate est un inhibiteur d'une enzyme clé, la dihydrofolate réductase, intervenant dans la biosynthèse de l'acide folique en acide folinique, cofacteur dans la synthèse des acides nucléiques. C'est également un inhibiteur de la thymidilate synthétase. Les principaux effets indésirables sont la toxicité rénale, hépatique, cutanée et neurologique. En cas de surdosage ou afin de limiter ces effets secondaires, une technique de « rescue » consiste à administrer de l'acide folinique.

Le Pemetrexed est également un analogue de l'acide folique.

5. Inhibiteurs de topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes assurant l'enroulement ou le déenroulement de l'ADN en créant des coupures transitoires de l'un (type I) ou des deux (types II) brins de l'ADN puis des ligations. Ce phénomène permet une relaxation des forces de tension générées au moment de la réplication.

Les inhibiteurs de topoisomérases stabilisent le complexe de clivage, empêchant l'étape de ligation et provoquant une coupure définitive des brins d'ADN puis l'apoptose des cellules.

L'Etoposide (VP-16), outre son action sur les topoisomérases, inhibe la kinase p34 'cdc 2' de façon irréversible bloquant la cellule en phase G2 et se lie à la tubuline pour inhiber la formation des microtubules. Les effets secondaires sont l'alopécie partielle, les nausées, les vomissements, les diarrhées, la perte de poids, la neutropénie et la thrombocytopenie. A long terme son utilisation peut induire des leucémies aigües myéloïdes secondaires chez les enfants.

6. Poisons du fuseau

Les poisons du fuseau sont des antimitotiques empêchant la formation du fuseau mitotique et le maintien du cytosquelette. Ces agents entraînent une neurotoxicité qui se traduit par des troubles de la sensibilité, une constipation et un risque d'épilepsie.

La vincristine est un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) qui bloque la division cellulaire au stade de la métaphase. La toxicité hématologique et gastro-intestinale apparaît fréquemment.

7. Antiangiogéniques

Dans les tumeurs, l'expression des facteurs proangiogéniques (notamment le VEGF) est souvent plus importante qu'au sein d'un tissu normal [665].

L'inhibition de l'angiogenèse représente une nouvelle thérapie adjuvante aux agents de chimiothérapie classiques. La molécule la plus utilisée est l'anticorps monoclonal chimérique ciblant le VEGF : Bévacizumab AVASTIN.

Alkylants	Intercalents	Scindants	Antimétabolites	Inh topoisomérases	Poison du fuseau
<u>Moutarde azoté</u> Chlorométhine Melphalan Chlorambucil Oxazaphorines Cyclophosphamide (ENDOXAN) Ifosfamide (HOLOXAN) Ethylène iminés Thiotépa Altretamine Sulfonoxalcanes Busulfan Triazènes Dacarbazine Procarbazine Nitrosouree Carmustine Lomustine Fotemustine Streptozocine Mitomycine C Organoplatines Cisplatine (CISPLATINE) Carboplatine Oxaliplatine	Anthracyclines Doxorubicine = Adriamycine (ADRIBLASTINE) Daunorubine Epirubicine Idarubicine Pirarubicine Les tricycliques Actinomycine D (COSMEGEN) Amsacrine La mitoxantrone Le bisantrene	Bleomycine	<u>Antifolique</u> Méthotrexate (MEHOTREXATE) Raltitrexed Pemetrexed (ALIMTA) Antipurine 6-Mercaptopurine Thioguanine Pentostatine Cladribine Fludarabine Antipyrimidine Cytarabine 5-Fluorouracile Gemcitabine Capecitabine Inhibiteur de la ribonucléase réductase Hydroxycarbamide	<u>Inhibiteur des topoisomérases de type I</u> Camptothécine Irinotecan Topotecan <u>Inhibiteur des topoisomérases de type II</u> Etoposide (VEPESIDE) Teniposide	<u>Vinca-alkaloides</u> Vinblastine Vincristine (ONCOVIN) Vindésine Vinorelbine Vinflunine <u>Taxanes</u> Paclitaxel Docétaxel

Tableau 6: Principaux agents de chimiothérapie conventionnelle

Annexe 3 : Spécificités de la thérapie des
tumeurs en site osseux

I. Inhibition de la résorption osseuse

A. Traitements de l'ostéoporose

Dans le cadre de l'ostéoporose, pathologie fréquente chez les femmes après la ménopause entraînant une diminution de la masse osseuse et une altération de la microarchitecture de l'os, les traitements actuels visent à réduire l'hyper-résorption osseuse afin de prévenir le risque accru de fracture chez ces patients. Divers types de molécules peuvent être utilisés.

Les bisphosphonates constituent la classe d'agents anti-résorption la plus efficace et la plus utilisée et représentent le traitement de référence pour la prévention des fractures chez la femme ostéoporotique [666]. Ce sont des analogues synthétiques du pyrophosphate endogène (PPi) ayant la capacité de se fixer aux ions divalents tels que le Ca^{2+} . Après administration, les bisphosphonates se fixent spécifiquement à la surface osseuse et majoritairement aux sites de résorption ostéoclastique [667]. Les trois molécules de référence sont le Zolédronate (ACLASTA 5mg IV 1 fois par an), le Risédrone (ACTONEL 5mg per os 1 fois par jour) et l'Alendronate (FOSAMAX 70mg per os 1 fois par semaine). Le Zolédronate est un bisphosphonate de 3^{ème} génération (contenant un atome d'azote) capable d'inhiber l'activité des ostéoclastes en ciblant une enzyme clé de la voie du mévalonate : la farnésyl diphosphate synthase (FPPs). L'inhibition de cette enzyme prévient la synthèse de farnésyl diphosphate et de geranylgeranyl diphosphate nécessaires à la prénylation de petites GTPases [668] régulant différents mécanismes cellulaires importants pour la fonction ostéoclastique [669]. L'inhibition de la FPPs induit également l'accumulation du substrat de cette enzyme, l'isopentenyl diphosphate (IPP), qui, en se conjuguant à l'AMP forme un nouvel analogue de l'ATP (Apppl). Ce métabolite inhibe l'adénine nucléotide translocase et induit l'apoptose des ostéoclastes [670].

Le Raloxifène (EVISTA 60 mg per os 1 fois par jour) appartient à la classe des SERMs (modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes) et permet d'augmenter la densité osseuse. Contrairement au traitement hormonal de substitution (THS) de la ménopause utilisant les œstrogènes qui prévient la perte osseuse mais pourrait augmenter le risque de cancer du sein et de l'endomètre, le Raloxifène présente des effets agonistes aux œstrogènes sur le squelette et une activité antagoniste sur le sein et l'endomètre [671].

Le Ranélate de Strontium (PROTELOS 2g par os 1 fois par jour) est un traitement de l'ostéoporose post-ménopausique permettant de diminuer la résorption osseuse et d'induire la formation osseuse en agissant à la fois sur les ostéoblastes et les ostéoclastes et en modulant les taux d'OPG et RANKL [672]. Ce médicament est commercialisé depuis 2005, mais du fait de ses effets indésirables, il ne pourra plus être prescrit qu'en cas de risque de fracture important et d'intolérance ou d'allergie aux bisphosphonates.

Le Teriparatide (FORSTEO 20µg SC 1 fois par jour) est de la parathormone (PTH) recombinante pouvant être prescrite dans les formes sévères d'ostéoporose avec plusieurs fractures vertébrales. La PTH est une hormone endogène régulatrice du métabolisme phosphocalcique au niveau osseux et rénal en stimulant la formation osseuse par les ostéoblastes et en augmentant la réabsorption tubulaire du calcium.

Le Denosumab (PROLIA 60mg SC 2 fois par an) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant RANKL ayant obtenu l'AMM en 2010 pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique chez les femmes à risque élevé de fractures. Le Denosumab inhibe l'activation des ostéoclastes par RANKL et évite ainsi la perte osseuse. Contrairement aux bisphosphonates qui s'accumulent dans l'os, à l'arrêt du Denosumab la résorption osseuse devient à nouveau fonctionnelle.

B. Application aux tumeurs osseuses primitives

Les phénomènes d'ostéolyse décrits dans des pathologies d'origine tumorale participant à l'initiation et au développement de ces tumeurs osseuses, les stratégies développées dans le cadre du traitement de l'ostéoporose pourraient s'avérer efficaces dans le traitement des tumeurs osseuses. Plusieurs investigations sont actuellement menées chez des patients atteints de myélome multiple, de métastases osseuses ou de tumeurs osseuses primitives.

Le Zolédronate

L'utilisation des bisphosphonates est à l'heure actuelle une des approches les plus utilisées dans le traitement palliatif des métastases osseuses mais est également envisagé dans le traitement des tumeurs osseuses primitives telles que l'ostéosarcome. Le Zolédronate (ZOMETA IV 4mg 1 fois par mois) apparaît comme le bisphosphonate le plus efficace en oncologie. Il a obtenu son AMM en 2003 dans la prévention des complications osseuses (fracture pathologique, compression médullaire, irradiation ou chirurgie osseuse, hypercalcémie induite par des tumeurs) chez des patients atteints de pathologies malignes à un stade avancé avec atteinte osseuse ainsi que pour le traitement de l'hypercalcémie induite par des tumeurs (TIH).

En plus d'être un puissant inhibiteur de la résorption osseuse, le Zolédronate possède plusieurs propriétés antitumorales qui pourraient contribuer à son efficacité globale dans le traitement de la maladie métastatique osseuse. Son activité sur les tumeurs osseuses pourrait être double :

- Un effet indirect sur les cellules tumorales. Le Zolédronate inhibe l'ostéoclastogénèse, ce qui, via le blocage du cercle vicieux, diminuerait la prolifération tumorale
- Un effet direct en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Ceci a pu être mis en évidence in-vitro mais in-vivo, cet effet antitumoral indépendant de la protection osseuse n'a pas pu être strictement mis en évidence à ce jour.

Pour ce qui concerne l'utilisation du Zometa comme adjuvant dans le traitement des tumeurs osseuses primitives, des études précliniques ont d'ores et déjà permis de montrer son efficacité et devront être confirmées dans les études cliniques.

Dans des modèles animaux d'ostéosarcome, l'injection d'acide zolédronique permet de diminuer l'ostéolyse para-tumorale, d'augmenter significativement le taux de survie des animaux traités et d'inhiber la dissémination métastatique en site pulmonaire [673]. La combinaison de ce bisphosphonate avec un agent de chimiothérapie tel que l'Ifosfamide a permis d'augmenter les effets thérapeutiques obtenus avec chacune des molécules seule en terme de rechute, de réparation tissulaire et d'ostéolyse para-tumorale [674]. Cette association de l'acide zolédronique à la chimiothérapie conventionnelle est actuellement testée dans un essai clinique de phase III chez l'Homme (protocole OS2006, Figure 53). Ce programme envisage l'inclusion de 470 patients sur une période de 6 ans avec un suivi de 3 ans après la dernière inclusion. Cet essai clinique est réalisé grâce à la collaboration de l'institut Gustave Roussy, du service d'orthopédie de Nantes ainsi que du laboratoire Inserm U957.

Dans des modèles animaux de sarcome d'Ewing en site osseux (injection intratibiale de lignées d'ES humaines chez la souris Nude), l'injection d'acide zolédronique inhibe significativement le développement tumoral et sa combinaison avec l'Ifosfamide prévient les rechutes [675].

Dans des modèles animaux de chondrosarcome (modèle syngénique chez le rat), l'injection d'acide zolédronique diminue le développement tumoral primaire, la récurrence des tumeurs après curetage et augmente la survie des animaux [629].

Le Denosumab

RANKL étant surexprimée dans diverses tumeurs se développant en site osseux, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'efficacité thérapeutique de l'inhibition de RANKL dans ces pathologies tumorales [250]. Des études précliniques ont déjà montré l'efficacité de l'OPG, de peptides mimétiques dérivés ou de RANK-Fc pour la prévention du développement de lésions ostéolytiques et du développement tumoral dans des modèles animaux de myélome multiple, d'adénocarcinome du côlon, de métastases osseuses du cancer du sein, de la prostate, du poumon et d'OS [676][677]

Au vue de ces résultats, le Denosumab a rapidement été envisagé dans le traitement des tumeurs osseuses et de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours (23 études de phase III avec le Denosumab dont 10 dans le domaine de la cancérologie). Les premiers résultats ont notamment montré l'efficacité du Denosumab chez des patients atteints de cancer de la prostate mais également de myélome multiple ou de métastases osseuses du cancer du sein [678]. Son efficacité n'a pour le moment pas été évaluée dans les TOP mais le Denosumab devrait pouvoir inhiber la résorption osseuse et la prolifération tumorale au même titre que l'OPG ou RANK-Fc.

Outre l'indication dans le traitement de l'ostéoporose, le Denosumab détient pour le moment l'AMM pour le traitement de la perte osseuse chez les patients souffrant d'un cancer de la prostate et

recevant une hormonothérapie ablative. En septembre 2011, La FDA a approuvé une nouvelle indication de Denosumab pour diminuer la perte osseuse chez les femmes à haut risqué de fracture recevant un traitement inhibiteur de l'aromatase dans le cancer du sein.

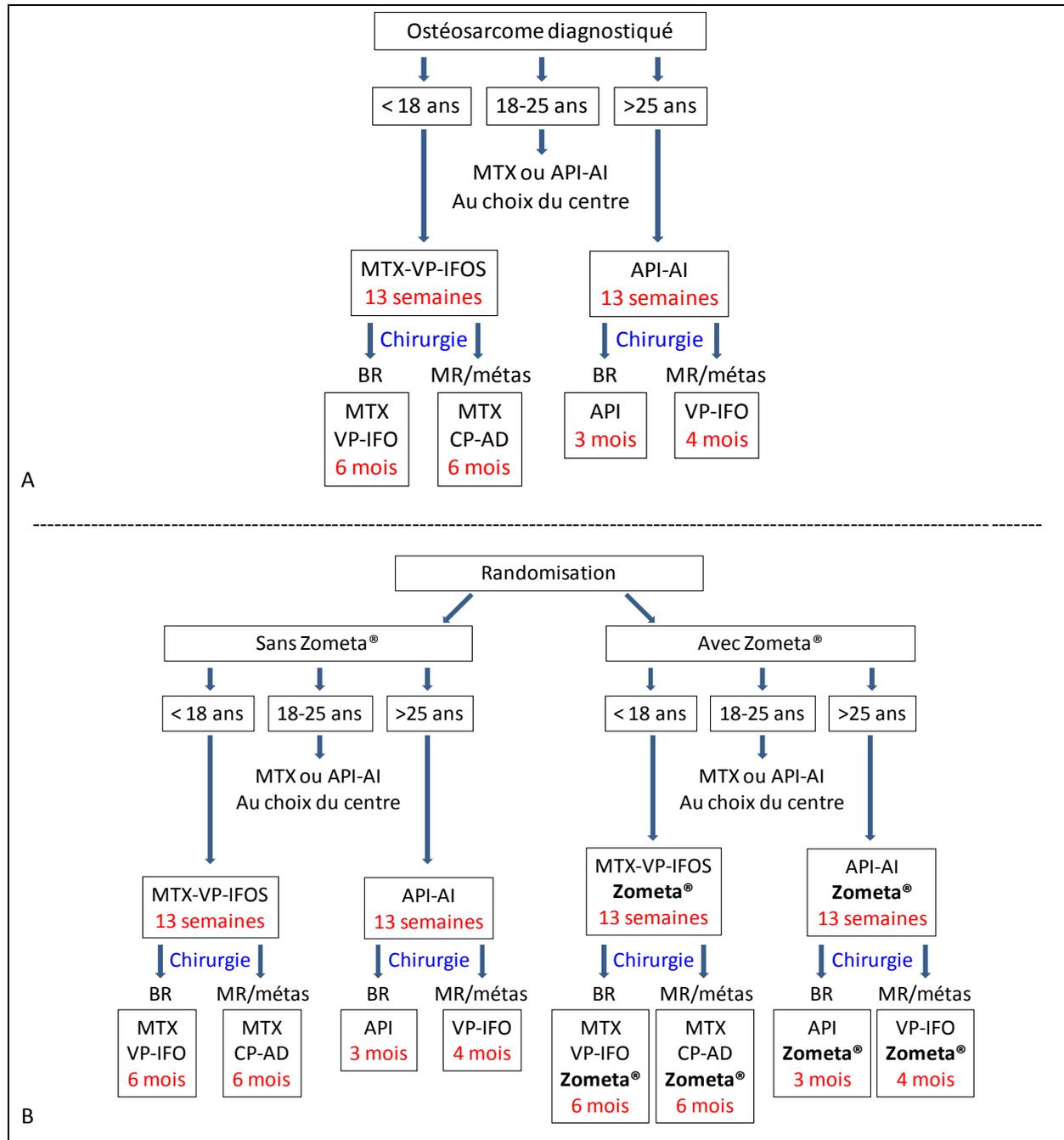


Figure 53: Protocoles de traitement des ostéosarcomes

A- Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome par la chimiothérapie en France. BR : bon répondeur (<10% de cellules tumorales résiduelles), MR : mauvais répondeur (>10% de cellules tumorales résiduelles ou patient non opérable ou métastatique), MTX : Méthotrexate, VP : VP-16, IFO : Ifosfamide, API ; Adriamycine + cis-platinum + Ifosfamide, AI : Adriamycine + Ifosfamide, CP-AD ; cis-platinum + Adriamycine. D'après le service d'oncopédiatrie du CHU Hôtel Dieu de Nantes.

B- Schéma de prise en charge des patients atteints d'ostéosarcome dans le protocole OS2006 associant traitement conventionnel et acide zolédronique (Zometa®). D'après la Réunion « Echantillons et recherche » du 25 Juin 2010 au CHU Hôtel Dieu, Nantes.

II. Ciblage pharmacologique en site osseux

A. Principe

Les tissus osseux et cartilagineux sont caractérisés par leur MEC bien spécifique : les tumeurs osseuses primitives pourraient ainsi être ciblées pharmacologiquement en utilisant les propriétés de cette matrice. L'approche par « drug delivery » consiste à associer un agent de chimiothérapie conventionnelle à une molécule particulièrement affine pour le tissu osseux dans le but d'augmenter la concentration de l'agent anticancéreux au niveau de l'os et donc de la tumeur en limitant les effets secondaires généraux liés à la fixation sur les autres tissus.

B. Ciblage du tissu osseux par les bisphosphonates

Qu'ils soient administrés oralement ou par voie intraveineuse, les bisphosphonates se retrouvent rapidement localisés à la surface de l'os de par l'importante affinité de leur structure P-C-P pour l'hydroxyapatite. De ce fait, la conjugaison d'agents thérapeutiques à des bisphosphonates pourrait être une approche intéressante pour cibler ces molécules sélectivement au niveau de l'os dans le traitement de l'ostéoporose, de l'arthrose et des tumeurs osseuses. La mise au point de ces composés passe par des modifications chimiques des deux composés à associer sans modifier leurs propriétés propres. Le bisphosphonate est généralement relié à l'agent thérapeutique par un « linker » et la lipophilicité est un facteur prédictif du caractère ostéotrope du dérivé. Différentes stratégies de conjugaison sont à l'étude : nanoparticules, pont disulfure clivable, liaison thioester non clivable... [679]. Une équipe a par exemple synthétisé des nanoparticules formées par un polymère biodégradable lié de manière covalente à l'Alendronate. Ce polymère contient une fonction acide carboxylique libre en position terminale sur laquelle différents agents thérapeutiques peuvent être ensuite fixés [680].

Même si la plupart de ces composés n'en sont qu'au stade préclinique, plusieurs radiopharmaceutiques couplés aux bisphosphonates sont testés dans des essais cliniques pour les thérapies palliatives des métastases osseuses. La conjugaison de radionucléides avec des bisphosphonates est également envisagée pour de l'imagerie [681]. De plus, des études ont montré la faisabilité de conjugaison des bisphosphonates avec des protéines [651] et ceci pourrait être applicable notamment à des cytokines ou des facteurs de croissance. Dans un modèle d'arthrose chez le rat l'administration d'OPG lié chimiquement à un bisphosphonate via un pont disulfure permet d'obtenir des concentrations 4 fois plus importantes du composé au niveau osseux par rapport à l'OPG seule [682].

C. Ciblage du tissu cartilagineux par les ammoniums quaternaires

Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies.

Peyrode C, Weber V, David E, Vidal A, Auzeloux P, Communal Y, Dauplat MM, Besse S, Gouin F, Heymann D, Chezal JM, Rédini F, Miot-Noirault E. Invest New Drugs. 2011 Apr 16.

Etudes in-vitro et in-vivo de la conjugaison du melphalan à un ammonium quaternaire dans la thérapie des chondrosarcomes

Résumé

Les tumeurs cartilagineuses représentent un challenge thérapeutique du fait de leur matrice extracellulaire chondrogénique qui entrave la distribution des agents de chimiothérapie, de leur faible nombre de cellules en division et de leur faible vascularisation. Dans ce contexte et en se basant sur la forte affinité des ammoniums quaternaires pour les protéoglycanes, nous avons développé une stratégie qui utilise la fonction ammonium quaternaire pour distribuer sélectivement un agent alkylant au niveau du tissu cartilagineux tumoral. Nous avons construit un dérivé du Melphalan couplé à un ammonium quaternaire (Mel-AQ) et évalué son activité anti-tumorale in-vitro et in-vivo. In-vitro des concentrations de l'ordre du micromolaire de Mel-AQ inhibent la prolifération des lignées humaines de chondrosarcome HEMC-SS et d'ostéosarcome SaOS2. De plus, un traitement de 24h avec 20 μM de Mel-AQ augmente d'un facteur 2,5 le nombre de cellules en phase S et d'un facteur 1,5 la population subG0G1 comparé au contrôle. In-vivo, le Mel-AQ a démontré une activité antitumorale dans le modèle orthotopique syngénique de chondrosarcome de Scharm chez le rat. L'administration de Mel-AQ chez ces rats (3 doses de 16 $\mu\text{mol/kg}$ à J8, J12 et J16 après l'implantation) induit un effet antitumoral optimal à J43 avec une inhibition de la croissance tumorale de 69%. Le protocole de traitement est très bien toléré par les animaux, qui n'ont présenté aucune perte de poids au cours de l'étude. Cet effet antitumoral a été mis en évidence in-vivo par imagerie scintigraphique utilisant le $(99\text{m})\text{Tc-NTP 15-5}$ développé au sein du laboratoire comme un radiotraceur ciblant les protéoglycanes et par coloration au bleu alcian du tissu tumoral en fin de protocole. Le traitement par Mel-AQ diminue significativement la quantité de protéoglycanes au sein du tissu tumoral. Ces résultats expérimentaux mettent l'accent sur les effets antitumoraux prometteurs du Mel-AQ comme une stratégie ciblant les protéoglycanes dans la prise en charge thérapeutique des chondrosarcomes.

**Annexe 4 : Historique de découverte de
l'OSM, du LIF et de l'IL-6**

1968-1985 : Diverses découvertes de l'IL-6.

- En 1968, la 1^{ère} notion d'IL-6 est associée à la découverte du rôle des lymphocytes B et T dans la production des anticorps [683][684]. Les lymphocytes B ne produisent des anticorps qu'en présence des lymphocytes T, ces derniers semblent donc produire des facteurs induisant la croissance et la différenciation des lymphocytes B.
- En 1980, une équipe isole l'IFN β 2, une cytokine capable de protéger des fibroblastes en culture contre une infection virale [685].
- En 1985, une seconde équipe isole le BSF-2 (B cell stimulin factor), une cytokine induisant la différenciation terminale des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'immunoglobulines [510].

1969-1988 : Diverses découvertes du LIF.

- En 1969, une équipe observe qu'un milieu embryonnaire conditionné est capable d'inhiber la prolifération et d'induire la différenciation macrophagique d'une lignée de cellules de leucémie myéloïde M1 [596].
- En 1977, le facteur D (differentiation factor) capable d'induire la différenciation des cellules M1 est purifié à partir de cellules embryonnaires [686].
- En 1984, un facteur qui inhibe la différenciation embryonnaire de cellules de carcinome embryonnaire est purifié à partir des cellules nourricières [687].
- En 1986, le facteur D est à nouveau purifié, mais à partir de cellules hépatiques et celui-ci stimule la résorption osseuse [584].
- En 1987, un facteur produit par les cellules hépatiques et inhibant la différenciation de carcinomes embryonnaires murins et des cellules souches embryonnaires est découvert [688].
- En 1988, HILDA est purifiée à partir de lymphocytes T stimulés. Cette cytokine est active sur les éosinophiles et les cellules de la moelle osseuse [689]. HILDA est un facteur de croissance pour les cellules de leucémie myéloïde DA (Hulan InterLeukine for DA cells).

1986 : Clonage de l'IL-6. L'analyse de la séquence d'ADNc de BSF-2 et de l'IFN β 2 [690][691] a montré que ces deux protéines étaient identiques. Cette molécule a ensuite été nommée IL-6. L'IL-6 a également été étudiée sous le nom de hybridoma/plasmacytoma growth factor et HSF (hepatocyte-stimulating factor). L'IL-6 induit les protéines de la phase aigue de l'inflammation CRP, β 2-fibrinogène... [692][693].

1986 : Isolation de l'OSM. Cette cytokine de 28kD est produite par une lignée monocyttaire issue d'un lymphome histiocytaire humain [557]. Le traitement de ces cellules par le PMA (un ester de phorbol) induit leur différenciation macrophagique et inhibe la prolifération tumorale d'une lignée de mélanome.

1987-1988 : Clonage du LIF. Le LIF murin est cloné et caractérisé par sa capacité d'inhibition de prolifération des cellules M1 [694]. Le LIF humain est en fait identique au facteur D et à HILDA, même si ces molécules présentent des activités biologiques inverses sur la prolifération [695][696]. Très rapidement des homologies structurales entre l'IL-6 et le LIF sont mises en évidence [697].

1988: Clonage de l'IL-6R. Le récepteur de l'IL-6 contient une chaîne réceptrice de 80kD [506]. Quelques années plus tard une équipe décrira le complexe du récepteur de l'IL-6 composé 2 molécules de gp130, 2 IL-6R et 2 IL-6 [698].

1989 : Clonage de l'OSM [525].

1990-1992 : Clonage de la gp130.

- En 1990, une équipe décrit que L'IL-6 se fixe à l'IL-6R, ce qui induit l'interaction avec une autre chaîne polypeptidique de 130 kD (IL-6 signal transducer) [699][508].

- En 1991, il apparaît que la gp130 ainsi que d'autres sous-unités réceptrices de ces cytokines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque mais contiennent une séquence conservée box1 importante pour la phosphorylation sur la tyrosine de ces récepteurs [700].

- En 1992, la gp130 est également décrite comme faisant partie du récepteur d'autres cytokines que l'IL-6 et notamment le LIF et l'OSM [701][702][703] [704]. Ces cytokines ont un récepteur formé d'une chaîne spécifique associée à une chaîne commune de transduction du signal. La gp130 est exprimée dans de nombreux types cellulaires et tissulaires, pouvant expliquer la redondance et la pléiotropie de ces cytokines [705].

1991-1992 : Clonage du LIFR. Le LIFR humain est structurellement proche de la gp130 [706] [707]. L'association LIFR et gp130 constitue le récepteur du LIF mais également le récepteur de l'OSM [532].

1993 : Découverte des JAK. Il s'agit d'une nouvelle famille de tyrosine kinases impliquée dans la signalisation de ces cytokines [708].

1994 : Clonage de STAT3. Ce facteur de transcription, également appelé APRF (acute-phase responsive factor), est impliqué dans la signalisation de la gp130 [709][710][711]. STAT3 est activé par les JAK, forme un dimère et est transloqué dans le noyau.

1994-1996: Clonage de l'OSMR. Il s'agit d'un récepteur de l'OSM sur lequel le LIF ne peut pas se lier. En s'associant à la gp130, il forme le récepteur de type II de l'OSM, par opposition au récepteur de type I constitué des sous-unités gp130/LIFR qui est commun avec le LIF. [533]. En absence de

LIFR et OSMR, l'OSM se comporte comme un antagoniste de l'IL-6 en se fixant à la gp130 [712]. En 1996, l'OSMR est officiellement cloné [534].

1997 : Découverte des SOCS. Initialement appelés SSI (STAT-induced STAT inhibitor), les SOCS sont présentés comme une cible de la signalisation JAK-STAT, se liant aux JAK pour inhiber leur activité [713][714][415].

LIF	LIF	Leukemia inhibitory factor
	HILDA	Human interleukin for DA cells
	D-factor	Differentiation factor
	DIA	Differentiation inhibitory activity
	DIF	Differentiation inducing factor
	DRF	Differentiation retarding factor
	HSF III	Hepatocyte stimulating factor
	CNDF	Cholinergic neuronal differentiating factor
	MLPLI	Melanocyte-derived lipoprotein lipase inhibitor
IL-6	IL-6	Interleukine 6
	l'IFN β 2	Interferon Beta2
	BSF-2	B cell stimulin factor
Gp130	Gp130	
	IL-6ST	IL-6 signal transducer
IL-6R	IL-6R	
	Gp80	
LIFR	LIFR	
	Gp190	

Tableau 7: Différentes dénominations des cytokines et leurs récepteurs

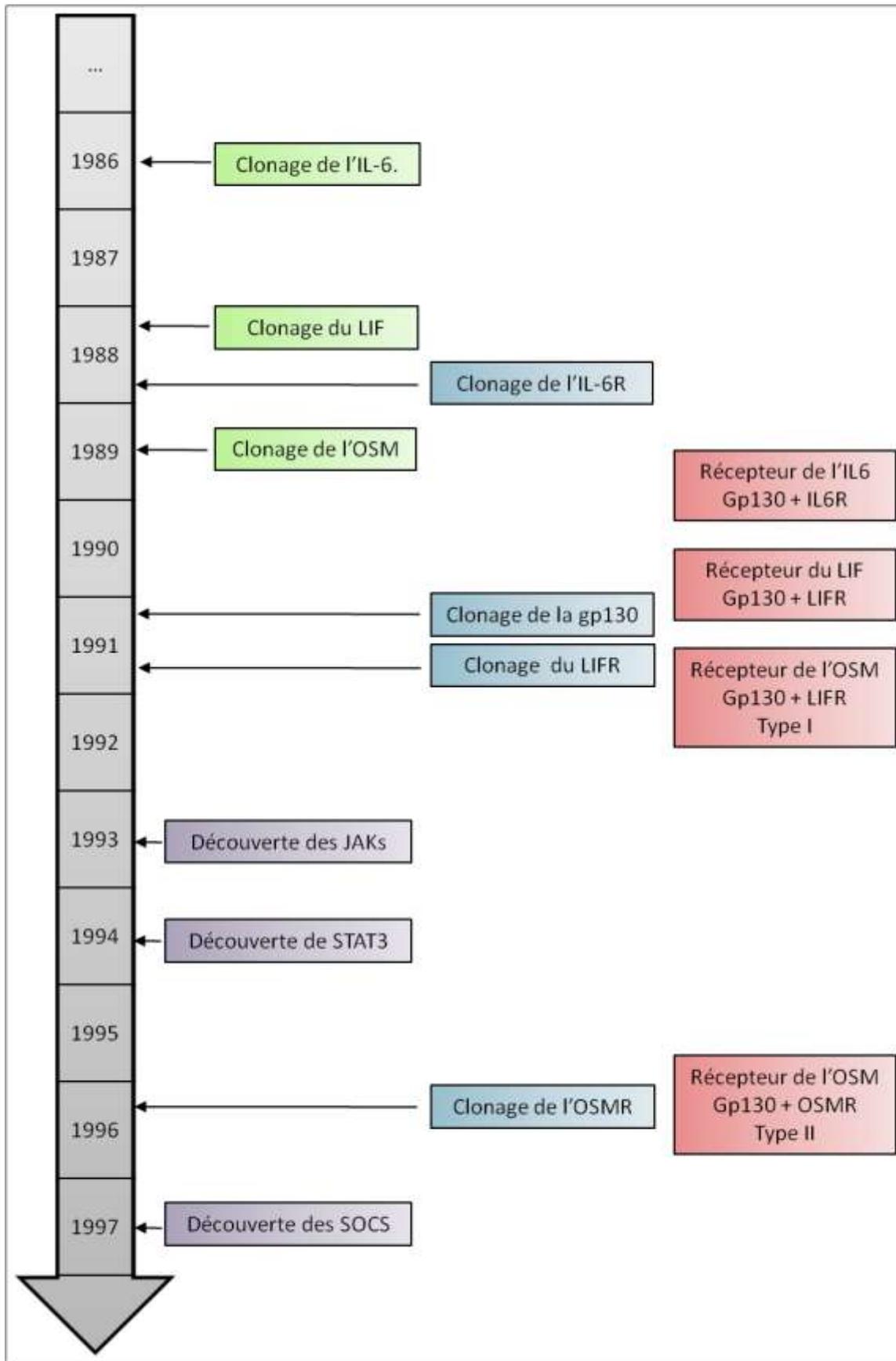


Figure 54: Historique des découvertes concernant l'OSM, le LIF et l'IL-6

Découvertes de l'OSM du LIF et de l'IL-6 ainsi que des récepteurs et principales voies de signalisation de ces cytokines.

Annexe 5 : Induction de la
différenciation ostéocytaire par l'OSM

Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells.

Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, Duplomb L, Berreur M, Rédini F, Heymann D, Blanchard F. Bone. 2009 May;44(5):830-9.

Un traitement à long terme par l'Oncostatine M induit une différenciation de type ostéocytaire dans des cellules d'ostéosarcome et de calvaria

Les études précédentes sur des cellules ostéoblastiques primaires ou d'ostéosarcome (ostéoblastes normaux ou transformés) ont montré que l'oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'interleukine-6, possède à la fois des effets cyostatiques et proapoptotiques. Sur la différenciation, l'OSM a des activités complexes et mal comprises, stimulant les premières étapes de l'ostéogenèse mais inhibant l'expression des marqueurs ostéoblastiques et la formation osseuse à des étapes plus tardives.

Dans cette étude, nous avons analysé des cellules d'ostéosarcome de rat transduites avec des particules lentivirales codant l'OSM (lvOSM) pour produire stablement cette cytokine. Après plusieurs semaines de culture, les cellules transduites OSRGA et ROS 17/2.8 sont inhibées en prolifération et sensibilisées à l'apoptose induite par l'inhibiteur de kinase staurosporine (Sts). De plus, ce traitement à long terme avec l'OSM induit (i) une diminution des marqueurs ostéoblastiques (ALP, OC et BSP), (ii) des changements morphologiques aboutissant à des formes allongées et/ou étoilées et (iii) une augmentation des marqueurs ostéocytaires (sclerostin et/ou E11), suggérant une différenciation ostéocytaire. Au contraire des ostéosarcomes, les cellules de la calvaria de rat (comprenant principalement des précurseurs ostéoblastiques) transduites avec le lvOSM ont un taux de prolifération augmenté. Cependant, elles se différencient également en cellules étoilées exprimant la sclerostin, E11 et Phex (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome). Les cellules de calvaria transduites avec le lvOSM, mais pas les cellules d'ostéosarcome, expriment aussi des héli-canaux fonctionnels, une caractéristique des ostéocytes en lien avec leurs capacités de mécano-senseurs.

Ces résultats indiquent que les ostéosarcomes produisant stablement l'OSM ne développent pas de résistance à cette cytokine et pourraient donc représenter un nouvel outil intéressant pour étudier les effets anticancéreux de l'OSM in-vivo. De plus, le statut de différenciation des cellules ostéoblastiques surexprimant l'OSM ressemble à celui de préostéocytes plutôt qu'à celui de préostéoblastes. Cependant, ces changements sont observés à des degrés divers selon les modèles cellulaires et le statut de transformation. Ainsi, nous proposons de nouvelles conditions de cultures pour l'obtention d'ostéocytes qui sont difficiles à obtenir in-vitro alors qu'ils représentent le contingent cellulaire le plus important des os.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Méd Vét* 2004;:1–13.
- 2 D Heymann, S Lepreux. Le tissu osseux. Dans: *Histologie: bases fondamentales*. 2008.
- 3 Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115–37.
- 4 Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:201–9.
- 5 Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006;235:176–90.
- 6 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 1995;17:87S–91S.
- 7 Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000;19:615–22.
- 8 Williams PA, Peacocke AR. The physical properties of a glycoprotein from bovine cortical bone (bone sialoprotein). *Biochim Biophys Acta* 1965;101:327–35.
- 9 Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:79–98.
- 10 Peretz A. [Osteocalcin, marker of bone metabolism]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 1993;148:90–6; discussion 97–9.
- 11 Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:132–8.
- 12 Paschalis EP, Recker R, DiCarlo E, Doty SB, Atti E, Boskey AL. Distribution of collagen cross-links in normal human trabecular bone. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003;:1942–6.
- 13 Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect* 1987;36:49–69.
- 14 Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A, de Crombrugge B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002;16:2813–28.
- 15 Kessler MW, Ackerman G, Dines JS, Grande D. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc* 2008;16:246–54.
- 16 Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury* 2008;39 Suppl 1:S88–96.
- 17 Pradal G. *Embryologie humaine et élémentaire. L'individu de sa naissance à sa mise au monde*. Ellipses.
- 18 Sadler T, Lagman J. *Embryologie médicale*. Pradel.
- 19 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–6.
- 20 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1981;78:7634–8.
- 21 Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255–6.
- 22 Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, *et al*. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987;330:576–8.
- 23 Davies TJ, Fairchild P. Optimization of Protocols for Derivation of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Refractory Strains, Including the Non-Obese Diabetic Mouse. *Stem Cells and Development* Published Online First: 20 Septembre 2011. doi:10.1089/scd.2011.0427
- 24 Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003;115:281–92.
- 25 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
- 26 Lerou P. Embryonic stem cell derivation from human embryos. *Methods Mol Biol* 2011;767:31–5.
- 27 Gaspard N, Vanderhaeghen P. From stem cells to neural networks: recent advances and perspectives for neurodevelopmental disorders. *Dev Med Child Neurol* 2011;53:13–7.
- 28 Dambrot C, Passier R, Atsma D, Mummery CL. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *Biochem J* 2011;434:25–35.
- 29 Luo Z, Wang G, Wang W, Xiao Q, Xu Q. Signalling pathways that regulate endothelial differentiation from stem cells. *Front Biosci* 2011;16:472–85.
- 30 Vandekerckhove B, Vanhee S, Van Coppennolle S, Snauwaert S, Velghe I, Taghon T, *et al*. In vitro generation of immune cells from pluripotent stem cells. *Front Biosci* 2011;16:1488–504.
- 31 Chen X, Zeng F. Directed hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Protein Cell* 2011;2:180–8.
- 32 Payne C, King J, Hay D. The role of activin/nodal and Wnt signaling in endoderm formation. *Vitam Horm* 2011;85:207–16.
- 33 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810–3.
- 34 Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 2006;441:1061–7.
- 35 Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, *et al*. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 1998;95:379–91.
- 36 Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126–40.

- 37 Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, *et al.* Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 2003;**113**:643–55.
- 38 Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 1999;**18**:4261–9.
- 39 Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005;**132**:885–96.
- 40 Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005;**105**:635–7.
- 41 Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004;**10**:55–63.
- 42 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663–76.
- 43 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;**318**:1917–20.
- 44 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;**131**:861–72.
- 45 Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003;**107**:929–34.
- 46 Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;**6**:230–47.
- 47 Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999;**65**:22–6.
- 48 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;**7**:211–28.
- 49 De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:1928–42.
- 50 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;**109**:235–42.
- 51 Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;**153**:1133–40.
- 52 Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;**213**:341–7.
- 53 Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;**102**:3837–44.
- 54 Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2008;**3**:731–41.
- 55 Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;**57**:1759–67.
- 56 Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, *et al.* Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res* 2008;**26**:56–64.
- 57 Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007;**53**:121–7.
- 58 de la Garza-Rodea AS, van der Velde-van Dijke L, Boersma H, Gonçalves MAFV, van Bekkum DW, de Vries AAF, *et al.* Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. *Cell Transplantation* Published Online First: 7 Juin 2011. doi:10.3727/096368911X580554
- 59 Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008;**15**:711–5.
- 60 Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008;**473**:98–105.
- 61 Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011;**20**:5–14.
- 62 Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;**10**:63–76.
- 63 Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;**89**:747–54.
- 64 Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;**89**:755–64.
- 65 Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, *et al.* A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999;**13**:1025–36.
- 66 Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;**108**:17–29.
- 67 Tai G, Polak JM, Bishop AE, Christodoulou I, Buttery LDK. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng* 2004;**10**:1456–66.
- 68 Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005;**8**:739–50.
- 69 Glass DA 2nd, Karsenty G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol* 2006;**73**:43–84.
- 70 Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, *et al.* Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005;**280**:33132–40.

- 71 Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999;**17**:269–78.
- 72 McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, *et al.* Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* 1996;**137**:4398–408.
- 73 Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, *et al.* Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol* 1999;**209**:298–307.
- 74 Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 1998;**37**:16360–8.
- 75 Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;**8**:455–98.
- 76 Huang C-YC, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;**22**:313–23.
- 77 Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrugge B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997;**17**:2336–46.
- 78 Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, *et al.* SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 2000;**275**:10738–44.
- 79 Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H. Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 2003;**278**:27224–9.
- 80 Huang W, Lu N, Eberspaecher H, De Crombrugge B. A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J Biol Chem* 2002;**277**:50668–75.
- 81 Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 2002;**245**:95–108.
- 82 Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;**238**:265–72.
- 83 Na K, Choi S-J, Kim S, Sun BK, Woo DG, Chung H-M, *et al.* Enhancement of cell proliferation and differentiation by combination of ascorbate and dexamethasone in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biotechnol Lett* 2007;**29**:1453–7.
- 84 Adams SL, Cohen AJ, Lassová L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol* 2007;**213**:635–41.
- 85 Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* 2006;**24**:1791–8.
- 86 Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 2005;**8**:11–7.
- 87 Karsenty G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2001;**142**:2731–3.
- 88 Freyria A-M, Courtes S, Mallein-Gerin F. [Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2]. *Pathol Biol* 2008;**56**:326–33.
- 89 Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;**10**:165–73.
- 90 Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, *et al.* Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J Cell Biochem* 1999;**74**:357–71.
- 91 Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;**79**:1147–56.
- 92 Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;**18**:1417–26.
- 93 Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005;**201**:1397–405.
- 94 Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;**22**:377–84.
- 95 Bai K, Huang Y, Jia X, Fan Y, Wang W. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J Biomech* 2010;**43**:1176–81.
- 96 Chu M-S, Chang C-F, Yang C-C, Bau Y-C, Ho LL-T, Hung S-C. Signalling pathway in the induction of neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells. *Cell Signal* 2006;**18**:519–30.
- 97 Yanjie J, Jiping S, Yan Z, Xiaofeng Z, Boai Z, Yajun L. Effects of Notch-1 signalling pathway on differentiation of marrow mesenchymal stem cells into neurons in vitro. *Neuroreport* 2007;**18**:1443–7.
- 98 Qian L, Saltzman WM. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 2004;**25**:1331–7.
- 99 Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;**10**:3016–20.
- 100 Chandra V, G S, Phadnis S, Nair PD, Bhonde RR. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 2009;**27**:1941–53.
- 101 Lee K-D, Kuo TK-C, Whang-Peng J, Chung Y-F, Lin C-T, Chou S-H, *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;**40**:1275–84.
- 102 Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008;**214**:3–9.

- 103 Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R, Whitty G, Haylock DN, Bertoncello I, *et al.* Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood* 2008;**111**:4055–63.
- 104 Jaatinen T, Laine J. Isolation of hematopoietic stem cells from human cord blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2007;**Chapter 2**:Unit 2A.2.
- 105 Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007;**1116**:227–37.
- 106 Rubin J, Fan X, Thornton D, Bryant R, Biskobing D. Regulation of murine osteoblast macrophage colony-stimulating factor production by 1,25(OH)2D3. *Calcif Tissue Int* 1996;**59**:291–6.
- 107 Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:3540–5.
- 108 Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;**139**:4424–7.
- 109 Boissy P, Machuca I, Pfaff M, Ficheux D, Jurdic P. Aggregation of mononucleated precursors triggers cell surface expression of alphavbeta3 integrin, essential to formation of osteoclast-like multinucleated cells. *J Cell Sci* 1998;**111 (Pt 17)**:2563–74.
- 110 Lakkakorpi PT, Helfrich MH, Horton MA, Väänänen HK. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 1993;**104 (Pt 3)**:663–70.
- 111 Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 1986;**78**:355–60.
- 112 Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, *et al.* Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;**47**:5–16.
- 113 Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;**273**:613–22.
- 114 Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:481–8.
- 115 Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;**423**:332–6.
- 116 Fauchoux C, Nesbitt SA, Horton MA, Price JS. Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J Exp Biol* 2001;**204**:443–55.
- 117 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;**93**:165–76.
- 118 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3597–602.
- 119 Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:2355–63.
- 120 Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 1998;**139**:4743–6.
- 121 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;**12**:1260–8.
- 122 Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, *et al.* Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000;**192**:463–74.
- 123 Lee S-K, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase A pathway in murine bone marrow cultures. *Bone* 2002;**31**:252–9.
- 124 Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;**142**:5050–5.
- 125 Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, *et al.* Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 2003;**163**:2021–31.
- 126 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;**423**:337–42.
- 127 Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007;**26**:2157–65.
- 128 Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, *et al.* Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 1997;**15**:2225–32.
- 129 Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;**66**:9339–44.
- 130 Jiang Z, Jones R, Liu JC, Deng T, Robinson T, Chung PED, *et al.* RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle* 2011;**10**:1563–70.
- 131 Hua F, Cornejo MG, Cardone MH, Stokes CL, Lauffenburger DA. Effects of Bcl-2 levels on Fas signaling-induced caspase-3 activation: molecular genetic tests of computational model predictions. *J Immunol* 2005;**175**:985–95.
- 132 Wagner ER, Luther G, Zhu G, Luo Q, Shi Q, Kim SH, *et al.* Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* 2011;**2011**:325238.

- 133 Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;**140**:883–99.
- 134 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;**82**:4–6.
- 135 Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011;**278**:16–27.
- 136 Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis* 2008;**25**:345–56.
- 137 Divoli A, Mendonça EA, Evans JA, Rzhetsky A. Conflicting Biomedical Assumptions for Mathematical Modeling: The Case of Cancer Metastasis. *PLoS Comput Biol* 2011;**7**. doi:10.1371/journal.pcbi.1002132
- 138 Desandes E, Clavel J, Berger C, Bernard J-L, Blouin P, de Lumley L, *et al.* Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* 2004;**43**:749–57.
- 139 Mohseny AB, Hogendoorn PCW. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells* 2011;**29**:397–403.
- 140 Tang X, Lu X, Guo W, Ren T, Zhao H, Zhao F, *et al.* Different expression of Sox9 and Runx2 between chondrosarcoma and dedifferentiated chondrosarcoma cell line. *Eur J Cancer Prev* 2010;**19**:466–71.
- 141 Boeuf S, Kunz P, Hennig T, Lehner B, Hogendoorn P, Bovée J, *et al.* A chondrogenic gene expression signature in mesenchymal stem cells is a classifier of conventional central chondrosarcoma. *J Pathol* 2008;**216**:158–66.
- 142 Bovée J, Cleton-Jansen A-M, Taminiou AHM, Hogendoorn PCW. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol* 2005;**6**:599–607.
- 143 Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiou AHM, *et al.* The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 2008;**13**:320–9.
- 144 Tang N, Song W-X, Luo J, Haydon RC, He T-C. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 2008;**466**:2114–30.
- 145 Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 1987;**127**:507–18.
- 146 Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res* 2005;**65**:4633–44.
- 147 Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2004;**64**:1266–77.
- 148 Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, *et al.* CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 2010;**120**:668–80.
- 149 Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 2003;**63**:3464–8.
- 150 Eliazer S, Spencer J, Ye D, Olson E, Ilaria RL Jr. Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:482–92.
- 151 Castillero-Trejo Y, Eliazer S, Xiang L, Richardson JA, Ilaria RL Jr. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res* 2005;**65**:8698–705.
- 152 Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà M-L, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, *et al.* Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 2005;**65**:11459–68.
- 153 Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 2007;**11**:421–9.
- 154 Riggi N, Suvà M-L, De Vito C, Provero P, Stehle J-C, Baumer K, *et al.* EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* 2010;**24**:916–32.
- 155 Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1999;**91**:1051–8.
- 156 Kim HJ, Chalmers PN, Morris CD. Pediatric osteogenic sarcoma. *Curr Opin Pediatr* 2010;**22**:61–6.
- 157 Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* 2002;**95**:2202–10.
- 158 Murphey MD, wan Jaovisidha S, Temple HT, Gannon FH, Jelinek JS, Malawer MM. Telangiectatic osteosarcoma: radiologic-pathologic comparison. *Radiology* 2003;**229**:545–53.
- 159 Ottaviani G, Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009;**152**:15–32.
- 160 Chauveinc L, Mosseri V, Quintana E, Desjardins L, Schlienger P, Doz F, *et al.* Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 2001;**22**:77–88.
- 161 Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997;**76**:1–14.
- 162 Carnevale A, Lieberman E, Cárdenas R. Li-Fraumeni syndrome in pediatric patients with soft tissue sarcoma or osteosarcoma. *Arch Med Res* 1997;**28**:383–6.
- 163 Leonard A, Craft AW, Moss C, Malcolm AJ. Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome. *Med Pediatr Oncol* 1996;**26**:249–53.
- 164 Hansen MF, Seton M, Merchant A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2006;**21 Suppl 2**:P58–63.
- 165 Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, *et al.* Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev* 2008;**22**:1662–76.
- 166 Janeway KA, Walkley CR. Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench. *Bone* 2010;**47**:859–65.

- 167 López-Guerrero JA, López-Ginés C, Pellín A, Carda C, Llombart-Bosch A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;**13**:81–91.
- 168 Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;**145**:1–30.
- 169 Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 2002;**40**:5–2.
- 170 Wu X, Cai Z-D, Lou L-M, Zhu Y-B. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiology* Published Online First: 2 Septembre 2011. doi:10.1016/j.canep.2011.08.002
- 171 Leaner VD, Chick JF, Donninger H, Linniola I, Mendoza A, Khanna C, *et al.* Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am J Pathol* 2009;**174**:265–75.
- 172 Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, *et al.* Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 2005;**117**:349–55.
- 173 Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;**83**:993–1000.
- 174 Dujardin F, Binh MBN, Bouvier C, Gomez-Brouchet A, Larousserie F, Muret A de, *et al.* MDM2 and CDK4 immunohistochemistry is a valuable tool in the differential diagnosis of low-grade osteosarcomas and other primary fibro-osseous lesions of the bone. *Mod Pathol* 2011;**24**:624–37.
- 175 Yarmish G, Klein MJ, Landa J, Lefkowitz RA, Hwang S. Imaging Characteristics of Primary Osteosarcoma: Nonconventional Subtypes1. *Radiographics* 2010;**30**:1653–72.
- 176 Heymann D, Redini F. Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *IBMS Bone Key* 2011;**8**:402–14.
- 177 Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PCW. Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop* 2006;**30**:437–44.
- 178 Bovée JV, Cleton-Jansen AM, Rosenberg C, Taminiu AH, Cornelisse CJ, Hogendoorn PC. Molecular genetic characterization of both components of a dedifferentiated chondrosarcoma, with implications for its histogenesis. *J Pathol* 1999;**189**:454–62.
- 179 Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 1977;**40**:818–31.
- 180 Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, Cleton-Jansen A-M, Taminiu AHM, Hogendoorn PCW, *et al.* Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:2843–52.
- 181 Sişu AM, Tatu FR, Stana LG, Petrescu CI, Tatu C, Motoc A. Chondrosarcoma of the upper end of the femur. *Rom J Morphol Embryol* 2011;**52**:709–13.
- 182 Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;**30**:425–30.
- 183 Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer* 1993;**53**:371–6.
- 184 Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, *et al.* Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006;**11**:503–19.
- 185 Ewing J. The Classic: Diffuse endothelioma of bone. Proceedings of the New York Pathological Society. 1921;12:17. *Clin Orthop Relat Res* 2006;**450**:25–7.
- 186 Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;**5**:261–70.
- 187 Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992;**359**:162–5.
- 188 Arvand A, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;**20**:5747–54.
- 189 Le Deley M-C, Delattre O, Schaefer K-L, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PCW, *et al.* Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;**28**:1982–8.
- 190 van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, *et al.* Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010;**28**:1989–94.
- 191 Rorie CJ, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res* 2004;**64**:7288–95.
- 192 Huang H-Y, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, *et al.* Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005;**23**:548–58.
- 193 Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;**120**:91–8.
- 194 Meyer JS, Nadel HR, Marina N, Womer RB, Brown KLB, Eary JF, *et al.* Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr Blood Cancer* 2008;**51**:163–70.
- 195 Hawkins DS, Schuetze SM, Butrynski JE, Rajendran JG, Vernon CB, Conrad EU 3rd, *et al.* [18F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts outcome for Ewing sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol* 2005;**23**:8828–34.
- 196 Barr FG, Womer RB. Molecular diagnosis of ewing family tumors: too many fusions... □? *J Mol Diagn* 2007;**9**:437–40.
- 197 Barr FG, Xiong QB, Kelly K. A consensus polymerase chain reaction-oligonucleotide hybridization approach for the detection of chromosomal translocations in pediatric bone and soft tissue sarcomas. *Am J Clin Pathol* 1995;**104**:627–33.

- 198 Jambhekar NA, Bagwan IN, Ghule P, Shet TM, Chinoy RF, Agarwal S, *et al.* Comparative analysis of routine histology, immunohistochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and fluorescence in situ hybridization in diagnosis of Ewing family of tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2006;**130**:1813–8.
- 199 May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, *et al.* Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:5752–6.
- 200 May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, *et al.* The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993;**13**:7393–8.
- 201 Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncogenes TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J* 1996;**15**:5022–31.
- 202 Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 1994;**9**:3087–97.
- 203 Knoop LL, Baker SJ. EWS/FLI alters 5'-splice site selection. *J Biol Chem* 2001;**276**:22317–22.
- 204 Yang L, Chansky HA, Hickstein DD. EWS.Fli-1 fusion protein interacts with hyperphosphorylated RNA polymerase II and interferes with serine-arginine protein-mediated RNA splicing. *J Biol Chem* 2000;**275**:37612–8.
- 205 Sanchez G, Delattre O, Auboeuf D, Dutertre M. Coupled alteration of transcription and splicing by a single oncogene: boosting the effect on cyclin D1 activity. *Cell Cycle* 2008;**7**:2299–305.
- 206 Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, *et al.* Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* 2000;**24**:175–9.
- 207 Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A. Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* 1991;**5**:908–18.
- 208 Rao VN, Ohno T, Prasad DD, Bhattacharya G, Reddy ES. Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* 1993;**8**:2167–73.
- 209 Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000;**19**:6482–9.
- 210 Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, *et al.* Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:5643–52.
- 211 Zhang L, Eddy A, Teng YT, Fritzler M, Kluppel M, Melet F, *et al.* An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:6961–70.
- 212 de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, *et al.* Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;**89**:783–92.
- 213 Kim S, Denny CT, Wisdom R. Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:2467–78.
- 214 Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, Abaan OD, Parvin JD, Cripe TP, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;**66**:5574–81.
- 215 Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS ONE* 2009;**4**:e4932.
- 216 Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, *et al.* Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:10149–54.
- 217 Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;**99**:239–47.
- 218 Thompson AD, Teitell MA, Arvand A, Denny CT. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 1999;**18**:5506–13.
- 219 Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 2002;**1**:393–401.
- 220 Kauer M, Ban J, Kofler R, Walker B, Davis S, Meltzer P, *et al.* A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS ONE* 2009;**4**:e5415.
- 221 Hancock JD, Lessnick SL. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle* 2008;**7**:250–6.
- 222 Mackintosh C, Madoz-Gúrpide J, Ordóñez JL, Osuna D, Herrero-Martín D. The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther* 2010;**9**:655–67.
- 223 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;**128**:683–92.
- 224 Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:253–66.
- 225 Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007;**618**:163–74.
- 226 Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 2008;**647**:21–9.
- 227 Burdach S, Plehm S, Unland R, Dirksen U, Borkhardt A, Staeger MS, *et al.* Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 2009;**8**:1991–6.
- 228 Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, *et al.* DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:3230–41.

- 229 Fukuma M, Okita H, Hata J-I, Umezawa A. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 2003;**22**:1–9.
- 230 Zwerner JP, May WA. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 2001;**20**:626–33.
- 231 Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, *et al.* Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 2006;**9**:405–16.
- 232 Mendiola M, Carrillo J, García E, Lalli E, Hernández T, de Alava E, *et al.* The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer* 2006;**118**:1381–9.
- 233 Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, *et al.* Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003;**278**:15105–15.
- 234 Matsunobu T, Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, *et al.* The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:1003–12.
- 235 Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, *et al.* Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 2001;**20**:3258–65.
- 236 Hahm. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;**23**:481.
- 237 Li X, McGee-Lawrence ME, Decker M, Westendorf JJ. The Ewing's sarcoma fusion protein, EWS-FLI, binds Runx2 and blocks osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2010;**111**:933–43.
- 238 Delattre O. [Ewing's tumours, genetic and cellular aspects]. *Pathol Biol* 2008;**56**:257–9.
- 239 Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 2007;**254**:1–10.
- 240 González I, Vicent S, de Alava E, Lecanda F. EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med* 2007;**85**:1015–29.
- 241 Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;**425**:836–41.
- 242 Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;**444**:756–60.
- 243 Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, *et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007;**1**:389–402.
- 244 Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007;**11**:69–82.
- 245 Hovinga KE, Shimizu F, Wang R, Panagiotakos G, Van Der Heijden M, Moayedpardazi H, *et al.* Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells* 2010;**28**:1019–29.
- 246 Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res* 2007;**67**:3560–4.
- 247 Ando K, Mori K, Rédini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol* 2008;**5**:263–8.
- 248 Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**:49–60.
- 249 Lamoureux F, Moriceau G, Picarda G, Rousseau J, Trichet V, Rédini F. Regulation of osteoprotegerin pro- or anti-tumoral activity by bone tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2010;**1805**:17–24.
- 250 Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, *et al.* RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1704**:49–57.
- 251 Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res* 2011;**71**:634–9.
- 252 Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, *et al.* Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS ONE* 2010;**5**:e10999.
- 253 David E, Blanchard F, Heymann MF, De Pinieux G, Gouin F, Rédini F, *et al.* The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma* 2011;**2011**:932451.
- 254 Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:2519–26.
- 255 Domingo-Domenech J, Oliva C, Rovira A, Codony-Servat J, Bosch M, Filella X, *et al.* Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5578–86.
- 256 Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol* 2003;**14**:1126–34.
- 257 Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flège 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* 2002;**20**:776–90.
- 258 Papachristou DJ, Goodman MA, Cieply K, Hunt JL, Rao UNM. Comparison of allelic losses in chondroblastoma and primary chondrosarcoma of bone and correlation with fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Pathol* 2006;**37**:890–8.
- 259 Terek RM, Schwartz GK, Devaney K, Glantz L, Mak S, Healey JH, *et al.* Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *J Orthop Res* 1998;**16**:585–90.

- 260 Dunst J, Stadler P, Becker A, Lautenschläger C, Pelz T, Hänsgen G, *et al.* Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. *Strahlenther Onkol* 2003;**179**:521–6.
- 261 Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br* 2008;**90**:364–70.
- 262 Rizzo M, Ghert MA, Harrelson JM, Scully SP. Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictors of outcome. *Clin Orthop Relat Res* 2001;**387**:224–33.
- 263 Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, *et al.* Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;**28**:3284–91.
- 264 Rodríguez-Galindo C, Navid F, Liu T, Billups CA, Rao BN, Krasin MJ. Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann Oncol* 2008;**19**:814–20.
- 265 Bacci G, Longhi A, Barbieri E, Ferrari S, Mercuri M, Briccoli A, *et al.* Second malignancy in 597 patients with ewing sarcoma of bone treated at a single institution with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1999. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;**27**:517–20.
- 266 Juergens C, Weston C, Lewis I, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, *et al.* Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer* 2006;**47**:22–9.
- 267 Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, Gokgoz N, Poon R, Lin AC, *et al.* Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 2006;**168**:321–30.
- 268 Miyaji T, Nakase T, Onuma E, Sato K, Myoui A, Tomita T, *et al.* Monoclonal antibody to parathyroid hormone-related protein induces differentiation and apoptosis of chondrosarcoma cells. *Cancer Lett* 2003;**199**:147–55.
- 269 Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, *et al.* Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:1211–7.
- 270 Fong Y-C, Yang W-H, Hsu S-F, Hsu H-C, Tseng K-F, Hsu C-J, *et al.* 2-methoxyestradiol induces apoptosis and cell cycle arrest in human chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 2007;**25**:1106–14.
- 271 Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 2004;**199**:1513–22.
- 272 Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer* 2010;**9**:17.
- 273 Jiang X, Dutton CM, Qi W ning, Block JA, Brodt P, Durko M, *et al.* Inhibition of MMP-1 expression by antisense RNA decreases invasiveness of human chondrosarcoma. *J Orthop Res* 2003;**21**:1063–70.
- 274 Wang Z, Bryan J, Franz C, Havlioglu N, Sandell LJ. Type IIB procollagen NH(2)-propeptide induces death of tumor cells via interaction with integrins α (V) β (3) and α (V) β (5). *J Biol Chem* 2010;**285**:20806–17.
- 275 Vincourt J-B, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Malanda B, *et al.* C-propeptides of procollagens I α 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res* 2010;**70**:4739–48.
- 276 Ho L, Stojanovski A, Whetstone H, Wei QX, Mau E, Wunder JS, *et al.* Gli2 and p53 cooperate to regulate IGFBP-3-mediated chondrocyte apoptosis in the progression from benign to malignant cartilage tumors. *Cancer Cell* 2009;**16**:126–36.
- 277 Daugaard S, Christensen LH, Høgdall E. Markers aiding the diagnosis of chondroid tumors: an immunohistochemical study including osteonectin, bcl-2, cox-2, actin, calponin, D2-40 (podoplanin), mdm-2, CD117 (c-kit), and YKL-40. *APMIS* 2009;**117**:518–25.
- 278 Kim DW, Kim K-O, Shin MJ, Ha JH, Seo SW, Yang J, *et al.* siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol Cancer* 2009;**8**:28.
- 279 Chen C, Zhou H, Xu L, Xu D, Wang Y, Zhang Y, *et al.* Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo. *Apoptosis* 2010;**15**:805–13.
- 280 Chow WA, Bedell V, Gaytan P, Borden E, Goldblum J, Hicks D, *et al.* Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are frequently detected by fluorescence in situ hybridization in conventional chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;**166**:95–100.
- 281 Lagonigro MS, Tamborini E, Negri T, Staurengo S, Dagrada GP, Miselli F, *et al.* PDGFR α , PDGFR β and KIT expression/activation in conventional chondrosarcoma. *J Pathol* 2006;**208**:615–23.
- 282 Schrage YM, Briaire-de Bruijn IH, de Miranda NFCC, van Oosterwijk J, Taminiu AHM, van Wezel T, *et al.* Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res* 2009;**69**:6216–22.
- 283 Jang J-H, Chung C-P. Tenascin-C promotes cell survival by activation of Akt in human chondrosarcoma cell. *Cancer Lett* 2005;**229**:101–5.
- 284 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:550–62.
- 285 Sakimura R, Tanaka K, Yamamoto S, Matsunobu T, Li X, Hanada M, *et al.* The effects of histone deacetylase inhibitors on the induction of differentiation in chondrosarcoma cells. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:275–82.
- 286 Cleton-Jansen A-M, van Beerendonk HM, Baelde HJ, Bovée JVG, Karperien M, Hogendoorn PCW. Estrogen signaling is active in cartilaginous tumors: implications for antiestrogen therapy as treatment option of metastasized or irresectable chondrosarcoma. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:8028–35.
- 287 Lai T-jen, Hsu S-feng, Li T-mao, Hsu H-chaung, Lin J-geng, Hsu C-jung, *et al.* Alendronate inhibits cell invasion and MMP-2 secretion in human chondrosarcoma cell line. *Acta Pharmacol Sin* 2007;**28**:1231–5.
- 288 Susa M, Morii T, Yabe H, Horiuchi K, Toyama Y, Weissbach L, *et al.* Alendronate inhibits growth of high-grade chondrosarcoma cells. *Anticancer Res* 2009;**29**:1879–88.

- 289 Yoshida M, Yasuda T, Hiramitsu T, Ito H, Nakamura T. Induction of apoptosis by anti-CD44 antibody in human chondrosarcoma cell line SW1353. *Biomed Res* 2008;**29**:47–52.
- 290 Nishida K, Kunisada T, Shen ZN, Kadota Y, Hashizume K, Ozaki T. Chondrosarcoma and peroxisome proliferator-activated receptor. *PPAR Res* 2008;**2008**:250568.
- 291 Nishida K, Furumatsu T, Takada I, Kawai A, Yoshida A, Kunisada T, *et al*. Inhibition of human chondrosarcoma cell growth via apoptosis by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Br J Cancer* 2002;**86**:1303–9.
- 292 Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 1995;**11**:1049–54.
- 293 Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henöckl C, Schemper M, Delattre O, *et al*. EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 1996;**7**:429–37.
- 294 Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005;**65**:8984–92.
- 295 Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, *et al*. EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**279**:401–6.
- 296 DuBois SG, Krailo MD, Lessnick SL, Smith R, Chen Z, Marina N, *et al*. Phase II study of intermediate-dose cytarabine in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2009;**52**:324–7.
- 297 Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, Mendoza A, Chen Q-R, Yeung C, *et al*. Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst* 2011;**103**:962–78.
- 298 Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:7275–83.
- 299 Benini S, Zuntini M, Manara MC, Cohen P, Nicoletti G, Nanni P, *et al*. Insulin-like growth factor binding protein 3 as an anticancer molecule in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2006;**119**:1039–46.
- 300 McKinsey EL, Parrish JK, Irwin AE, Niemeyer BF, Kern HB, Birks DK, *et al*. A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Fli1-regulated microRNAs. *Oncogene* Published Online First: 6 Jun 2011. doi:10.1038/onc.2011.197
- 301 Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M, Cerisano V, *et al*. Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther* 2002;**9**:296–307.
- 302 Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, Okuno SH, Schuetze SM, Paccagnella ML, *et al*. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 2010;**11**:129–35.
- 303 Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S, Benjamin R, *et al*. A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;**16**:2458–65.
- 304 Tolcher AW, Sarantopoulos J, Patnaik A, Papadopoulos K, Lin C-C, Rodon J, *et al*. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1. *J Clin Oncol* 2009;**27**:5800–7.
- 305 Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M, *et al*. CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. *Cancer Res* 2000;**60**:5134–42.
- 306 Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, *et al*. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* 2009;**15**:750–6.
- 307 Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS ONE* 2008;**3**:e1965.
- 308 Keshelava N, Houghton PJ, Morton CL, Lock RB, Carol H, Keir ST, *et al*. Initial testing (stage 1) of vorinostat (SAHA) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2009;**53**:505–8.
- 309 Kinsey M, Smith R, Iyer AK, McCabe ERB, Lessnick SL. EWS/FLI and its downstream target NR0B1 interact directly to modulate transcription and oncogenesis in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2009;**69**:9047–55.
- 310 Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res* 2001;**61**:2704–12.
- 311 Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, *et al*. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. *Clin Cancer Res* 2010;**16**:2363–74.
- 312 Luo W, Gangwal K, Sankar S, Boucher KM, Thomas D, Lessnick SL. GSTM4 is a microsatellite-containing EWS/FLI target involved in Ewing's sarcoma oncogenesis and therapeutic resistance. *Oncogene* 2009;**28**:4126–32.
- 313 Rosenblum H, Amital H. Anti-TNF therapy: safety aspects of taking the risk. *Autoimmun Rev* 2011;**10**:563–8.
- 314 Deroose JP, Eggermont AMM, van Geel AN, Burger JWA, den Bakker MA, de Wilt JHW, *et al*. Long-Term Results of Tumor Necrosis Factor {alpha}- and Melphalan-Based Isolated Limb Perfusion in Locally Advanced Extremity Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* Published Online First: 19 September 2011. doi:10.1200/JCO.2011.35.6618
- 315 Deroose JP, Eggermont AMM, van Geel AN, de Wilt JHW, Burger JWA, Verhoef C. 20 Years Experience of TNF-Based Isolated Limb Perfusion for In-Transit Melanoma Metastases: TNF Dose Matters. *Annals of Surgical Oncology* Published Online First: 31 Août 2011. doi:10.1245/s10434-011-2030-7
- 316 Gisslinger H. Interferon alpha in the therapy of multiple myeloma. *Leukemia* 1997;**11 Suppl 5**:S52–6.

- 317 Nagaraj NS, Datta PK. Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;**19**:77–91.
- 318 Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008;**134**:215–30.
- 319 McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**:429–42.
- 320 Grivnennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;**21**:11–9.
- 321 Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2008;**19**:351–9.
- 322 Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:798–809.
- 323 Grivnennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S, *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009;**15**:103–13.
- 324 Bollrath J, Pesses TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, *et al.* gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009;**15**:91–102.
- 325 Schiechl G, Bauer B, Fuss I, Lang SA, Moser C, Ruemmele P, *et al.* Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *J Clin Invest* 2011;**121**:1692–708.
- 326 Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay J-Y. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;**88**:1721–6.
- 327 Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007;**110**:1911–28.
- 328 Lu ZY, Brochier J, Wijdenes J, Brailly H, Bataille R, Klein B. High amounts of circulating interleukin (IL)-6 in the form of monomeric immune complexes during anti-IL-6 therapy. Towards a new methodology for measuring overall cytokine production in human in vivo. *Eur J Immunol* 1992;**22**:2819–24.
- 329 Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;**22**:347–52.
- 330 Choy E. RADIATE: more treatment options for patients with an inadequate response to tumor necrosis factor antagonists. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009;**5**:66–7.
- 331 Melton L, Coombs A. Actemra poised to launch IL-6 inhibitors. *Nat Biotechnol* 2008;**26**:957–9.
- 332 Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:227–36.
- 333 Jostock T, Müllner J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, *et al.* Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001;**268**:160–7.
- 334 Richards PJ, Nowell MA, Horiuchi S, McLoughlin RM, Fielding CA, Grau S, *et al.* Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:1662–72.
- 335 Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, *et al.* TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004;**21**:491–501.
- 336 Reeves DJ, Liu CY. Treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;**64**:11–25.
- 337 Weiss G, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Zhao Y, Liu H, Slingluff CL, *et al.* Molecular insights on the peripheral and intra-tumoral effects of systemic high dose rIL-2 (Aldesleukin) administration for the treatment of metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* Published Online First: 5 Octobre 2011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1650
- 338 Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleiner ES, Betcher D, Bernstein ML, *et al.* Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 2005;**23**:2004–11.
- 339 Lafleur EA, Jia SF, Worth LL, Zhou Z, Owen-Schaub LB, Kleiner ES. Interleukin (IL)-12 and IL-12 gene transfer up-regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;**61**:4066–71.
- 340 Duan X, Jia S-F, Koshkina N, Kleiner ES. Intranasal interleukin-12 gene therapy enhanced the activity of ifosfamide against osteosarcoma lung metastases. *Cancer* 2006;**106**:1382–8.
- 341 Liebau C, Roesel C, Schmidt S, Karreman C, Prissack JB, Bojar H, *et al.* Immunotherapy by gene transfer with plasmids encoding IL-12/IL-18 is superior to IL-23/IL-18 gene transfer in a rat osteosarcoma model. *Anticancer Res* 2004;**24**:2861–7.
- 342 Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, *et al.* STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:1727–38.
- 343 Sottnik JL, Thamm DH. Interleukin-11 receptor alpha is expressed on canine osteosarcoma. *Vet Comp Oncol* 2010;**8**:96–102.
- 344 Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future Oncol* 2011;**7**:1035–43.
- 345 Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, *et al.* The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:1895–905.
- 346 Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992;**258**:593–7.
- 347 Bellido T, Stahl N, Farruggella TJ, Borba V, Yancopoulos GD, Manolagas SC. Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1996;**97**:431–7.

- 348 Zhang XG, Gu JJ, Lu ZY, Yasukawa K, Yancopoulos GD, Turner K, *et al.* Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 1994;**179**:1337–42.
- 349 Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 1994;**56**:853–7.
- 350 Chen S-H, Benveniste EN. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**:379–91.
- 351 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;**374**:1–20.
- 352 Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, Brounais B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;**20**:19–28.
- 353 Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;**16**:293–322.
- 354 Haan C, Hermanns HM, Heinrich PC, Behrmann I. A single amino acid substitution (Trp(666)-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem J* 2000;**349**:261–6.
- 355 Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999;**283**:990–3.
- 356 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;**285**:1–24.
- 357 Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;**19**:5662–79.
- 358 Gurniak CB, Berg LJ. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* 1996;**87**:3151–60.
- 359 Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, *et al.* Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998;**93**:373–83.
- 360 Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, *et al.* Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 1995;**121**:1283–99.
- 361 Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, *et al.* Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;**93**:385–95.
- 362 Nosaka T, van Deursen JM, Tripp RA, Thierfelder WE, Witthuhn BA, McMickle AP, *et al.* Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 1995;**270**:800–2.
- 363 Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, *et al.* Partial Impairment of Cytokine Responses in Tyk2-Deficient Mice. *Immunity* 2000;**13**:549–60.
- 364 Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;**277**:1630–5.
- 365 Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:10418–23.
- 366 Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:7132–9.
- 367 Horvath CM, Wen Z, Darnell JE Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 1995;**9**:984–94.
- 368 Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;**264**:1415–21.
- 369 Ndubuisi MI, Guo GG, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB. Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 1999;**274**:25499–509.
- 370 Li X, Leung S, Kerr IM, Stark GR. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol* 1997;**17**:2048–56.
- 371 Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T, *et al.* An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 1997;**14**:751–61.
- 372 Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 1995;**267**:1990–4.
- 373 Zeng R, Aoki Y, Yoshida M, Arai K-ichi, Watanabe S. Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 2002;**168**:4567–75.
- 374 Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* 2000;**19**:4111–22.
- 375 Hirai H, Karian P, Kikyo N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* 2011;**438**:11–23.
- 376 Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Molecular Medicine Today* 1999;**5**:406–12.
- 377 Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 1995;**13**:369–98.
- 378 Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, *et al.* Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 1996;**271**:12991–8.
- 379 Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, *et al.* Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 2000;**12**:95–105.

- 380 Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Veziers J, Pouplard-Barthelais A, *et al.* Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 1997;**272**:15760–4.
- 381 Hintzen C, Evers C, Lippok BE, Volkmer R, Heinrich PC, Radtke S, *et al.* Box 2 region of the oncostatin M receptor determines specificity for recruitment of Janus kinases and STAT5 activation. *J Biol Chem* 2008;**283**:19465–77.
- 382 Stephanou A, Brar BK, Knight RA, Latchman DS. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ* 2000;**7**:329–30.
- 383 Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 1996;**84**:443–50.
- 384 Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 1999;**13**:1361–6.
- 385 Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002;**2**:381–92.
- 386 Heath C, Cross NCP. Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem* 2004;**279**:6666–73.
- 387 Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, *et al.* Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999;**59**:5059–63.
- 388 Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, *et al.* Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;**20**:2499–513.
- 389 Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, *et al.* Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;**93**:841–50.
- 390 Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:3801–4.
- 391 Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, *et al.* Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 1999;**13**:2604–16.
- 392 Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:1621–32.
- 393 Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, *et al.* Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 1999;**18**:4657–68.
- 394 Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;**19**:2474–88.
- 395 Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, *et al.* Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;**98**:295–303.
- 396 Kritikou EA, Sharkey A, Abell K, Came PJ, Anderson E, Clarkson RWE, *et al.* A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* 2003;**130**:3459–68.
- 397 Hutt JA, DeWille JW. Oncostatin M induces growth arrest of mammary epithelium via a CCAAT/enhancer-binding protein delta-dependent pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;**1**:601–10.
- 398 Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem* 2002;**277**:36167–73.
- 399 Ito Y, Matsui T, Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 2000;**32**:1370–6.
- 400 Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 1997;**138**:3666–76.
- 401 Li Q, Zhu J, Sun F, Liu L, Liu X, Yue Y. Oncostatin M promotes proliferation of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3. *Int J Mol Med* 2011;**28**:101–8.
- 402 Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Lensch WM, Andrews PW, *et al.* LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;**22**:770–8.
- 403 Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995;**267**:1349–53.
- 404 Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem* 2000;**275**:40742–8.
- 405 Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, *et al.* Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:4109–17.
- 406 Burfoot MS, Rogers NC, Watling D, Smith JM, Pons S, Paonessaw G, *et al.* Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J Biol Chem* 1997;**272**:24183–90.
- 407 Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;**91**:231–41.
- 408 Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995;**270**:28495–8.
- 409 Brodie C, Blumberg PM. Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* 2003;**8**:19–27.
- 410 Schuringa JJ, Dekker LV, Vellenga E, Kruijer W. Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem* 2001;**276**:27709–15.
- 411 Amin ARMR, Ichigotani Y, Oo ML, Biswas MHU, Yuan H, Huang P, *et al.* The PLC-PKC cascade is required for IL-1beta-dependent Erk and Akt activation: their role in proliferation. *Int J Oncol* 2003;**23**:1727–31.

- 412 Smyth DC, Kerr C, Richards CD. Oncostatin M-induced IL-6 expression in murine fibroblasts requires the activation of protein kinase Cdelta. *J Immunol* 2006;**177**:8740–7.
- 413 Jain N, Zhang T, Kee WH, Li W, Cao X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 1999;**274**:24392–400.
- 414 Yu CL, Jin YJ, Burakoff SJ. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem* 2000;**275**:599–604.
- 415 Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;**387**:917–21.
- 416 Chen XP, Losman JA, Rothman P. SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity* 2000;**13**:287–90.
- 417 Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2001;**276**:47038–45.
- 418 Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, *et al.* The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999;**18**:1309–20.
- 419 Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003;**4**:1169–76.
- 420 Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, *et al.* SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 2003;**278**:661–71.
- 421 Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, *et al.* The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* 2001;**276**:12530–8.
- 422 Liao J, Fu Y, Shuai K. Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:5267–72.
- 423 Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, *et al.* Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997;**278**:1803–5.
- 424 Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 2000;**19**:2638–44.
- 425 Kim TK, Maniatis T. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1996;**273**:1717–9.
- 426 Yu CL, Burakoff SJ. Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. *J Biol Chem* 1997;**272**:14017–20.
- 427 Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:980–5.
- 428 Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;**19**:2628–37.
- 429 Beuvink I, Hess D, Flotow H, Hofsteenge J, Groner B, Hynes NE. Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity. *J Biol Chem* 2000;**275**:10247–55.
- 430 Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1997;**272**:14899–907.
- 431 Cantwell CA, Sterneck E, Johnson PF. Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:2108–17.
- 432 Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:7138–46.
- 433 Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, *et al.* Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* 1996;**383**:344–7.
- 434 Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R, *et al.* Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *EMBO J* 1998;**17**:6963–71.
- 435 Takeshita T, Arita T, Higuchi M, Asao H, Endo K, Kuroda H, *et al.* STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* 1997;**6**:449–57.
- 436 Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:10120–5.
- 437 Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;**15**:74–80.
- 438 Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, Möller A, Kirnbauer R, Kapp A, *et al.* Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1991;**97**:27–33.
- 439 Ameglio F, Bonifati C, Fazio M, Mussi A, Trento E, Cordial Fei P, *et al.* Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8. *Arch Dermatol Res* 1997;**289**:399–403.
- 440 Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, *et al.* IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:411–7.
- 441 Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, *et al.* Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 2007;**178**:4615–22.
- 442 Atreya R, Neurath MF. Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Curr Drug Targets* 2008;**9**:369–74.
- 443 Dambacher J, Beigel F, Seiderer J, Haller D, Göke B, Auernhammer CJ, *et al.* Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;**56**:1257–65.

- 444 Broxmeyer HE, Li J, Hangoc G, Cooper S, Tao W, Mantel C, *et al.* Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Exp Hematol* 2007;**35**:78–86.
- 445 Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JMW, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT, *et al.* Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest* 2004;**113**:379–89.
- 446 Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2002;**280**:24–32.
- 447 Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JMW, *et al.* Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2008;**23**:2025–32.
- 448 Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, *et al.* A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 2006;**39**:505–12.
- 449 Malaval L, Aubin JE. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 2001;**Suppl 36**:63–70.
- 450 Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 2005;**204**:585–93.
- 451 Chipoy C, Berreur M, Couillaud S, Pradal G, Vallette F, Colombeix C, *et al.* Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *J Bone Miner Res* 2004;**19**:1850–61.
- 452 Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002;**169**:3353–62.
- 453 Richards CD, Langdon C, Deschamps P, Pennica D, Shaughnessy SG. Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine* 2000;**12**:613–21.
- 454 Manolagas SC, Bellido T, Jilka RL. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130. *Int J Immunopharmacol* 1995;**17**:109–16.
- 455 Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling AF, Komnenovic V, *et al.* Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* 2008;**454**:221–5.
- 456 Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, *et al.* Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 1994;**13**:1189–96.
- 457 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* 2008;**149**:3688–97.
- 458 Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, Ono K, Ohwaki T, Yoshimoto T, *et al.* Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 2007;**25**:277–85.
- 459 Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmüller U, Nakajima K, *et al.* Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 1999;**18**:3742–53.
- 460 Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, *et al.* Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 2007;**26**:6653–64.
- 461 Ouyang L, Shen LY, Li T, Liu J. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 2006;**27**:197–202.
- 462 Mulé JJ, McIntosh JK, Jablons DM, Rosenberg SA. Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. *J Exp Med* 1990;**171**:629–36.
- 463 Lacreusette A, Lartigue A, Nguyen J-M, Barbieux I, Pandolfino M-C, Paris F, *et al.* Relationship between tumour-infiltrating lymphocytes to Oncostatin M and/or IL-6 and survival of stage III melanoma patients treated with tumour-infiltrating lymphocytes. *J Pathol* 2008;**216**:451–9.
- 464 Yoshimoto T, Morishima N, Mizoguchi I, Shimizu M, Nagai H, Oniki S, *et al.* Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol* 2008;**180**:6527–35.
- 465 Wei L-H, Baumann H, Tracy E, Wang Y, Hutson A, Rose-John S, *et al.* Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. *Br J Cancer* 2007;**97**:1513–22.
- 466 Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS. Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1996;**2**:1417–25.
- 467 Treon SP, Anderson KC. Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Curr Opin Hematol* 1998;**5**:42–8.
- 468 Lu Y, Zhang J, Dai J, Dehne LA, Mizokami A, Yao Z, *et al.* Osteoblasts induce prostate cancer proliferation and PSA expression through interleukin-6-mediated activation of the androgen receptor. *Clin Exp Metastasis* 2004;**21**:399–408.
- 469 de la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, *et al.* Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995;**95**:2846–52.
- 470 Rutkowski P, Kamińska J, Kowalska M, Ruka W, Steffen J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 2003;**84**:151–9.
- 471 Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;**368**:339–42.
- 472 Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, *et al.* Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 1998;**187**:461–8.
- 473 Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992;**359**:76–9.

- 474 Horn D, Fitzpatrick WC, Gompper PT, Ochs V, Bolton-Hansen M, Zarlring J, *et al.* Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 1990;**2**:157–65.
- 475 Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, *et al.* Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004;**5**:752–60.
- 476 Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G, Dorner AJ. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 1996;**157**:3627–34.
- 477 Herrlinger KR, Witthoef T, Raedler A, Bokemeyer B, Krummnerl T, Schulzke J-D, *et al.* Randomized, double blind controlled trial of subcutaneous recombinant human interleukin-11 versus prednisolone in active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006;**101**:793–7.
- 478 Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, *et al.* IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:7547–51.
- 479 Kitamura H, Kawata H, Takahashi F, Higuchi Y, Furuichi T, Ohkawa H. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. *Am J Pathol* 1995;**147**:1682–92.
- 480 De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, *et al.* Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:3551–63.
- 481 Shen MM, Skoda RC, Cardiff RD, Campos-Torres J, Leder P, Ornitz DM. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J* 1994;**13**:1375–85.
- 482 Metcalf D, Gearing DP. Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:5948–52.
- 483 Malik N, Haugen HS, Modrell B, Shoyab M, Clegg CH. Developmental abnormalities in mice transgenic for bovine oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:2349–58.
- 484 Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1994;**1**:725–31.
- 485 Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;**274**:1379–83.
- 486 Sims NA, Jenkins BJ, Nakamura A, Quinn JMW, Li R, Gillespie MT, *et al.* Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2005;**20**:1093–102.
- 487 Grey A, Mitnick MA, Masiukiewicz U, Sun BH, Rudikoff S, Jilka RL, *et al.* A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* 1999;**140**:4683–90.
- 488 Holtmann B, Wiese S, Samsam M, Grohmann K, Pennica D, Martini R, *et al.* Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci* 2005;**25**:1778–87.
- 489 Bugga L, Gadiant RA, Kwan K, Stewart CL, Patterson PH. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* 1998;**36**:509–24.
- 490 Kim EJ, Simpson PJ, Park D-J, Liu BQ, Ronnett GV, Moon C. Leukemia inhibitory factor is a proliferative factor for olfactory sensory neurons. *Neuroreport* 2005;**16**:25–8.
- 491 Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000;**141**:4365–72.
- 492 Cheng T-C, Huang C-C, Chen C-I, Liu C-H, Hsieh Y-S, Huang C-Y, *et al.* Leukemia inhibitory factor antisense oligonucleotide inhibits the development of murine embryos at preimplantation stages. *Biol Reprod* 2004;**70**:1270–6.
- 493 Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007;**450**:721–4.
- 494 Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:2393–403.
- 495 Escary JL, Perreau J, Duménil D, Ezine S, Brûlet P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 1993;**363**:361–4.
- 496 Morikawa Y, Tamura S, Minehata K-ichi, Donovan PJ, Miyajima A, Senba E. Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci* 2004;**24**:1941–7.
- 497 Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, *et al.* Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:407–11.
- 498 Shin H-I, Divieti P, Sims NA, Kobayashi T, Miao D, Karaplis AC, *et al.* Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2004;**145**:1376–85.
- 499 Fasnacht N, Müller W. Conditional gp130 deficient mouse mutants. *Semin Cell Dev Biol* 2008;**19**:379–84.
- 500 Li M, Sendtner M, Smith A. Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 1995;**378**:724–7.
- 501 Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, Reid KL, Ware CB, Cheema SS, *et al.* Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3178–81.
- 502 Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, *et al.* Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 2010;**120**:582–92.
- 503 Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 2003;**102**:3154–62.

- 504 Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004;**39**:635–44.
- 505 Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;**74**:1–10.
- 506 Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, *et al.* Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 1988;**241**:825–8.
- 507 Skinnotis G, Lupardus PJ, Martick M, Walz T, Garcia KC. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol Cell* 2008;**31**:737–48.
- 508 Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, *et al.* Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989;**58**:573–81.
- 509 Peters M, Müller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998;**92**:3495–504.
- 510 Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, *et al.* Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;**82**:5490–4.
- 511 Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:7629–33.
- 512 Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Herrmann SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988;**140**:508–12.
- 513 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;**24**:179–89.
- 514 Appenheimer MM, Girard RA, Chen Q, Wang W-C, Bankert KC, Hardison J, *et al.* Conservation of IL-6 trans-signaling mechanisms controlling L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Eur J Immunol* 2007;**37**:2856–67.
- 515 Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:784–8.
- 516 Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;**52**:232–4.
- 517 Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:9035–9.
- 518 Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006;**8 Suppl 2**:S2.
- 519 Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K, *et al.* Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;**155**:1459–63.
- 520 Jiang X-P, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res* 2011;**31**:2899–906.
- 521 Muñoz-Fernández MA, Cano E, O'Donnell CA, Doyle J, Liew FY, Fresno M. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma, and interleukin-6 but not TNF-beta induce differentiation of neuroblastoma cells: the role of nitric oxide. *J Neurochem* 1994;**62**:1330–6.
- 522 Goswami S, Gupta A, Sharma SK. Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* 1998;**71**:1837–45.
- 523 Giovannini M, Djabali M, McElligott D, Sella L, Evans GA. Tandem linkage of genes coding for leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) on human chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 1993;**64**:240–4.
- 524 Rose TM, Bruce AG. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:8641–5.
- 525 Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1989;**9**:2847–53.
- 526 Linsley PS, Kallestad J, Ochs V, Neubauer M. Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1990;**10**:1882–90.
- 527 Hoffman RC, Moy FJ, Price V, Richardson J, Kaubisch D, Frieden EA, *et al.* Resonance assignments for Oncostatin M, a 24-kDa alpha-helical protein. *J Biomol NMR* 1996;**7**:273–82.
- 528 Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, *et al.* Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 1996;**15**:1055–63.
- 529 Grenier A, Dehoux M, Boutten A, Arce-Vicioso M, Durand G, Gougerot-Pocidal MA, *et al.* Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 1999;**93**:1413–21.
- 530 Suda T, Chida K, Todate A, Ide K, Asada K, Nakamura Y, *et al.* Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. *Cytokine* 2002;**17**:335–40.
- 531 Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 2005;**65**:8896–904.
- 532 Gearing DP, Bruce AG. Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New Biol* 1992;**4**:61–5.
- 533 Thoma B, Bird TA, Friend DJ, Gearing DP, Dower SK. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J Biol Chem* 1994;**269**:6215–22.
- 534 Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, *et al.* Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 1996;**271**:32635–43.
- 535 Chen D, Chu C-Y, Chen C-Y, Yang H-C, Chiang Y-Y, Lin T-Y, *et al.* Expression of short-form oncostatin M receptor as a decoy receptor in lung adenocarcinomas. *J Pathol* 2008;**215**:290–9.
- 536 Kausar T, Sharma R, Hasan MR, Saraya A, Chattopadhyay TK, Gupta SD, *et al.* Overexpression of a splice variant of oncostatin M receptor beta in human esophageal squamous carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;**34**:177–87.

- 537 Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B, *et al.* Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:3357–67.
- 538 Deller MC, Hudson KR, Ikemizu S, Bravo J, Jones EY, Heath JK. Crystal structure and functional dissection of the cytotostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 2000;**8**:863–74.
- 539 Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 1992;**148**:1731–6.
- 540 Brown TJ, Rowe JM, Liu JW, Shoyab M. Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* 1991;**147**:2175–80.
- 541 Cichy J, Rose-John S, Potempa J, Pryjma J, Travis J. Oncostatin M stimulates the expression and release of the IL-6 receptor in human hepatoma HepG2 cells. *J Immunol* 1997;**159**:5648–53.
- 542 Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;**149**:39–52.
- 543 Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, *et al.* Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 1997;**100**:158–68.
- 544 Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003;**170**:548–55.
- 545 Goren I, Kämpfer H, Müller E, Schiefelbein D, Pfeilschifter J, Frank S. Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds. *J Invest Dermatol* 2006;**126**:628–37.
- 546 de Hooge ASK, van de Loo FAJ, Bennink MB, de Jong DS, Arntz OJ, Lubberts E, *et al.* Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 2002;**160**:1733–43.
- 547 Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 2001;**166**:3491–8.
- 548 Pelletier J-P, Martel-Pelletier J. Oncostatin M: foe or friend? *Arthritis Rheum* 2003;**48**:3301–3.
- 549 Richards CD, Langdon C, Botelho F, Brown TJ, Agro A. Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J Immunol* 1996;**156**:343–9.
- 550 Mukouyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, Kim H, *et al.* In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 1998;**8**:105–14.
- 551 Blais M-E, Louis I, Perreault C. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol Rev* 2006;**209**:103–14.
- 552 Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukouyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;**11**:177–83.
- 553 Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Satake M, Kim Y, Terada K, *et al.* Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 2005;**166**:709–19.
- 554 Weiss TW, Samson AL, Niego B, Daniel PB, Medcalf RL. Oncostatin M is a neuroprotective cytokine that inhibits excitotoxic injury in vitro and in vivo. *FASEB J* 2006;**20**:2369–71.
- 555 Richards CD. Matrix catabolism in arthritis: priming the guns with oncostatin M. *J Rheumatol* 2004;**31**:2326–8.
- 556 Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000;**12**:1455–68.
- 557 Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:9739–43.
- 558 Lu C, Rak JW, Kobayashi H, Kerbel RS. Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* 1993;**53**:2708–11.
- 559 Lacreusette A, Nguyen J-M, Pandolfino M-C, Khammari A, Dreno B, Jacques Y, *et al.* Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 2007;**26**:881–92.
- 560 Komyod W, Böhm M, Metze D, Heinrich PC, Behrmann I. Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line. *Mol Cancer Res* 2007;**5**:271–81.
- 561 Bellido T, O'Brien CA, Roberson PK, Manolagas SC. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1998;**273**:21137–44.
- 562 Brounais B, Chipoy C, Mori K, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, *et al.* Oncostatin M induces bone loss and sensitizes rat osteosarcoma to the antitumor effect of Midostaurin in vivo. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:5400–9.
- 563 Douglas AM, Grant SL, Goss GA, Clouston DR, Sutherland RL, Begley CG. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998;**75**:64–73.
- 564 Liu J, Hadjokas N, Mosley B, Estrov Z, Spence MJ, Vestal RE. Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine* 1998;**10**:295–302.
- 565 Grant SL, Douglas AM, Goss GA, Begley CG. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors* 2001;**19**:153–62.
- 566 McCormick C, Freshney RI. Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2000;**82**:881–90.
- 567 Wang W-dong, Chen Z-tang, Li D-zhi, Duan Y-zhong, Wang Z-xin, Cao Z-huai. [Oncostatin M gene therapy in mice bearing lung adenocarcinoma xenograft using a hypoxia/radiation dual-sensitive promoter]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2004;**27**:240–3.
- 568 Klausen P, Pedersen L, Jurlander J, Baumann H. Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 2000;**19**:3675–83.
- 569 Halfter H, Lotfi R, Westermann R, Young P, Ringelstein EB, Stögbauer FT. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 1998;**15**:135–47.

- 570 Chen S-H, Gillespie GY, Benveniste EN. Divergent effects of oncostatin M on astrogloma cells: influence on cell proliferation, invasion, and expression of matrix metalloproteinases. *Glia* 2006;**53**:191–200.
- 571 Koskela K, Pelliniemi T-T, Pelliniemi LJ, Remes K, Söderström K-O, Punnonen K, *et al.* Autocrine production and synergistic growth-promoting activity of interleukin-6 and oncostatin M in a new human myeloma cell line TU-1. *Acta Haematol* 2002;**107**:23–8.
- 572 Lundquist A, Barré B, Bienvenu F, Hermann J, Avril S, Coqueret O. Kaposi sarcoma-associated viral cyclin K overrides cell growth inhibition mediated by oncostatin M through STAT3 inhibition. *Blood* 2003;**101**:4070–7.
- 573 Jorcyk CL, Holzer RG, Ryan RE. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 2006;**33**:323–36.
- 574 Ng G, Winder D, Muralidhar B, Gooding E, Roberts I, Pett M, *et al.* Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol* 2007;**212**:325–34.
- 575 Metcalf D. The leukemia inhibitory factor (LIF). *Int J Cell Cloning* 1991;**9**:95–108.
- 576 Gascan H, Godard A, Ferez C, Naulet J, Praloran V, Peyrat MA, *et al.* Characterization and NH₂-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: leukemia inhibitory factor. Differentiation inhibitory activity secreted by a T lymphoma cell line. *J Biol Chem* 1989;**264**:21509–15.
- 577 Blanchard F, Raheer S, Duplomb L, Vusio P, Pitard V, Taupin JL, *et al.* The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosylated human leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998;**273**:20886–93.
- 578 Blanchard F, Duplomb L, Raheer S, Vusio P, Hoflack B, Jacques Y, *et al.* Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J Biol Chem* 1999;**274**:24685–93.
- 579 Baumann H, Ziegler SF, Mosley B, Morella KK, Pajovic S, Gearing DP. Reconstitution of the response to leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in hepatoma cells. *J Biol Chem* 1993;**268**:8414–7.
- 580 Rathjen PD, Toth S, Willis A, Heath JK, Smith AG. Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. *Cell* 1990;**62**:1105–14.
- 581 Haines BP, Voyle RB, Pelton TA, Forrest R, Rathjen PD. Complex conserved organization of the mammalian leukemia inhibitory factor gene: regulated expression of intracellular and extracellular cytokines. *J Immunol* 1999;**162**:4637–46.
- 582 Haines BP, Voyle RB, Rathjen PD. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs. *Mol Biol Cell* 2000;**11**:1369–83.
- 583 Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, *et al.* Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol* 2008;**253**:16–22.
- 584 Abe E, Tanaka H, Ishimi Y, Miyaura C, Hayashi T, Nagasawa H, *et al.* Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5958–62.
- 585 Tenhumberg S, Schuster B, Zhu L, Kovaleva M, Scheller J, Kallen K-J, *et al.* gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:649–57.
- 586 Huyton T, Zhang J-G, Luo CS, Lou M-Z, Hilton DJ, Nicola NA, *et al.* An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:12737–42.
- 587 Owczarek CM, Zhang Y, Layton MJ, Metcalf D, Roberts B, Nicola NA. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem* 1997;**272**:23976–85.
- 588 Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, *et al.* Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* 2004;**22**:522–30.
- 589 Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;**448**:196–9.
- 590 Bourguignon LYW, Peyrollier K, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem* 2008;**283**:17635–51.
- 591 Kidder BL, Yang J, Palmer S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2008;**3**:e3932.
- 592 Oskowitz AZ, Lu J, Penfornis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, *et al.* Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:18372–7.
- 593 Metcalf D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 2003;**21**:5–14.
- 594 Taupin JL, Pitard V, Dechanet J, Miossec V, Gualde N, Moreau JF. Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. *Int Rev Immunol* 1998;**16**:397–426.
- 595 Shellard J, Perreau J, Brûlet P. Role of leukemia inhibitory factor during mammalian development. *Eur Cytokine Netw* 1996;**7**:699–712.
- 596 Ichikawa Y. Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J Cell Physiol* 1969;**74**:223–34.
- 597 Aubert J, Dessolin S, Belmonte N, Li M, McKenzie FR, Staccini L, *et al.* Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 1999;**274**:24965–72.
- 598 Rajasingh J, Bord E, Hamada H, Lambers E, Qin G, Losordo DW, *et al.* STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction. *Circ Res* 2007;**101**:910–8.

- 599 Mohri T, Fujio Y, Maeda M, Ito T, Iwakura T, Oshima Y, *et al.* Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells. *J Biol Chem* 2006;**281**:6442–7.
- 600 Szekeres-Bartho J, Wilczynski JR, Basta P, Kalinka J. Role of progesterone and progestin therapy in threatened abortion and preterm labour. *Front Biosci* 2008;**13**:1981–90.
- 601 Metcalfe SM. Axotrophin and leukemia inhibitory factor (LIF) in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 2005;**360**:1687–94.
- 602 Viillard JF, Taupin JL, Miossec V, Pellegrin JL, Moreau BL. Analysis of interleukin-6, interleukin-10 and leukemia inhibitory factor (LIF) production by peripheral blood cells from patients with systemic lupus erythematosus identifies LIF as a potential marker of disease activity. *Eur Cytokine Netw* 1999;**10**:17–24.
- 603 Kerr BJ, Patterson PH. Potent pro-inflammatory actions of leukemia inhibitory factor in the spinal cord of the adult mouse. *Exp Neurol* 2004;**188**:391–407.
- 604 Dhingra K, Sahin A, Emami K, Hortobagyi GN, Estrov Z. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in breast cancer: a potential autocrine and paracrine growth regulatory mechanism. *Breast Cancer Res Treat* 1998;**48**:165–74.
- 605 Shin JE, Park SH, Jang YK. Epigenetic up-regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) gene during the progression to breast cancer. *Mol Cells* 2011;**31**:181–9.
- 606 Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007;**110**:4319–30.
- 607 Wyszczynski M, Miekus K, Jankowski K, Wanzeck J, Bertolone S, Janowska-Wieczorek A, *et al.* Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2007;**67**:2131–40.
- 608 Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, *et al.* TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;**15**:315–27.
- 609 Maruta S, Takiguchi S, Ueyama M, Kataoka Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, *et al.* A role for leukemia inhibitory factor in melanoma-induced bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2009;**26**:133–41.
- 610 Kamohara H, Ogawa M, Ishiko T, Sakamoto K, Baba H. Leukemia inhibitory factor functions as a growth factor in pancreas carcinoma cells: Involvement of regulation of LIF and its receptor expression. *Int J Oncol* 2007;**30**:977–83.
- 611 Halfter H, Kremerskothen J, Weber J, Hacker-Klom U, Barnekow A, Ringelstein EB, *et al.* Growth inhibition of newly established human glioma cell lines by leukemia inhibitory factor. *J Neurooncol* 1998;**39**:1–18.
- 612 Arthan D, Hong S-K, Park J-I. Leukemia inhibitory factor can mediate Ras/Raf/MEK/ERK-induced growth inhibitory signaling in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Lett* 2010;**297**:31–41.
- 613 Stewart CL. Reproduction: the unusual suspect. *Nature* 2007;**450**:619.
- 614 Metz S, Naeth G, Heinrich PC, Müller-Newen G. Novel inhibitors for murine and human leukemia inhibitory factor based on fused soluble receptors. *J Biol Chem* 2008;**283**:5985–95.
- 615 Kerr C, Langdon C, Graham F, Gauldie J, Hara T, Richards CD. Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression in vivo in mice. *J Interferon Cytokine Res* 1999;**19**:1195–205.
- 616 Flørenes VA, Lu C, Bhattacharya N, Rak J, Sheehan C, Slingerland JM, *et al.* Interleukin-6 dependent induction of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is lost during progression of human malignant melanoma. *Oncogene* 1999;**18**:1023–32.
- 617 Ouyang P. An in vitro model to study mesenchymal-epithelial transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**246**:771–6.
- 618 Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C, *et al.* Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone* 2009;**44**:830–9.
- 619 Li C, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Oncostatin M-induced growth inhibition and morphological changes of MDA-MB231 breast cancer cells are abolished by blocking the MEK/ERK signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat* 2001;**66**:111–21.
- 620 van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH, Cleton-Jansen AM, Gelderblom H, *et al.* Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* Published Online First: 23 Novembre 2011. doi:10.1093/annonc/mdr512
- 621 Farges M, Mazeau C, Gioanni J, Ettore F, Denovion H, Schneider M. Establishment and characterization of a new cell line derived from a human chondrosarcoma. *Oncol Rep* 1997;**4**:697–700.
- 622 Mozaffarian A, Brewer AW, Trueblood ES, Luzina IG, Todd NW, Atamas SP, *et al.* Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Immunol* 2008;**181**:7243–53.
- 623 Fritz DK, Kerr C, Fattouh R, Llop-Guevara A, Khan WI, Jordana M, *et al.* A mouse model of airway disease: oncostatin M-induced pulmonary eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and airway hyperresponsiveness are STAT6 dependent, and interstitial pulmonary fibrosis is STAT6 independent. *J Immunol* 2011;**186**:1107–18.
- 624 Baumann H, Wang Y, Richards CD, Jones CA, Black TA, Gross KW. Endotoxin-induced renal inflammatory response. Oncostatin M as a major mediator of suppressed renin expression. *J Biol Chem* 2000;**275**:22014–9.
- 625 Elbjairami WM, Truong LD, Tawil A, Wang W, Dawson S, Lan HY, *et al.* Early differential expression of oncostatin M in obstructive nephropathy. *J Interferon Cytokine Res* 2010;**30**:513–23.
- 626 Albasanz-Puig A, Murray J, Preusch M, Coan D, Namekata M, Patel Y, *et al.* Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011;**216**:292–8.
- 627 Takata F, Sumi N, Nishioku T, Harada E, Wakigawa T, Shuto H, *et al.* Oncostatin M induces functional and structural impairment of blood-brain barriers comprised of rat brain capillary endothelial cells. *Neurosci Lett* 2008;**441**:163–6.
- 628 Barton BE, Murphy TF. Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* 2001;**16**:251–7.

- 629 Gouin F, Ory B, Rédini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int J Cancer* 2006;**119**:980–4.
- 630 Kan CE, Cipriano R, Jackson MW. c-MYC Functions as a Molecular Switch to Alter the Response of Human Mammary Epithelial Cells to Oncostatin M. *Cancer Research* Published Online First: 5 Octobre 2011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3860
- 631 Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 2005;**10**:197–204.
- 632 Yang C, Atkinson SP, Vilella F, Lloret M, Armstrong L, Mann DA, *et al.* Opposing putative roles for canonical and noncanonical NFκB signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010;**28**:1970–80.
- 633 Teicher BA, Bagley RG, Rouleau C, Kruger A, Ren Y, Kurtzberg L. Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models. *Ann Saudi Med* 2011;**31**:174–82.
- 634 Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 2008;**19**:385–93.
- 635 Jeong EG, Kim MS, Nam HK, Min CK, Lee S, Chung YJ, *et al.* Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:3716–21.
- 636 Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, *et al.* JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:9414–8.
- 637 Xiang Z, Zhao Y, Mitaksov V, Fremont DH, Kasai Y, Molitoris A, *et al.* Identification of somatic JAK1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;**111**:4809–12.
- 638 Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, *et al.* Somatic acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2008;**205**:751–8.
- 639 Hoermann G, Cerny-Reiterer S, Herrmann H, Blatt K, Bilban M, Gisslinger H, *et al.* Identification of oncostatin M as a JAK2 V617F-dependent amplifier of cytokine production and bone marrow remodeling in myeloproliferative neoplasms. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* Published Online First: 3 Novembre 2011. doi:10.1096/fj.11-193078
- 640 Liu D, Huang Y, Zeng J, Chen B, Huang N, Guo N, *et al.* Down-regulation of JAK1 by RNA interference inhibits growth of the lung cancer cell line A549 and interferes with the PI3K/mTOR pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;**137**:1629–40.
- 641 Knoops L, Hornakova T, Royer Y, Constantinescu SN, Renaud J-C. JAK kinases overexpression promotes in vitro cell transformation. *Oncogene* 2008;**27**:1511–9.
- 642 Tu Y, Zhong Y, Fu J, Cao Y, Fu G, Tian X, *et al.* Activation of JAK/STAT signal pathway predicts poor prognosis of patients with gliomas. *Med Oncol* 2011;**28**:15–23.
- 643 Xiong H, Zhang Z-G, Tian X-Q, Sun D-F, Liang Q-C, Zhang Y-J, *et al.* Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia* 2008;**10**:287–97.
- 644 Song L, Rawal B, Nemeth JA, Haura EB. JAK1 activates STAT3 activity in non-small-cell lung cancer cells and IL-6 neutralizing antibodies can suppress JAK1-STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther* 2011;**10**:481–94.
- 645 Park S, Lee H-J, Jeong S-J, Song HS, Kim M, Lee H-J, *et al.* Inhibition of JAK1/STAT3 signaling mediates compound K-induced apoptosis in human multiple myeloma U266 cells. *Food Chem Toxicol* 2011;**49**:1367–72.
- 646 Lee H-J, Seo N-J, Jeong S-J, Park Y, Jung D-B, Koh W, *et al.* Oral administration of penta-O-galloyl-β-D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis* 2011;**32**:804–11.
- 647 James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;**434**:1144–8.
- 648 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;**365**:1054–61.
- 649 Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn T, Neilan CL, Hertel D, *et al.* Preclinical evaluation of local JAK1 and JAK2 inhibition in cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2011;**131**:1838–44.
- 650 Zouein FA, Duhé RJ, Booz GW. JAKs go nuclear: Emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. *Growth Factors* 2011;**29**:245–52.
- 651 Bansal G, Gittens SA, Uludağ H. A di(bisphosphonic acid) for protein coupling and targeting to bone. *J Pharm Sci* 2004;**93**:2788–99.
- 652 Peyrode C, Weber V, David E, Vidal A, Auzeloux P, Communal Y, *et al.* Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies. *Investigational New Drugs* Published Online First: 16 Avril 2011. doi:10.1007/s10637-011-9663-z
- 653 Page BDG, Ball DP, Gunning PT. Signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2011;**21**:65–83.
- 654 Kasza A, Rogowski K, Kilarski W, Sobota R, Bernas T, Dobrucki J, *et al.* Differential effects of oncostatin M and leukaemia inhibitory factor expression in astrocytoma cells. *Biochem J* 2001;**355**:307–14.
- 655 Ho M-Y, Leu S-JJ, Sun G-H, Tao M-H, Tang S-J, Sun K-H. IL-27 directly restrains lung tumorigenicity by suppressing cyclooxygenase-2-mediated activities. *J Immunol* 2009;**183**:6217–26.
- 656 Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 2004;**173**:3871–7.
- 657 Villarino AV, Gallo E, Abbas AK. STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2010;**185**:6461–71.

- 658 David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, *et al.* Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *Int J Cancer* 2011;**128**:1822–35.
- 659 Mori S, Murakami-Mori K, Bonavida B. Oncostatin M (OM) promotes the growth of DU 145 human prostate cancer cells, but not PC-3 or LNCaP, through the signaling of the OM specific receptor. *Anticancer Res* 1999;**19**:1011–5.
- 660 Underhill-Day N, Heath JK. Oncostatin M (OSM) cytoostasis of breast tumor cells: characterization of an OSM receptor beta-specific kernel. *Cancer Res* 2006;**66**:10891–901.
- 661 Tomida M, Heike T, Yokota T. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells. *Blood* 1999;**93**:1934–41.
- 662 Pitard V, Lorgeot V, Taupin JL, Aubard Y, Praloran V, Moreau JF. The presence in human serum of a circulating soluble leukemia inhibitory factor receptor (sgp190) and its evolution during pregnancy. *Eur Cytokine Netw* 1998;**9**:599–605.
- 663 Tomida M. Structural and functional studies on the leukemia inhibitory factor receptor (LIF-R): gene and soluble form of LIF-R, and cytoplasmic domain of LIF-R required for differentiation and growth arrest of myeloid leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 2000;**37**:517–25.
- 664 Tomida M. Presence of mRNAs encoding the soluble D-factor/LIF receptor in human choriocarcinoma cells and production of the soluble receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**232**:427–31.
- 665 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;**407**:249–57.
- 666 Roush K. Prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women: a review. *Am J Nurs* 2011;**111**:26–35; quiz 36–7.
- 667 Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996;**19**:281–90.
- 668 Lane KT, Beese LS. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res* 2006;**47**:681–99.
- 669 Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 2003;**72**:80–4.
- 670 Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, *et al.* A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* 2006;**147**:437–45.
- 671 Khovidhunkit W, Shoback DM. Clinical effects of raloxifene hydrochloride in women. *Ann Intern Med* 1999;**130**:431–9.
- 672 Reginster J-Y, Neuprez A. Strontium ranelate: a look back at its use for osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2010;**11**:2915–27.
- 673 Ory B, Heymann M-F, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, Redini F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 2005;**104**:2522–9.
- 674 Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann M-F, Coipeau P, Charrier C, *et al.* Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005;**37**:74–86.
- 675 Odri GA, Dumoucel S, Picarda G, Battaglia S, Lamoureux F, Corradini N, *et al.* Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res* 2010;**70**:7610–9.
- 676 Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, *et al.* Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 2001;**107**:1235–44.
- 677 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* 2007;**67**:7308–18.
- 678 Body J-J, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, *et al.* A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:1221–8.
- 679 Wright JEI, Gittens SA, Bansal G, Kitov PI, Sindrey D, Kucharski C, *et al.* A comparison of mineral affinity of bisphosphonate-protein conjugates constructed with disulfide and thioether linkages. *Biomaterials* 2006;**27**:769–84.
- 680 Pignatello R, Cenni E, Micieli D, Fotia C, Salerno M, Granchi D, *et al.* A novel biomaterial for osteotropic drug nanocarriers: synthesis and biocompatibility evaluation of a PLGA-ALE conjugate. *Nanomedicine (Lond)* 2009;**4**:161–75.
- 681 Torres Martin de Rosales R, Tavaré R, Glaria A, Varma G, Protti A, Blower PJ. (^{99m}Tc)-bisphosphonate-iron oxide nanoparticle conjugates for dual-modality biomedical imaging. *Bioconjug Chem* 2011;**22**:455–65.
- 682 Doschak MR, Kucharski CM, Wright JEI, Zernicke RF, Uludağ H. Improved bone delivery of osteoprotegerin by bisphosphonate conjugation in a rat model of osteoarthritis. *Mol Pharm* 2009;**6**:634–40.
- 683 Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 1968;**128**:801–20.
- 684 Claman HN, Chaperon EA, Selner JC. Thymus-marrow immunocompetence. 3. The requirement for living thymus cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;**127**:462–6.
- 685 Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, *et al.* Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;**77**:7152–6.
- 686 Maeda M, Horiuchi M, Numa S, Ichikawa Y. Characterization of a differentiation-stimulating factor for mouse myeloid leukemia cells. *Gann* 1977;**68**:435–47.
- 687 Koopman P, Cotton RG. A factor produced by feeder cells which inhibits embryonal carcinoma cell differentiation. Characterization and partial purification. *Exp Cell Res* 1984;**154**:233–42.
- 688 Smith AG, Hooper ML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* 1987;**121**:1–9.

- 689 Godard A, Gascan H, Naulet J, Peyrat MA, Jacques Y, Soulillou JP, *et al.* Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells. *Blood* 1988;**71**:1618–23.
- 690 Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;**324**:73–6.
- 691 Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* 1986;**5**:2529–37.
- 692 Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, *et al.* Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* 1987;**221**:18–22.
- 693 Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:7251–5.
- 694 Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, *et al.* Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* 1987;**6**:3995–4002.
- 695 Gough NM, Gearing DP, King JA, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, *et al.* Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:2623–7.
- 696 Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC, Wong GG. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 1988;**336**:690–2.
- 697 Baumann H, Wong GG. Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* 1989;**143**:1163–7.
- 698 Ciapponi L, Graziani R, Paonessa G, Lahm A, Ciliberto G, Savino R. Definition of a composite binding site for gp130 in human interleukin-6. *J Biol Chem* 1995;**270**:31249–54.
- 699 Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;**63**:1149–57.
- 700 Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, *et al.* Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:11349–53.
- 701 Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, *et al.* CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 1992;**69**:1121–32.
- 702 Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, *et al.* The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992;**255**:1434–7.
- 703 Liu J, Modrell B, Aruffo A, Marken JS, Taga T, Yasukawa K, *et al.* Interleukin-6 signal transducer gp130 mediates oncostatin M signaling. *J Biol Chem* 1992;**267**:16763–6.
- 704 Godard A, Heymann D, Raheer S, Anegon I, Peyrat MA, Le Mauff B, *et al.* High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. Molecular characterization and cellular distribution. *J Biol Chem* 1992;**267**:3214–22.
- 705 Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. *FASEB J* 1992;**6**:3387–96.
- 706 Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, *et al.* Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* 1991;**10**:2839–48.
- 707 Gough NM. Molecular genetics of leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor. *Growth Factors* 1992;**7**:175–9.
- 708 Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993;**366**:583–5.
- 709 Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 1993;**13**:276–88.
- 710 Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;**264**:95–8.
- 711 Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, *et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994;**77**:63–71.
- 712 Sporeno E, Paonessa G, Salvati AL, Graziani R, Delmastro P, Ciliberto G, *et al.* Oncostatin M binds directly to gp130 and behaves as interleukin-6 antagonist on a cell line expressing gp130 but lacking functional oncostatin M receptors. *J Biol Chem* 1994;**269**:10991–5.
- 713 Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;**387**:921–4.
- 714 Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;**387**:924–9.

ONCOSTATINE M: CIBLE OU MOLECULE THÉRAPEUTIQUE DANS LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES

Mots-clés: Oncostatine M, Leukemia inhibitory factor, Chondrosarcome, Sarcome d'Ewing

Les ostéosarcomes (OS), chondrosarcomes (CS) et sarcomes d'Ewing (ES) représentent la majorité des tumeurs osseuses primitives et leur traitement doit être amélioré. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'Oncostatine M (OSM), une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 capable de réguler la prolifération de nombreuses cellules tumorales et notamment de limiter le développement des OS.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'OSM exerce un effet anticancéreux sur les CS in-vitro (en inhibant la prolifération et en induisant la différenciation chondrocytaire hypertrophique) et in-vivo (en réduisant le développement tumoral dans un modèle syngénique de CS chez le rat). L'OSM pourrait être utilisée comme traitement adjuvant dans le cadre des CS.

Dans un second temps, nous avons montré qu'à l'inverse, l'OSM exerce un effet protumoral sur les ES en induisant la prolifération des cellules in-vitro. L'OSM présente dans l'environnement des tumeurs pourrait contribuer au développement des ES et doit être considérée comme un cible thérapeutique dans le cadre des ES.

Dans un troisième temps, nous avons recherché les facteurs pouvant expliquer ces différences de réponse à l'OSM entre les CS, les OS et les ES. Nous avons ainsi montré que l'effet pro-prolifératif de l'OSM sur les ES pourrait être dû à leur statut très peu différencié, à la translocation chromosomique caractéristique EWS-FLI1, à une modification de l'expression des récepteurs à l'OSM (une augmentation du ratio LIFR/OSMR) et à une hyper-activation de la voie JAK1/STAT3. Cette étude sur les tumeurs osseuses primitives pourrait contribuer à la compréhension de l'effet dual de l'OSM sur d'autres types de tumeurs.

ONCOSTATIN M: TARGET OR THERAPEUTIC AGENT FOR PRIMARY BONE TUMORS

Keywords: Oncostatin M, Leukemia inhibitory factor, Chondrosarcoma, Ewing sarcoma

Osteosarcomas (OS), chondrosarcomas (CS) and Ewing sarcomas (ES) represent the majority of primary bone tumors and their treatment needs further improvement. In this context, we were interested in Oncostatin M (OSM), a cytokine of the Interleukin-6 family, known to regulate proliferation in a variety of tumor cells and to limit tumor growth in OS.

We first demonstrated that OSM exerts a direct anti-cancer effect on CS in-vitro (by inhibiting proliferation and inducing a hypertrophic chondrocyte differentiation) and in-vivo (by reducing tumor growth in a rat syngenic model of CS). Therefore, OSM could be considered as a new adjuvant anti-cancer agent in CS.

Conversely, we demonstrated that OSM plays a protumoral role in ES as it induces cell proliferation in-vitro. OSM expressed in the tumor environment could lead to ES development and should be considered as a therapeutic target in these tumors.

Lastly, we looked into factors that could explain the opposite response of CS, OS and ES to OSM. We showed that the pro-proliferative activity of OSM in ES could be due to a low differentiation status, the chromosomal translocation EWS-FLI-1, a characteristic OSM receptors expression (elevated LIFR/OSMR ratio) and an over-activation of the JAK1/STAT3 pathway. This study on primary bone tumors could contribute to a better understanding of the dual role of OSM in other types of tumors.