

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

**OSTEOSARCOME,
CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES,
TISSU ADIPEUX :
INTERACTIONS DANS DES APPROCHES DE
RECONSTRUCTION TISSULAIRE.**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE
Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

*présentée
et soutenue publiquement par*

Pierre PERROT

le 8 Novembre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

M LATAILLADE Jean-Jacques **PU-PH, Paris**

Mme MARTINOT-DUQUENNOY Véronique **PU-PH, Lille**

Examineurs

M GOUIN François **PU-PH, Nantes**

M. DE PINIEUX Gonzague **PU-PH, Tours**

Directeurs de thèse

Mme TRICHET-MIGNE Valérie **MCU, Nantes**

M DUTEILLE Franck **PU-PH, Nantes**

Table des matières

Introduction bibliographique	1
I. L'ostéosarcome	2
A. Le tissu osseux	
1) Organisation macroscopique du tissu osseux	
A. <i>OS CORTICAL</i>	
B. <i>OS SPONGIEUX</i>	
2) Constituants du tissu osseux	
A. <i>LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE</i>	
B. <i>LES CELLULES</i>	
C. <i>LA MINERALISATION</i>	
3) Interactions entre les cellules osseuses	
4) Le remodelage osseux	
B. L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale	
1) Historique et définitions	
2) Physiopathologie et diagnostic	
3) Traitement multidisciplinaire	
4) Nouvelles approches thérapeutiques	
5) Place de la chirurgie plastique	
A. <i>LA RECONSTRUCTION OSSEUSE LORS DE L'EXERESE DE LA TUMEUR</i>	
B. <i>LES SEQUELLES ESTHETIQUES ET FONCTIONNELLES DE LA CHIRURGIE D'EXERESE</i>	
II. Les cellules souches mésenchymateuses	39
A. Les cellules souches	
1) Caractéristiques	
2) Classifications	
A. <i>SUIVANT LEUR POTENTIEL DE DIFFERENCIATION</i>	
B. <i>SUIVANT LEUR ORIGINE</i>	
B. Les cellules souches adultes	
1) Caractéristiques	
2) Homéostasie tissulaire	
3) Activité paracrine	
C. Les cellules souches mésenchymateuses : le rêve des cellules à tout faire	
1) Historique, caractéristiques et définitions	
2) Propriétés et utilisations thérapeutiques	
A. <i>APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE : HEMATOLOGIE/CANCEROLOGIE</i>	
B. <i>APPLICATIONS DE THERAPIE GENIQUE : CANCEROLOGIE</i>	
C. <i>APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE EN ORTHOPEDIE : REGENERATION OSSEUSE</i>	
D. <i>APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE EN CHIRURGIE PLASTIQUE : CICATRISATION</i>	
3) Risques et perspectives	
III. Le tissu adipeux	74
A. Un organe et une source de CSM	
1) Tissu adipeux blanc	
A. <i>TAB DE STRUCTURE</i>	
B. <i>TAB DE RESERVE</i>	
C. <i>TAB DE LA MOELLE OSSEUSE</i>	
2) Tissu adipeux brun	
B. Interactions avec le métabolisme osseux	
1) Leptine	
2) Adiponectine	
C. Le lipomodélage	
1) Historique et description de la technique	
2) Indications et controverses	
Avant-propos	83

Partie 1 : précurseurs ostéoblastiques et thérapie cellulaire dans l'ostéosarcome.....	86
<u>I. Matériels et méthodes.....</u>	90
A. Milieux et solutions	
B. Anticorps utilisés	
C. Lignées cellulaires	
1) Obtention des précurseurs ostéoblastiques d'origines variées	
2) Présentation des lignées cellulaires d'ostéosarcomes murins utilisées	
D. Caractérisation des lignées cellulaires	
1) Analyse par cytométrie en flux	
2) Capacité de différenciation vers la lignée ostéoblastique	
E. Analyse par bioluminescence	
1) Transduction des précurseurs ostéoblastiques par des particules lentivirales	
2) Mesure de l'activité luciférase <i>in vitro</i>	
F. Étude <i>in vitro</i> des interactions entre précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes	
1) Culture avec milieux conditionnés (MC)	
2) Co-culture indirecte	
G. Étude <i>in vivo</i> des interactions entre précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes	
1) Modèle d'ostéosarcome de souris chez des souris immunocompétentes	
2) Modèle d'ostéosarcome de rat chez des souris immunodéficientes	
3) Suivi expérimental	
4) Analyses statistiques	
<u>II. Résultats.....</u>	103
A. Caractérisation des précurseurs ostéoblastiques et des cellules d'ostéosarcomes	
1) CSM de rat, issues de la moelle osseuse (CSM)	
2) CSM de souris, issues de fibroblastes embryonnaires (CCL226)	
3) Pré-ostéoblastes de rat, issus de la calvaria (pré-ob)	
4) Cellules ostéosarcomateuses de rat (OSRGa) et de souris (POS-1)	
B. Activité luciférase des précurseurs ostéoblastiques	
1) Transfert du gène luciférase	
2) Corrélation entre bioluminescence et nombre de cellules	
C. Les précurseurs ostéoblastiques favoriseraient la croissance des cellules d'ostéosarcomes <i>in vitro</i>	
1) Effet du milieu conditionné des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules d'ostéosarcomes	
2) Effet des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules d'ostéosarcomes sans contact cellulaire	
D. Les précurseurs ostéoblastiques favoriseraient la croissance des cellules d'ostéosarcomes <i>in vivo</i>	
1) Stratégie	
2) Co-injection de précurseurs ostéoblastiques de souris (CCL-226) et de cellules d'ostéosarcome de souris (POS-1) chez la souris immunocompétente C3H/HeN	
3) Co-injection de précurseurs ostéoblastiques de rat (pré-ob) ou de cellules souches mésenchymateuses de rat (CSM) et de cellules d'ostéosarcome de rat (OSRGa) chez la souris immunodéficiente nude Swiss Nu/Nu	
<u>III. Conclusion.....</u>	123

<u>Partie 2</u> : tissu adipeux et thérapie tissulaire dans l'ostéosarcome.....	128
<u>I. Cas clinique</u>.....	129
A. Histoire clinique	
B. Hypothèses	
1) Coïncidence	
2) Conséquence du transfert de graisse	
3) Implication de l'inflammation induite par la chirurgie	
<u>II. Matériels et méthodes</u>.....	138
A. Milieux et solutions	
B. Anticorps et protéines recombinantes humaines utilisés	
C. Lignées cellulaires	
1) Obtention des Ad-CSM	
2) Présentation des lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains utilisées	
D. Caractérisation des lignées cellulaires	
1) Analyse par cytométrie en flux	
2) Capacité de différenciation vers la lignée ostéoblastique, adipocytaire et myocytaire	
3) Etude des transcrits : extraction des ARN totaux et RT-PCR	
4) Etude des protéines : Western Blot	
E. Étude <i>in vivo</i> des interactions entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes	
1) Modèle d'ostéosarcome humain SaOS2 et HOS chez des souris immunodéficientes	
2) Suivi expérimental	
3) Analyses statistiques	
F. Étude <i>in vitro</i> des interactions entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes	
1) Co-culture indirecte avec graisse ou Ad-CSM	
2) Culture avec milieux conditionnés (MC) par des Ad-CSM	
3) Culture en milieux supplémentés en adipocytokines	
<u>III. Résultats</u>.....	152
A. Caractérisation des Ad-CSM et des cellules d'ostéosarcomes	
1) Ad-CSM humaines, issues de la graisse (Ad-CSM)	
2) Cellules ostéosarcomateuses humaines SaOS2, HOS, U2OS	
B. La graisse et les Ad-CSM favoriseraient la croissance tumorale <i>in vivo</i>	
1) Progression tumorale en présence de graisse	
2) Progression tumorale en présence de Ad-CSM	
C. Interactions <i>in vitro</i> entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes	
1) Co-culture	
2) Milieux conditionnés	
3) Adipocytokines	
<u>IV. Conclusion</u>.....	180

Conclusion et perspectives	185
---	-----

Références bibliographiques	190
--	-----

Annexes

1. Perrot P, Heymann D, Charrier C, Couillaud S, Rédini F, Duteille F.

Extraosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat.
Ann Plast Surg. 2007 Aug;59(2):201-6.

2. Rousseau J, Escriou V, **Perrot P**, Picarda G, Charrier C, Scherman D, Heymann D, Rédini F, Trichet V.

Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models.

Cancer Gene Ther. 2010 Jun;17(6):387-97.

3. Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, Heymann MF, Heymann D, Duteille F, Trichet V, Gouin F.

Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence.

PloS One. 2010 Jun 8;5(6):e10999.

Introduction bibliographique

I. L'ostéosarcome

A. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale qui lui confèrent ses propriétés de rigidité et d'élasticité. La **phase organique** est constituée de cellules spécialisées, d'une matrice extracellulaire contenant essentiellement du collagène de type I (90-95 %), des protéoglycanes et des phosphatases alcalines. La **phase minérale** est composée de phosphate et de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Le tissu osseux est un tissu vivant en continuel remaniement grâce à un processus de remodelage assuré par deux types cellulaires : les **ostéoclastes** qui résorbent la matrice extracellulaire et dissolvent le minéral, et les **ostéoblastes** qui synthétisent une nouvelle matrice et induisent sa minéralisation. L'équilibre entre l'activité ostéoblastique et l'activité ostéoclastique permet le maintien de l'homéostasie phosphocalcique et de la masse osseuse au cours de la vie (Manolagas, 2000).

Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées d'origine mésenchymateuse responsables de la formation osseuse (Owen, 1988). Ils sont localisés à l'interface entre la moelle osseuse hématogène et la matrice osseuse minéralisée et couvrent ainsi les surfaces des cavités osseuses. La fonction principale des ostéoblastes est de synthétiser la matrice extracellulaire au cours de la croissance du squelette et d'en assurer le renouvellement et la réparation chez l'adulte tout au long de la vie. La régulation de l'activité ostéoblastique est indissociable de celle de l'activité ostéoclastique.

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées formées par la fusion de cellules mononucléées d'origine hématopoïétique dérivées des cellules de la lignée monocyte-macrophage (Suda, 1995). Ils sont directement responsables de la résorption osseuse et permettent ainsi le renouvellement de la matrice, qui pour être possible doit être obligatoirement précédée d'une phase de résorption. Après activation puis fixation à la

matrice organique, les ostéoclastes vont acidifier un compartiment situé sous la bordure en brosse appelé chambre de résorption afin de dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite de la phase minérale. Pour cela, la cellule produit, grâce à l'activité de l'anhydrase carbonique II, une quantité importante de protons qui est libérée dans la chambre de résorption par le biais d'une pompe à protons ATP-dépendante de type vacuolaire. La matrice protéique déminéralisée est ensuite dégradée sous l'action d'enzymes lysosomales, notamment la cathepsine K, et de collagénases qui appartiennent à la famille des métalloprotéases matricielles dont l'activité est optimale à pH acide (Rousselle, 2002 ; Georges, 2009). Des ostéoblastes pourront alors être recrutés et apposer une nouvelle matrice collagénique ostéoïde qui sera secondairement minéralisée.

Les ostéoblastes jouent également un rôle dans le contrôle de la résorption ostéoclastique en produisant des molécules régulatrices, telles que Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) ou Ostéoprotégérine (OPG), et des cytokines comme l'Interleukine 6 (IL-6) et l'Interleukine 11 (IL-11). RANKL, en interagissant avec son récepteur RANK présent à la surface des préostéoclastes, va induire leur différenciation en ostéoclastes puis leur activation. Au contraire, l'OPG, en interagissant avec RANKL, agit comme un inhibiteur de la liaison RANK-RANKL et empêche la différenciation / activation des préostéoclastes (Khosla, 2001). Les ostéoblastes sont également capables de libérer des protéases et participent ainsi à la phase de résorption.

Tout au long de la vie, le squelette subit d'importants remaniements : il est le siège chez l'adulte d'un remodelage permanent qui se déroule jusqu'à la fin de la croissance. Le remodelage osseux est un processus complexe qui permet de préserver les propriétés biomécaniques du squelette et d'assurer l'homéostasie minérale.

Dans ce système, tout dérèglement de l'équilibre entre apposition et résorption osseuse est lié à l'apparition de pathologies ostéocondensantes ou ostéolytiques, pouvant être métaboliques (ostéoporose) ou tumorales (ostéosarcome).

1) Organisation macroscopique du tissu osseux

Le squelette humain comporte trois types d'os :

- Les os longs comme l'humérus, le fémur ou le tibia présentent une de leurs dimensions nettement plus grande que les deux autres. Ils servent classiquement de modèle pour décrire la structure de l'os.

- Les os courts tels que les vertèbres ou les phalanges ont leurs trois dimensions sensiblement égales. Ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.

- Les os plats comme le sternum ou les os pariétaux ont une dimension nettement plus courte que les deux autres. Ils sont composés de deux couches d'os compact, les tables interne et externe, renfermant une couche d'os spongieux.

L'os long chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse. La forme particulière des os longs leur confère la capacité de résister aux forces de tension, de traction et de cisaillement. Histologiquement, on distingue l'os cortical ou compact de l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe richement vascularisée, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion des tendons et des ligaments (Figure 1). Cette enveloppe joue un rôle fondamental dans la croissance en longueur et surtout circonférentielle de l'os. Chez l'enfant, elle est constituée de deux couches, une couche superficielle fibreuse vascularisée et une couche profonde contenant des cellules souches et des pré-ostéoblastes (Toppets, 2004).

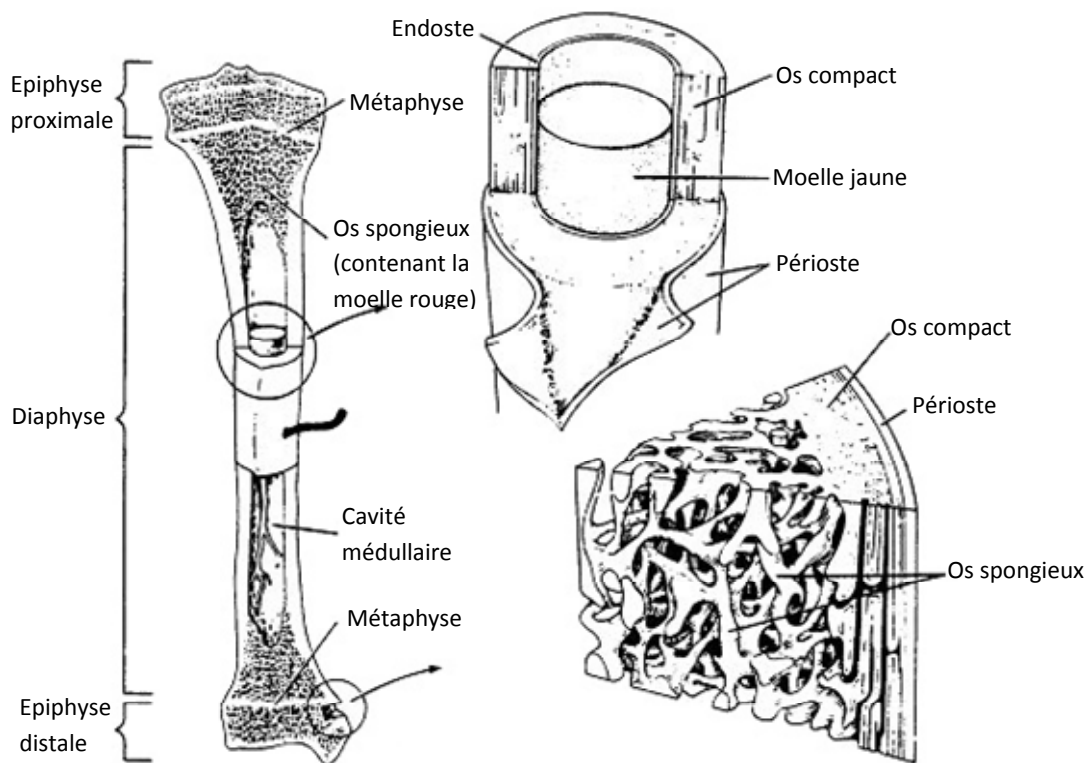


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.

La classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité :

- 5 à 30 % pour l'os cortical qui constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os plats et courts.
- 30 à 90 % pour l'os trabéculaire situé surtout au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaire et diaphysaire ainsi que dans les os courts et plats (Toppets, 2004).

A. OS CORTICAL

L'os cortical, également appelé os compact, représente 80-85 % du tissu osseux et constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'ostéons cylindriques de 200 à 300 μ m de diamètre alignés parallèlement à la diaphyse. Chaque ostéon, qui correspond à l'unité structurale de l'os cortical, est composé de lamelles concentriques (de 20 à 30) de fibres de collagène disposées autour d'un canal. Ce canal, appelé canal de Havers, large de 40 à 50 μ m, permet le passage de vaisseaux et de fibres nerveuses amyéliniques. Les canaux de Havers sont délimités par des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes qui se retrouvent

emmurées dans la matrice extracellulaire lors de la maturation des ostéons et deviennent alors des ostéocytes. Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux dits de Volkman assurant l'homéostasie phospho-calcique mais aussi la communication entre la vascularisation périostée et les vaisseaux de la moelle osseuse (Figure 2).

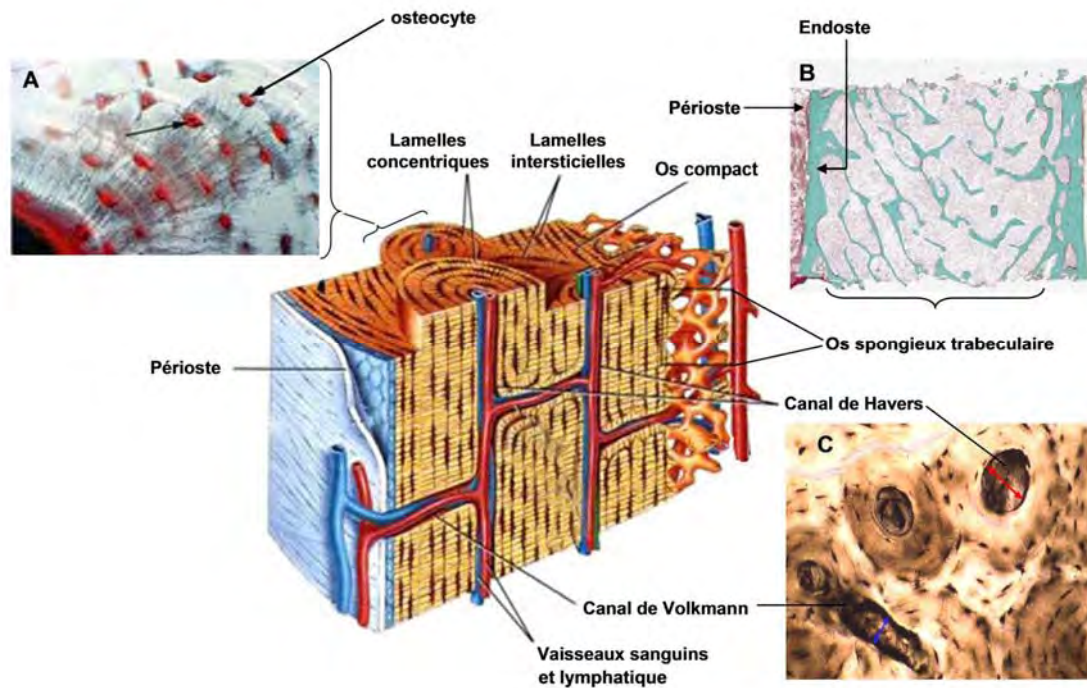


Figure 2 : Représentation schématique d'un os de type haversien d'après Marie, 1998.

A : Ostéocytes figés dans les lamelles concentriques de l'unité structurale de l'os compact : l'ostéon.

B : Réseau trabéculaire limité à l'endoste par les deux corticales (composées d'os compact) recouvertes de périoste. Coloration au trichrome de Goldner.

C : Canal de Havers et canal de Volkmann vue en coupe.

B. OS SPONGIEUX

L'os spongieux ou os trabéculaire est constitué d'un réseau de travées osseuses composées de plaques de tissu minéralisé reliées entre elles par des arches (Figure 3). Entre les travées osseuses se positionne la moelle osseuse représentant environ 75% du volume total de l'os spongieux. De par sa structure, l'os spongieux dispose d'une large surface d'échange avec la moelle osseuse, lui permettant ainsi d'effectuer au mieux ses fonctions hématopoïétiques. A l'interface de la moelle osseuse et du tissu minéralisé se trouvent les cellules ostéoblastiques.

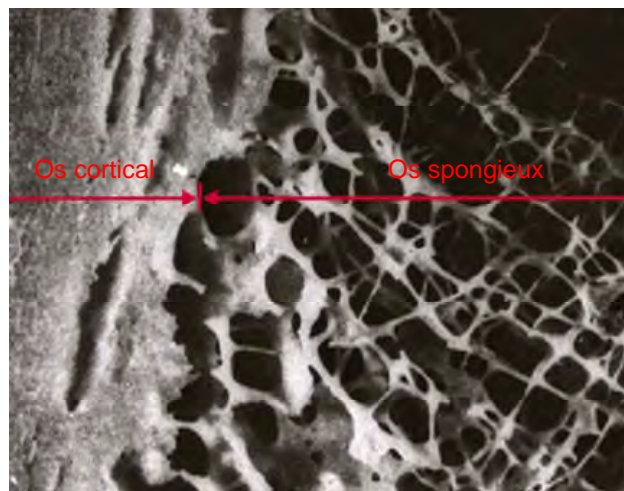


Figure 3 : Jonction entre os spongieux et os cortical (grossissement 4x)(Gotzos, 2007).

2) Constituants du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif constitué de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire occupant entre 92 et 95% du volume tissulaire.

A. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

L'os sec et dégraissé est formé de 70 % de substances minérales et de 30 % de substances organiques. Ces deux fractions ne sont pas simplement juxtaposées mais au contraire liées l'une à l'autre.

La fraction organique du tissu osseux est composée essentiellement de fibres de collagène de type I entourées d'une substance fondamentale interfibrillaire. Dans le tissu osseux lamellaire, les fibres de collagène sont arrangées de façon parallèle au sein d'une même lamelle osseuse, mais leur orientation varie d'une lamelle à l'autre. La substance interfibrillaire est composée de constituants variés tels que des glycoprotéines (ostéopontine, sialoprotéine osseuse), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes, des cytokines et des facteurs de croissance.

L'ostéocalcine, qui est la plus abondante des protéines non collagéniques (10 à 20 %), est spécifique de la matrice extracellulaire du tissu osseux. Elle jouerait un rôle dans l'attraction des ostéoclastes dans les foyers de résorption et dans le processus de minéralisation (Glowacki, 1991; Swaminathan, 2001).

Plusieurs protéines non collagéniques telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et la fibronectine renferment une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence RGD caractérise les protéines d'adhérence cellulaire et est reconnue par certaines protéines membranaires appelées intégrines (Ruoslahti, 1991). Ainsi, les intégrines présentes à la surface des ostéoblastes permettent leur attachement à la matrice extracellulaire.

Des facteurs de croissance et des cytokines (transforming growth factor ou TGF β , insulin-like growth factor ou IGF, tumor necrosis factor ou TNF, les interleukines et les bone morphogenetic proteins ou BMP) sont également présents en petites quantités dans la matrice osseuse (Hauschka, 1986). Ces facteurs protéiques jouent un rôle important dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse (Heymann, 2008).

La phase minérale de la matrice osseuse confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique et représente une importante réserve minérale. En effet, environ 99 % du calcium de l'organisme, 85 % du phosphore et entre 40 et 60 % du sodium et du magnésium sont incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium cristallisé sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui ont une forme hexagonale, aplatie et sont disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation secondaire succédant à la minéralisation primaire qui elle-même suit immédiatement la synthèse de matrice par les ostéoblastes (Heymann, 2008).

B. LES CELLULES

*L'OSTEOBLASTE ET L'OSTEOCYTE

→ Origine et différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices, responsables de la synthèse des constituants de la matrice organique osseuse et de sa minéralisation. D'origine mésodermique, les progéniteurs ostéoblastiques sont des cellules mésenchymateuses (Owen, 1988), essentiellement présentes chez l'adulte dans le stroma médullaire mais également au niveau du périoste et de l'endoste. Ces cellules souches pluripotentes sont communes aux ostéoblastes, chondrocytes, myocytes et adipocytes. Une série complexe d'étapes de prolifération et de différenciation conduisent aux ostéoblastes matures depuis les CSM (Figure 4).

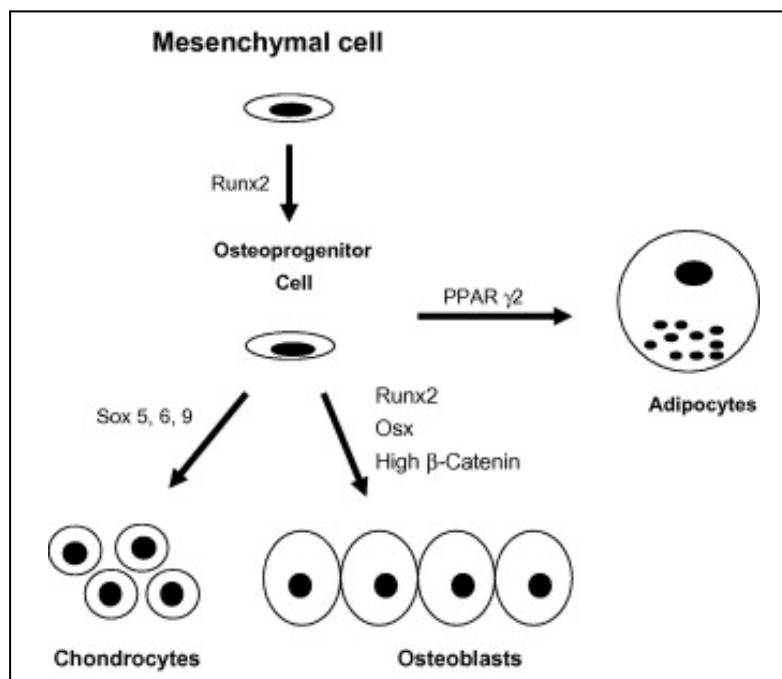


Figure 4 : Les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses sous l'action de différents facteurs de transcription (Marie, 2008).

Le facteur de transcription **Runx2/Cbfa1** est essentiel au développement ostéoblastique, à la différenciation et à la formation osseuse. Ce facteur régule positivement ou négativement l'expression des gènes ostéoblastiques en interagissant avec divers co-facteurs transcriptionnels.

→ Les différentes cellules de la lignée ostéoblastique

Plusieurs stades peuvent être définis au cours de la différenciation ostéoblastique.

Les **pré-ostéoblastes**, cellules précurseurs déjà engagées dans la voie ostéoblastique, sont généralement situés près des surfaces de formation osseuse où les ostéoblastes actifs produisent de l'os. Ces cellules, allongées, ont la capacité de se diviser mais ne synthétisent pas de matrice. Elles produisent néanmoins des précurseurs des molécules de collagène de type I et expriment quelques marqueurs précoces du tissu osseux, tels que la phosphatase alcaline ou l'ostéonectine (Franz-Odenaal, 2006).

Les **ostéoblastes matures**, qui ne se divisent plus, sont des cellules cuboïdales alignées le long de la matrice osseuse. Elles présentent un large noyau excentré avec un à trois nucléoles. Leur cytoplasme, basophile, renferme un abondant réticulum endoplasmique granulaire, de nombreuses mitochondries et un appareil de Golgi très développé, démontrant une activité de synthèse protéique très importante (Chavassieux, 2003). La fonction principale des ostéoblastes actifs est en effet la production de la matrice osseuse organique.

Les ostéoblastes matures synthétisent et expriment alors de nombreux marqueurs (Figure 5) :

- la phosphatase alcaline, enzyme localisée dans la membrane plasmique dont l'activité se traduit par l'hydrolyse des pyrophosphates inorganiques, qui sont des inhibiteurs de la calcification. Elle contribue alors au processus de minéralisation de la matrice (Wennberg, 2000).

- le collagène de type I, qui représente 90 % de la matrice organique de l'os. Cette molécule est constituée d'une triple hélice de trois chaînes polypeptidiques alpha, deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Ces chaînes sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique de l'ostéoblaste puis sécrétées dans la matrice extracellulaire où elles subissent des modifications avec clivage des propeptides C- et N- terminaux, et elles s'associent en fibres.

- la sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine, protéines adhésives possédant une séquence peptidique RGD qui, en se fixant à des récepteurs membranaires de type intégrine, permet l'adhésion des cellules à la matrice osseuse.

- l'ostéocalcine, protéine spécifique du tissu osseux. Elle y est exprimée en grande quantité, représentant 10 à 20 % des protéines non collagéniques de l'os. Elle contient des résidus acides carboxyglutamiques (gla) dont la carboxylation est dépendante de la

vitamine K. Cette protéine, exprimée tardivement par l'ostéoblaste mature, semble jouer un rôle clé dans la résorption osseuse en stimulant la différenciation ostéoclastique (Glowacki, 1991).

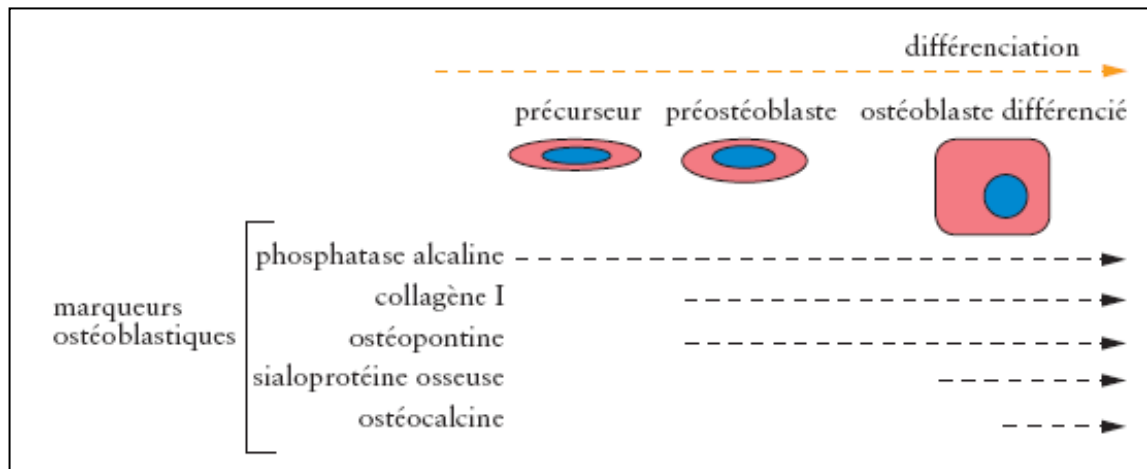


Figure 5 : Les principaux marqueurs exprimés au cours de la différenciation ostéoblastique (Heymann, 2008).

Il existe néanmoins une très grande hétérogénéité dans l'expression de ces marqueurs ostéoblastiques. Candelière et ses collaborateurs (Candelière, 2001) ont en effet montré que des ostéoblastes histologiquement identiques mais issus de différentes zones de la calvaria de rat expriment en fait des marqueurs à des taux très variables. Seule la phosphatase alcaline semble exprimée de façon ubiquitaire. En revanche, les niveaux d'expression de la sialoprotéine osseuse ou de l'ostéocalcine sont très différents en fonction de la localisation et de l'environnement osseux.

En dehors des protéines osseuses, les ostéoblastes sécrètent un certain nombre de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux, tels que le TGF- β , le fibroblast growth factor (FGF) et les BMPs. Ils produisent également des molécules régulatrices solubles comme des cytokines (IL-6, IL-11), TNF- α , RANKL ou OPG, relarguées dans le milieu extracellulaire ou exprimées à la surface de l'ostéoblaste et agissant sur les cellules précurseurs des ostéoclastes (Suda, 1999). Certaines protéases, capables de réguler le remodelage osseux par leur action sur les protéines de la matrice osseuse, sont également produites par les ostéoblastes. C'est le cas des Matrix MetalloProteinases (MMPs), dont la MMP13 ou collagénase 3 (Stahle-Backdahl, 1997).

A l'issue de la période de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes (65 %) meurent par apoptose, un processus de mort cellulaire programmée commun à de nombreux tissus. Les

cellules restantes peuvent alors se transformer en cellules bordantes ou en ostéocytes (Manolagas, 2000) (Figure 6).

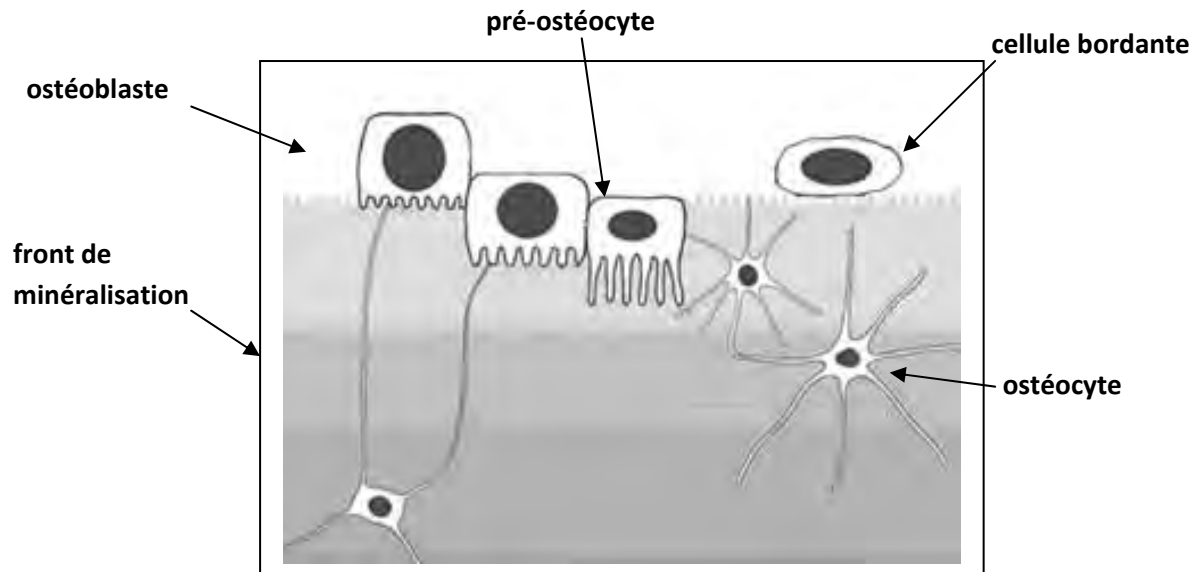


Figure 6 : Ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes.

D'après Franz-Odenaal, 2006.

Les **cellules bordantes** sont des cellules aplaties présentes le long des surfaces osseuses, avec un cytoplasme et un réticulum endoplasmique réduit, traduisant une faible activité de synthèse. Leur principale fonction est d'assurer la communication entre l'environnement cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse. Elles jouent également un rôle durant la phase initiale du remodelage osseux. En effet, elles sont capables de percevoir un signal d'initiation dont la nature reste inconnue, conduisant à la dégradation de la matrice non minéralisée située sous ces cellules. La matrice minéralisée est alors exposée à l'action des précurseurs ostéoclastiques qui vont venir adhérer à la matrice (Chambers, 1985).

Les **ostéocytes** proviennent d'ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse minéralisée, à l'intérieur d'une lacune périostéocytaire ou ostéoplaste. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os mature. La transformation de l'ostéoblaste en ostéocyte dure environ trois jours pendant lesquels de nombreux changements histologiques et morphologiques vont s'opérer. Le volume cytoplasmique est réduit de 70 % alors que de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques sont formés (Palumbo, 1986), leur conférant une forme étoilée (Figure 7). Le cytoplasme des ostéocytes renferme un abondant cytosquelette, composé de microtubules, de filaments intermédiaires et de filaments d'actine. Par contre, il est très peu

riche en organites : le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries sont fortement réduits, correspondant à une faible activité de synthèse protéique, alors que s'accumule du glycogène (Knothe Tate, 2004). Les marqueurs ostéoblastiques précédemment exprimés vont progressivement disparaître (phosphatase alcaline, collagène de type I, sialoprotéine osseuse, ostéocalcine) lors de la différenciation terminale en ostéocyte (Franz-Odendaal, 2006).

Les ostéocytes possèdent de nombreux et fins prolongements cytoplasmiques qui leur permettent d'établir des contacts avec les autres ostéocytes et les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les substances nutritives qui proviennent du sang atteignent les ostéocytes en diffusant soit dans les canalicules autour des prolongements cellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, passant de l'une à l'autre par des jonctions communicantes (jonctions GAP). Ce mode de diffusion, peu efficace, impose aux ostéocytes de se trouver à moins de 0,2 mm d'un vaisseau sanguin. Cette limitation explique la taille des travées de l'os spongieux et la structure de base de l'os compact : l'os haversien.

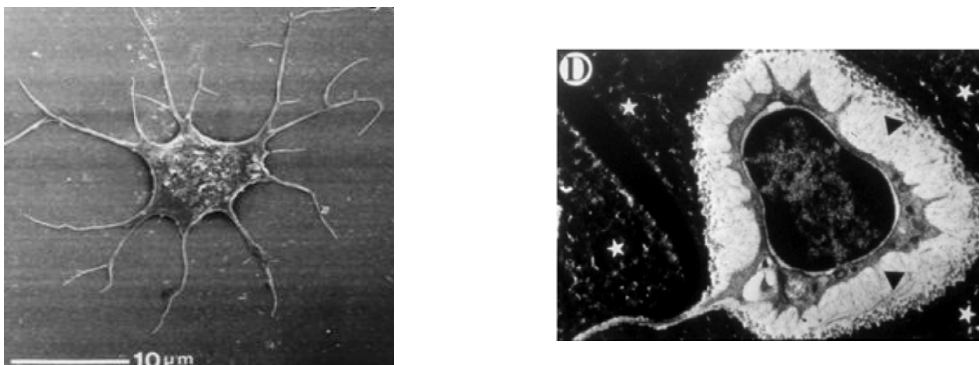
Les ostéocytes, qui forment un vaste réseau, interviennent essentiellement dans la transmission de signaux mécanosensoriels au cours du processus de remodelage osseux. En effet, ces cellules interagissent avec les fibres de collagènes tapissant les ostéoplastes par l'intermédiaire de molécules de type intégrines et fonctionnent comme des mécanorécepteurs, percevant les modulations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ils transmettent ensuite les informations aux ostéoblastes et aux cellules bordantes par l'intermédiaire des jonctions communicantes (Bonewald, 2008; Genetos, 2007), assurant une adaptation fonctionnelle du tissu osseux.

Certains marqueurs, plus ou moins spécifiques des ostéocytes, ont pu être identifiés :

- la sclérostine, protéine produite et sécrétée par les ostéocytes durant la phase de minéralisation de la matrice (van Bezooijen, 2005), qui réduit la formation osseuse en inhibant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, et en stimulant leur apoptose (Sutherland, 2004).
- l'antigène E11, protéine de surface exprimée lors de la transition ostéoblaste/ostéocyte (Zhang, 2006). Si certaines études tendent à prouver que ce marqueur est spécifique des ostéocytes (Schulze, 1999), d'autres au contraire ont montré une expression commune aux ostéoblastes et ostéocytes (Hadjiargyrou, 2001).

- le CD44, glycoprotéine transmembranaire récepteur de l'acide hyaluronique et également capable d'interagir avec d'autres ligands, tels que l'ostéopontine, les collagènes et les MMPS. Il a des fonctions d'adhésion entre cellules et matrice. Il est exprimé très fortement par les ostéocytes (Hughes, 1994; Jamal, 1996)
- la Dentin Matrix Protein 1 (DMP1), phosphoprotéine détectée dans la matrice et exprimée par les pré-ostéocytes et ostéocytes (Rios, 2005 ; Toyosawa, 2001)
- la métalloprotéase "Phosphate regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X chromosome" (Phex) exprimée par les ostéoblastes et les ostéocytes (Ruchon, 2000).

Le problème posé par les ostéocytes est qu'il est techniquement difficile de les isoler et de les cultiver *in vitro*. Les conditions de culture en monocouche sont trop différentes de leur environnement naturel, conduisant à des modifications phénotypiques. C'est pourquoi ces cellules ont été peu étudiées et restent mal connues.



*Figure 7 : Ostéocyte (Tanaka-Kamioka, 1998).
à gauche : microscopie électronique à balayage.
à droite : microscopie électronique à transmission.*

➔ Fonction des ostéoblastes

La fonction essentielle de l'ostéoblaste mature est la synthèse (Malaval, 1996), le dépôt et la minéralisation de la matrice osseuse organique.

L'OSTEOCLASTE*→ Origine et différenciation des ostéoclastes**

Responsable de la résorption osseuse, l'ostéoclaste est une grosse cellule multinucléée pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux. Elle possède un appareil de golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et est riche en enzymes lysosomales telles que Tartrate Resistant Acide Phosphatase (TRAP) ou la cathepsine K et en collagénases nécessaires à son activité de dégradation osseuse (Heymann, 2008).

Contrairement aux ostéoblastes qui dérivent de CSM pluripotentes, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocytaire (Suda, 1992). Les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées circulantes appelées Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage (CFU-GM). Le Macrophage Monocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF) stimule la prolifération de ces CFU-GM afin de maintenir un pool de cellules mononucléées appartenant à la lignée monocyte/macrophage, ces cellules étant considérées comme les précurseurs des ostéoclastes et caractérisées par l'absence de deux marqueurs ostéoclastiques, TRAP et le récepteur à la calcitonine (CTR).

Les précurseurs mononucléés sont ensuite attirés vers un site de résorption, par chimiotactisme, puis se fixent à la matrice osseuse pour se différencier, sous l'action de M-CSF et RANKL, en ostéoclastes mononucléés exprimant le CTR et TRAP. Ces cellules, toujours sous l'effet de M-CSF et RANKL, fusionnent pour former des cellules multinucléées qui ne sont pas encore actives et ne développent pas de bordure en brosse. L'activation des ostéoclastes est due à RANKL qui va stimuler la formation de la bordure en brosse (Lacey, 1998; Suda, 1999). L'ostéoclaste mature est visible au fond des lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée.

→ Fonction des ostéoclastes

La fonction essentielle des ostéoclastes est la résorption osseuse. Durant la première phase de ce processus, une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes est observée : les microfilaments d'actine, de vinculine et de taline s'organisent en anneaux. Ce phénomène est indispensable à la formation de la zone claire, zone dépourvue d'organites intracellulaires et riche en filaments d'actine (Lakkakorpi, 1996). Elle correspond à une région où la membrane plasmique est en contact avec l'os délimitant ainsi un compartiment clos entre la bordure en brosse et la surface osseuse. Le processus de résorption est réalisé dans ce compartiment appelé chambre de résorption (Holtrop, 1977) et s'effectue en deux étapes : la dissolution de

la matrice minérale précède la dégradation de la phase organique. Ainsi, l'acidification de la chambre de résorption (pH = 4,5) permet la déminéralisation de la matrice. Ce processus fait intervenir des pompes à protons ATP dépendantes. Le pH à l'intérieur de l'ostéoclaste est maintenu par un transport passif de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Enfin, l'électroneutralité est assurée par un canal chlore (Figure 8). Quand à la digestion de la trame organique, elle s'effectue sous l'action des enzymes protéolytiques (cathepsine K, collagénases, métalloprotéases telles que la MMP-9, ...) contenues dans les lysosomes notamment (Blair, 1986).

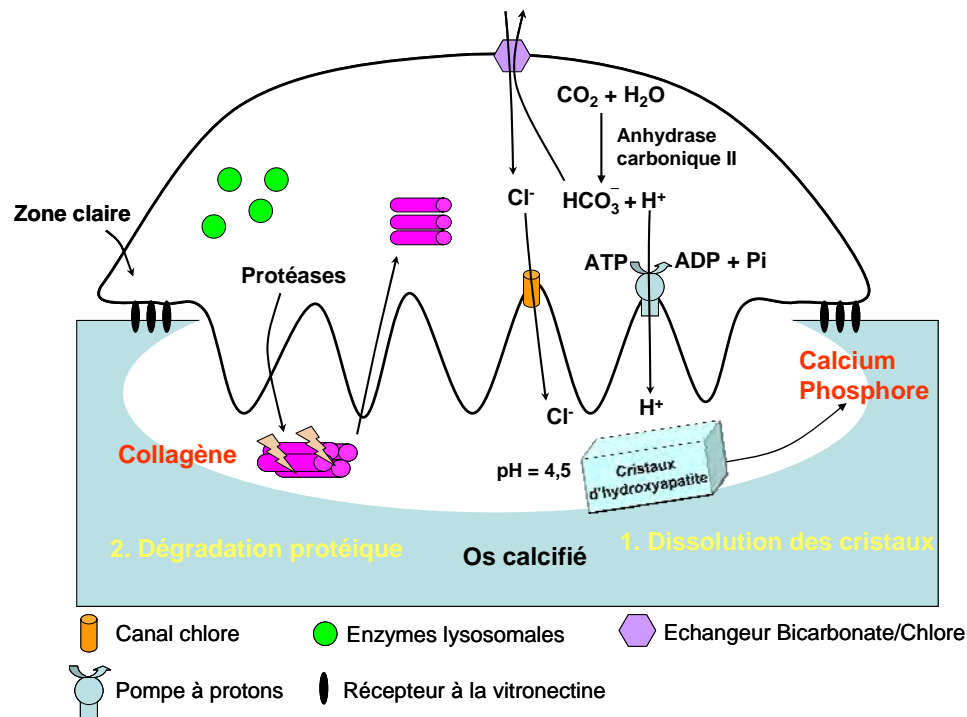


Figure 8 : Schéma d'un ostéoclaste actif (Rousselle, 2002).

C. LA MINÉRALISATION

La stabilité et l'organisation des fibrilles de collagène assurent la rigidité nécessaire au tissu osseux tout en assurant une certaine élasticité. Un rôle important de la trame collagénique osseuse est de se lier aux protéines non collagéniques et aux facteurs de croissance produits par l'ostéoblaste (Manolagas, 2000). La minéralisation se fait, dans un deuxième temps, au niveau du front de minéralisation, à la jonction entre tissu ostéoïde, c'est-à-dire la substance pré-osseuse non minéralisée, et tissu minéralisé. Les ostéoblastes, qui régulent la concentration locale en calcium et phosphate, sont impliqués dans l'initiation de la

minéralisation ainsi que dans la régulation de la propagation du minéral. Les espaces situés entre les fibres de collagène de type I alignées jouent un rôle important dans la minéralisation de la matrice osseuse puisqu'ils seraient le site de formation des cristaux d'hydroxyapatite associés avec les complexes collagène-protéines non collagéniques (Manolagas, 2000). En effet, certaines protéines telles que l'ostéocalcine et l'ostéonectine ont une forte affinité pour le calcium et pourraient contribuer à la minéralisation du collagène auquel elles sont associées (Hauschka, 1986).

Le processus de minéralisation du tissu osseux dépend, d'une part, de la présence d'une substance matricielle extracellulaire et, d'autre part, d'une concentration adéquate en minéraux. C'est un processus complexe faisant intervenir, à la partie basale des ostéoblastes, de petites vésicules provenant de la membrane plasmique des ostéoblastes, contenant une fraction de cytoplasme et nommées vésicules matricielles. Ces vésicules matricielles sont des réservoirs de phosphatases alcalines et d'ions, qui, déversées dans le milieu extracellulaire initieraient la minéralisation du tissu ostéoïde en favorisant les concentrations locales en ions calcium et phosphate (Toppets, 2004).

3) Interactions entre les cellules osseuses

En 1981, Rodan et Martin (Rodan, 1981) ont émis l'hypothèse selon laquelle la régulation de la résorption osseuse par les hormones ostéotropiques serait dépendante des ostéoblastes. Ils se basaient sur le fait que les ostéoclastes ne semblaient pas avoir de récepteurs à la parathormone (PTH), ni aux autres hormones ostéotropiques alors que les ostéoblastes possédaient de tels récepteurs. Cette hypothèse a cependant été récemment invalidée puisqu'il a été démontré que les ostéoclastes expriment un récepteur à la PTH (Dempster, 2005). Des expériences de co-cultures de cellules stromales/ostéoblastes et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont par ailleurs permis de mettre en évidence que les ostéoblastes sont nécessaires au développement des ostéoclastes et que les contacts cellule-cellule sont indispensables à leur différenciation et activation (Chambers, 1988; Takahashi, 1988). En effet, les ostéoblastes produisent deux facteurs nécessaires et suffisants pour l'ostéoclastogénèse : M-CSF et RANKL, cette dernière cytokine existant sous forme soluble et membranaire (Lacey, 1998; Yasuda, 1998). Ce contact cellule-cellule est également très important pour la fonction des ostéoclastes matures. En effet, si les cellules

ostéoblastiques et les ostéoclastes sont cultivés dans des chambres de culture séparées par une membrane, et que les contacts entre ces cellules sont ainsi bloqués, la formation des lacunes de résorption par les ostéoclastes est fortement diminuée (Jimi, 1996).

Les ostéoblastes/cellules stromales sont les cellules cibles des hormones ostéotropiques et cytokines (PTH, vitamine D3 (1 alpha, 25(OH)2-D3), IL-1, IL-6...), et contrôlent les processus de différenciation/activation ostéoclastiques (Collin, 1992 ; Suda, 1995). Ces hormones et cytokines agissent sur les ostéoblastes en induisant l'expression de RANKL (Horwood, 1998) qui va alors interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des précurseurs et des ostéoclastes matures et ainsi stimuler la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Hsu, 1999; Nakagawa, 1998). Les ostéoblastes jouent donc un rôle fondamental dans le recrutement et l'activité de résorption des ostéoclastes. De même, des expériences de co-culture de cellules de la lignée murine ostéocytaire MLOY4 et de cellules spléniques/cellules de moelle osseuse ont montré que les ostéocytes supportent la formation d'ostéoclastes en l'absence de vitamine D3 ou d'autres facteurs ostéotropiques exogènes. En effet, ces cellules sécrètent des quantités importantes de M-CSF et expriment RANKL à leur surface, en particulier le long de leurs prolongements cytoplasmiques. De plus, des milieux conditionnés de cellules MLOY4 ne sont pas capables d'induire la formation d'ostéoclastes indiquant que le contact cellulaire est nécessaire (Zhao, 2002). Cette capacité des ostéocytes à induire la différenciation ostéoclastique est réduite par les contraintes mécaniques puisque celles-ci inhibent la production de RANKL et augmentent la libération d'OPG (You, 2008), molécule anti-résorptive soluble sécrétée par l'ostéoblaste et jouant le rôle de récepteur leurre pour RANKL (Wittrant, 2004 ; Ando K, 2008 ; Brounais, 2008a). Cependant, la capacité des ostéocytes à établir des contacts directs avec les précurseurs ostéoclastiques *in vivo* n'a pas été démontrée.

Inversement, les ostéoclastes sont capables de contrôler la formation osseuse par les ostéoblastes. En effet, des milieux conditionnés d'ostéoclastes stimulent la migration cellulaire et la différenciation de CSM en cellules ostéoblastiques capables de former des nodules minéralisés *in vitro*. Cet effet dépend d'une augmentation de la production de la sphingosine kinase 1 qui catalyse la phosphorylation de la sphingosine 1 pour former la sphingosine 1 phosphate (S1P). Wnt10b et BMP6 sont également significativement induits dans les ostéoclastes matures et sont impliqués dans la différenciation des CSM en ostéoblastes. Ainsi, les ostéoclastes pourraient recruter les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à S1P et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP (Pederson, 2008).

4) Le remodelage osseux

Tout au long de la vie, l'os est le siège d'un remaniement permanent. Ce processus permet au tissu osseux de s'adapter aux différentes contraintes mécaniques, d'assurer l'homéostasie minérale et la cicatrisation des fractures. Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois et se déroule selon une chronologie bien précise : le remodelage osseux débute par une phase d'activation des ostéoclastes qui conduit à la résorption osseuse suivie d'une phase de transition qui aboutit au recrutement des cellules ostéoprogénitrices et à l'activation des ostéoblastes puis une phase d'inversion et enfin une phase de formation d'une nouvelle matrice osseuse (Hill, 1998) (Figure 9). A chaque instant, environ 5 % des surfaces intracorticales et 20 % des surfaces trabéculaires sont le siège d'un remodelage.

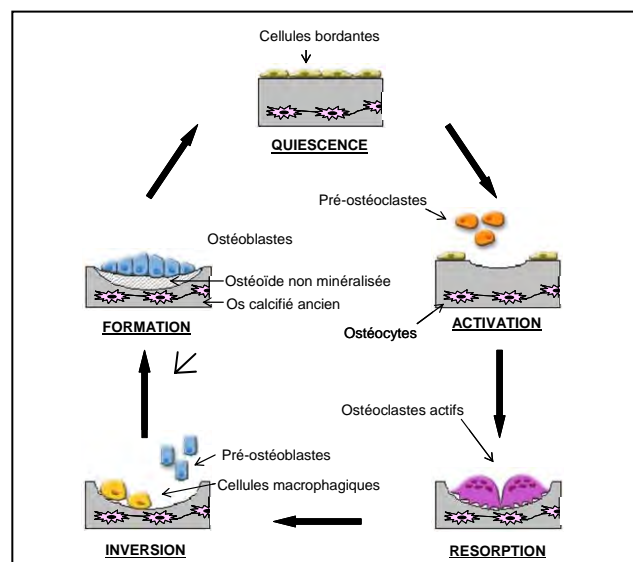


Figure 9 : Les différentes étapes du remodelage osseux.

→ Phase d'activation

La séquence du remodelage débute en un point d'une surface osseuse quiescente recouverte par les cellules bordantes. Le signal qui déclenche le remodelage osseux peut être de nature mécanique (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...)(Turner, 1998) ou hormonal (comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'estrogènes entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes)(Pacifci, 1998). La captation de ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. En effet, à l'état quiescent, la surface de la matrice

extracellulaire de l'os est recouverte par les cellules bordantes, qui empêchent l'accès de la matrice aux ostéoclastes. Ces cellules ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs ostéorésorbants tels que la PTH, les ostéoblastes se rétractent et laissent la place aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui peuvent adhérer à la matrice (Toppets, 2004).

→ Phase de résorption

Elle débute par l'activation des précurseurs ostéoclastiques présents dans la moelle osseuse au site de remodelage et conduit à leur différenciation en ostéoclastes matures et à leur attachement à la surface osseuse. Les ostéoblastes situés à proximité des pré-ostéoclastes vont favoriser la différenciation de ceux-ci en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines telles que RANKL.

Les cellules ostéoclastiques vont ensuite adhérer à la surface osseuse au niveau de la zone claire avec la constitution d'une zone de scellement conduisant à la polarisation de la cellule et à la formation de la bordure en brosse. Cette adhésion est possible par la présence de membranes spécialisées, comportant des intégrines ($\alpha 2\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$), de la taline et de la vinculine associées à des faisceaux d'actine. Une fois attachés à la matrice osseuse, les ostéoclastes créent un microenvironnement acide qui facilite la dissolution de la phase minérale de l'os, entraînant la libération de calcium et de phosphore, et favorise par différentes cascades d'activation les fonctions des enzymes protéolytiques (métalloprotéases et cathepsines) conduisant à la destruction de la matrice organique. La phase de résorption dure environ 30 jours.

→ Phase d'inversion

Le couplage entre résorption et formation intervient durant la phase de transition. La dégradation de la matrice entraîne une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes qui va provoquer une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste. Les ostéoclastes qui se détachent de la surface osseuse meurent par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu, 2003). Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune. Il a été suggéré que les facteurs favorisant la formation osseuse soient intégrés dans la matrice

osseuse puis relargués durant la phase de résorption. Cela concernerait en particulier les IGF, le FGF, le TGF β , les BMP et le PDGF (platelet derived growth factor)(Sims, 2008). La surface osseuse ainsi libérée par les ostéoclastes et correspondant au fond de la lacune de Howship est riche en éléments tels que l'ostéopontine qui activeraient les ostéoblastes. Les ostéoclastes pourraient également recruter directement les précurseurs ostéoblastiques au site de remodelage osseux grâce à S1P et BMP6 puis stimuler la formation osseuse en activant la voie Wnt/BMP (Pederson, 2008).

→ Phase de formation

Elle débute par la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui vont venir tapisser le fond de la lacune de Howship, au niveau de la ligne cémentante. Les ostéoblastes vont alors synthétiser les constituants de la matrice protéique osseuse. Puis, après un délai de 10 à 15 jours, le tissu ostéoïde se minéralise par l'apposition de cristaux d'hydroxyapatite dans les espaces interfibrillaires du collagène. Cette étape de minéralisation comporte une phase rapide appelée minéralisation primaire puis se poursuit plus lentement pendant une durée variable appelée minéralisation secondaire. La durée de la minéralisation secondaire est liée à la fréquence du remodelage. La phase d'ostéoformation dure de 4 à 5 mois.

→ Phase de quiescence

Une fois la phase de formation terminée, alors que certains ostéoblastes meurent par apoptose ou sont emmurés dans la matrice osseuse et deviennent des ostéocytes, d'autres sont convertis en cellules bordantes qui vont recouvrir la surface osseuse et demeurer quiescentes jusqu'à une prochaine activation locale des ostéoclastes.

B. L'ostéosarcome : une pathologie osseuse tumorale

1) Historique et définitions

Des cas d'ostéosarcomes ont été décrits sur des momies de l'Égypte ancienne datant de plus de 5000 ans (Capasso, 2005) avec la possibilité d'une intervention chirurgicale sous forme d'amputation. Un cas également bien documenté d'ostéosarcome, ayant le profil radiologique typique en « feu d'herbes », a été observé sur le fémur d'un jeune péruvien datant de 1100 après JC (Figure 10).

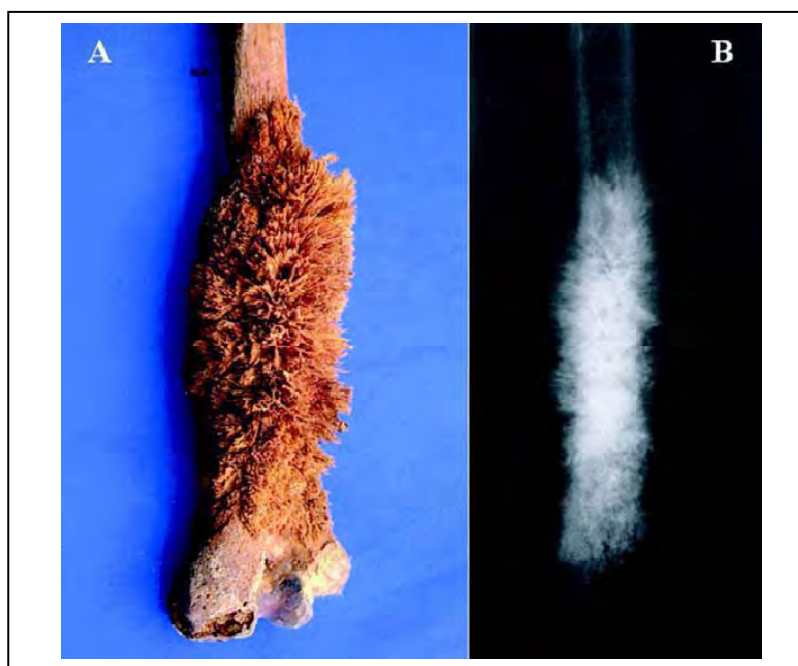


Figure 10 : A : Ostéosarcome du fémur chez un jeune péruvien datant de 1100 après JC (Capasso, 2005). B : profil radiologique typique en « feu d'herbes ».

L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales (Schajowicz, 1993) qui dérivent donc, de près ou de loin, de la lignée ostéoblastique. Trois groupes sont identifiés selon leur localisation : les ostéosarcomes **de surface**, les ostéosarcomes **intracorticaux** et les ostéosarcomes **centraux** de siège intramédullaire qui sont les plus fréquents. Les ostéosarcomes intracorticaux sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées. Les ostéosarcomes de surface sont généralement de bon pronostic, et les ostéosarcomes centraux 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 la forme commune, l'ostéosarcome télangiectasique, l'ostéosarcome à petites cellules rondes et l'ostéosarcome bien différencié intramédullaire (Guinebretière, 2001) :

- La **forme commune**, classée par Dahlin selon le contingent cellulaire prédominant, est de loin la plus fréquente (Unni, 1996). La variante ostéoblastique représente environ 50 % des cas, les variantes chondroblastique et fibroblastique 25 % chacune.

- La fréquence de l'ostéosarcome **télangiectasique** varie selon les séries entre 2 et 10 % (différences liées aux critères anatomo-radiologiques retenus). Des lésions purement lytiques et expansives sur la radiographie sont à l'origine de fréquentes fractures pathologiques. Son aspect lors de la biopsie et en macroscopie est celui d'une lésion multilobée à contenu hémorragique.

- L'ostéosarcome à **petites cellules rondes** a un aspect radiographique hétérogène. La tumeur est constituée de petites cellules tumorales aux noyaux arrondis, au cytoplasme peu abondant et aux limites imprécises, similaire au sarcome d'Ewing.

- l'ostéosarcome **bien différencié intramédullaire** est caractérisé par sa localisation intramédullaire, un envahissement des parties molles absent ou limité et son aspect histologique bien différencié.

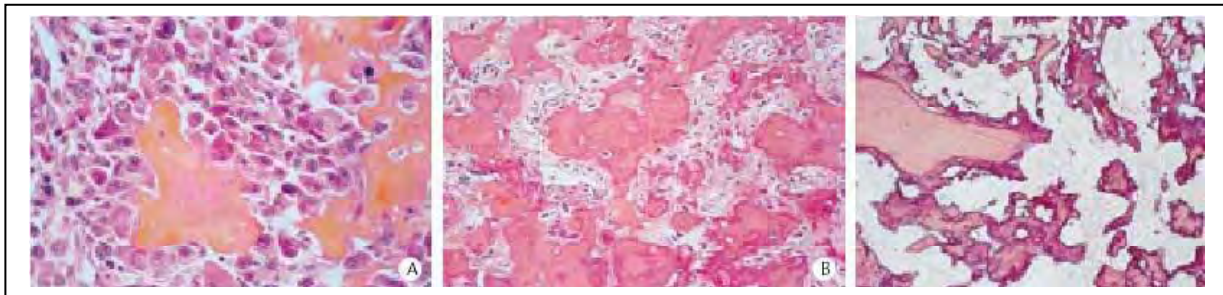


Figure 11 : Préparations histologiques d'un ostéosarcome

A : Aspect typique d'un ostéosarcome, constitué d'ostéoblastes tumoraux aux anomalies cytonucléaires marquées, aux mitoses nombreuses, élaborant une substance ostéoïde formant d'épaisses travées qu'elles entourent. Coloration hémalun-éosine-safran (HES), grossissement x 400.

B : Dans d'autres secteurs de la même tumeur, l'aspect diffère, associant de nombreuses travées osseuses de taille et de forme variables. Coloration HES, grossissement x 200.

C : Résection après chimiothérapie d'induction. Pour ce bon répondeur, les cellules tumorales ont disparu, remplacées par un tissu fibreux hyalin et des travées osseuses de disposition irrégulière. Une travée osseuse normale résiduelle, en partie résorbée, persiste (en haut et à gauche). Coloration HES, grossissement x200. (Guinebretière, 2001).

2) Physiopathologie et diagnostic

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs malignes primitives de l'os avec une incidence annuelle d'environ 4,8 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 20 ans aux USA (Linnet, 1999) et 3,6 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 15 ans en France (Desandes, 2004). L'ostéosarcome survient plus généralement sur une population jeune, avec une médiane d'âge de 18 ans, et touche 1,5 à 2 fois plus fréquemment les garçons que les filles. Il est rare avant 10 ans, exceptionnel avant 5 ans, mais aussi très rare après 60 ans où il survient généralement sur terrain prédisposé.

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs et l'incidence élevée des ostéosarcomes chez les chiens de grande taille suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue des ostéosarcomes (Guinebretière, 2001).

L'étiologie de l'ostéosarcome est à ce jour inconnue. Si de nombreuses théories ont été émises à partir de constatations expérimentales (origine virale, traumatique, chimique, etc.), aucune n'a été confirmée chez l'homme. Cependant, l'ostéosarcome se développe plus fréquemment chez des sujets de grande taille et à l'inverse, une plus faible incidence aurait été mise en évidence dans les populations asiatiques et latino-américaines (Guinebretière, 2001). L'ostéosarcome secondaire se rencontre chez l'adulte ayant préalablement développé une dysplasie fibreuse, une tumeur à cellules géantes, ou bien une maladie osseuse sous-jacente comme la maladie de Paget ou suite à une radiothérapie (Guinebretière, 2001). L'ostéosarcome est très rarement familial, cependant, quelques cas d'ostéosarcomes congénitaux ont été décrits (Lynch, 2003). Il survient dans un tableau de tumeurs multiples de différentes variétés histologiques et correspond à la présence d'un gène de prédisposition aux tumeurs (Hauben, 2003). On peut citer (i) le syndrome de Li-Fraumeni qui correspond à l'anomalie innée de l'un des allèles du gène p53, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses (os et tissus mous) que carcinomateuses ou (ii) le rétinoblastome bilatéral, maladie caractérisée par des tumeurs oculaires bilatérales et où les ostéosarcomes s'observent 100 fois plus fréquemment que dans la population normale (Chauveinc, 2001).

Les anomalies cytogénétiques observées dans les ostéosarcomes sont caractérisées par leur extrême fréquence et leur grande complexité (Figure 12). Il n'existe pas de lésion génétique spécifique reconnue, mais une fréquente atteinte des loci des gènes p53 (environ 50% des patients)(Sandberg, 2003) et Rb (gène du rétinoblastome) (environ 70% des patients) a été observée (Fuchs, 2002; Wadayama, 1994). Une étude réalisée sur une cohorte réduite de 29 patients atteints d'ostéosarcome a ainsi montré que 38% d'entre eux présentent une ou plusieurs altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S, et donc dans l'entrée dans le cycle cellulaire (Lopez-Guerrero, 2004). Il s'agit principalement de mutations du gène Rb, p53, et/ou de l'amplification des gènes MDM2 (inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline Dependante Kinase 4, nécessaire à la transition G1-S). Une sur-expression du proto-oncogène c-myc (contrôle de la prolifération/différenciation, adhérence et apoptose)(Sandberg, 2003) ainsi que du facteur de transcription Ap-1 (homo ou hétérodimère de c-Jun et c-Fos régulant des gènes essentiels pour la prolifération et la différenciation des ostéoblastes) a également été observée dans des ostéosarcomes (Papachristou, 2003). De plus, l'analyse des caryotypes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques et des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a conduit à l'identification d'aucune spécificité. La présence d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle de la transition G1-S a également pu être corrélée avec la survie des patients, puisque tous les patients présentant de telles altérations sont décédés durant le suivi, alors que plus de la moitié des autres patients étaient encore en vie à la fin de l'étude. De plus, un lien entre phénotype et génotype a été observé : aucune des mutations recherchées n'a été détectée dans les tumeurs de type ostéoblastique très différenciées qui sont de meilleur pronostic (Lopez-Guerrero, 2004). Plus récemment, une atteinte du locus du gène c-kit codant un récepteur tyrosine kinase avec un rôle central dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire, été mise en évidence dans les ostéosarcomes de haut grade. En effet, 39 % des patients inclus dans cette étude présentaient une altération de ce locus en corrélation avec une sur-expression de la protéine c-kit, conduisant à un mauvais pronostic vital (Entz-Werle, 2005a). Une étude réalisée sur la même cohorte de patients a révélé une altération du locus du gène TWIST, impliqué dans le développement embryonnaire, dans 45,6 % des cas, se traduisant chez la majorité des patients par une délétion au niveau de ce gène. De plus, ces altérations de TWIST ont pu être corrélées à une diminution de la survie (Entz-Werle, 2005b).

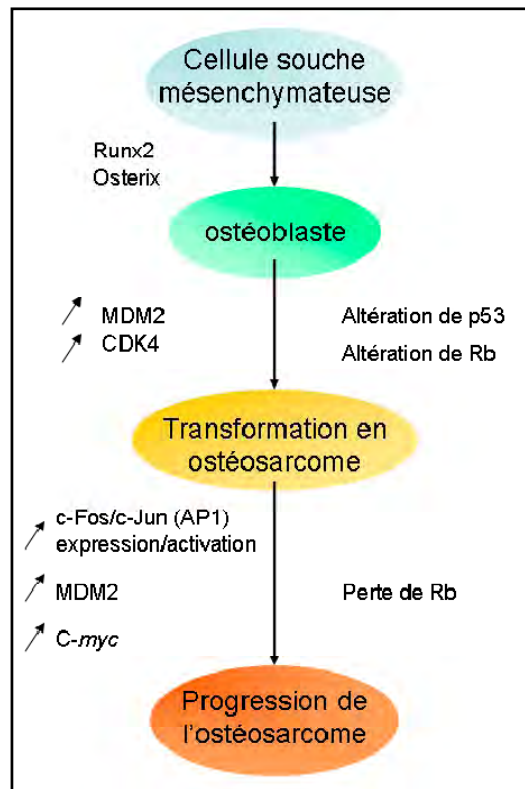


Figure 12 : Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement et la progression des ostéosarcomes.

La principale manifestation clinique de l'ostéosarcome 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, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse sont visibles. L'ostéosarcome peut toucher tous les os mais manifeste une prédilection pour la métaphyse des os longs. Moins de 10 % surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares (Figure 13). Il se localise surtout au 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 os plats et les os courts sont plus rarement touchés. Le crâne et la face sont atteints dans moins de 10 % des cas, préférentiellement à la voûte et la base du crâne, ainsi que la mandibule. Des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (Guinebretière, 2001).



*Figure 13 : Ostéosarcome d'un patient âgé de 15 ans, IRM : atteinte épiphysométaphysaire du tibia (**grande flèche**) avec skip métastase (métastase d'une tumeur primitive à distance sur le même os, espacée par un "saut") diaphysaire (**petites flèches**). (IGR Villejuif)*

Le développement d'un ostéosarcome entraîne, comme nous l'avons vu précédemment, la formation directe d'os ou de substance ostéoïde mais également, dans un certain nombre de cas, une ostéolyse maligne (Figure 14) qui résulte d'une hyperactivité ostéoclastique, consécutive à la sécrétion de cytokines d'origine tumorale, telles que l'IL-1, l'IL-6, les TNF α et β , la PTH-rP et des facteurs de croissance comme le TGF β (Kwan Tat, 2004).



*Figure 14 : Ostéosarcome d'un patient âgé de 15 ans
Radiographies sans préparation du tibia. Ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse tibiale supérieure (**flèches**), ostéolyse corticale (**tête de flèche**), Ostéogénèse dans les parties molles péri-osseuses (**petites flèches**). (IGR Villejuif)*

L'action de ces différents facteurs est soit directe sur les ostéoclastes soit indirecte, et dans ce cas, passe par l'activation des ostéoblastes et l'augmentation de production de RANKL. La résorption osseuse libère à son tour des facteurs de croissance (TGF β et IGF-1) piégés dans la matrice extracellulaire. Un cercle vicieux s'instaure alors entre résorption osseuse et prolifération tumorale dans lequel le TGF β et l'IGF-1 libérés de la matrice lors de l'hyper-résorption osseuse stimulent l'activité et la prolifération des cellules tumorales, qui à leur tour produisent des facteurs, qui vont activer la résorption osseuse, directement ou via les ostéoblastes (figure 15) (Brounais, 2008a).

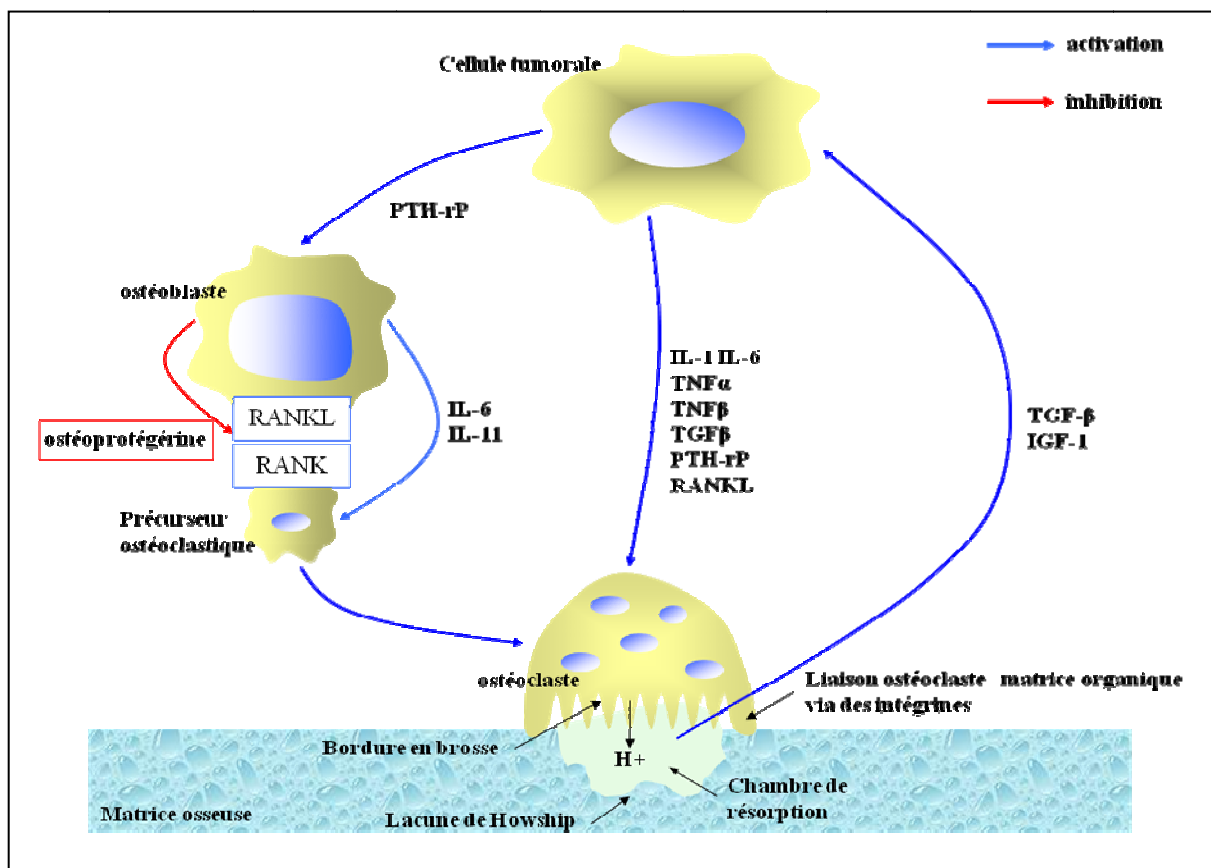


Figure 15 : Cercle vicieux entre prolifération tumorale et hyper-résorption osseuse d'origine maligne. D'après (Brounais, 2008a).

3) *Traitement multidisciplinaire*

Actuellement, la survie des patients atteints d'ostéosarcome a été considérablement augmentée grâce à la **polychimiothérapie**, qui repose sur des cures alternées combinant différents agents pharmacologiques.

Les protocoles thérapeutiques actuels correspondent à la succession d'une **chimiothérapie d'induction, chirurgie et chimiothérapie adjuvante**. La réduction tumorale qu'elle induit rend possible la préservation du membre au moyen de techniques de chirurgie conservatrice, tout en assurant une résection carcinologiquement satisfaisante (Philip, 2000). La chimiothérapie postopératoire est adaptée en fonction de la qualité de la réponse histologique à la chimiothérapie préopératoire. Ce paramètre pronostique essentiel est exprimé généralement en pourcentage de cellules vivantes résiduelles au sein de la tumeur primitive, par exemple chez un bon répondeur, moins de 10 % de cellules tumorales résiduelles sont retrouvées. Cette prise en charge permet aujourd'hui d'obtenir des **taux de survie à 5 ans variant entre 50 et 70 %** selon les séries (Alapetite, 2001 ; Guinebretière, 2001).

La radiothérapie, quant à elle, n'est que rarement utilisée du fait de la radiorésistance de ce type de tumeur.

L'objectif de la chimiothérapie cytotoxique administrée par voie générale est de détruire la tumeur en place mais également d'inhiber le phénomène métastatique. La majorité des tumeurs osseuses malignes sont diagnostiquées en phase localisée. La chimiothérapie en phase localisée de la maladie permet un traitement précoce de la maladie micrométastatique, qui peut être ultérieurement responsable de la rechute et du décès du patient ; une réduction de la taille de la tumeur facilitant le geste du chirurgien et par conséquent une chirurgie de conservation du membre (Alapetite, 2001). Lorsque des métastases pulmonaires sont détectées au moment du diagnostic, le traitement est identique à celui des formes localisées en matière de chimiothérapie et de chirurgie de la tumeur. Après celle-ci, une exérèse chirurgicale des lésions pulmonaires est proposée dans la mesure où elle est techniquement réalisable ; c'est la seule façon d'obtenir des rémissions à long terme dans ces formes à très mauvais pronostic, puisque le taux de survie à 5 ans n'est alors que de 30%.

Les quatre molécules les plus utilisées (plus de 20 % de réponse en monothérapie) dans le traitement des ostéosarcomes sont le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cisplatine et l'ifosfamide (Bacci, 2003).

- Le **méthotrexate** (utilisé chez les jeunes patients) est un agent cytotoxique anti-métabolite qui agit en inhibant une enzyme-clé de la synthèse de la thymidine, la dihydrofolate réductase. Après l'injection de méthotrexate à doses élevées (supérieures à 100 mg/m²), il est nécessaire d'administrer l'antidote de ce médicament qui est l'acide folinique, afin de prévenir les principaux effets secondaires qui sont la toxicité rénale et neurologique centrale (Blackwell, 1995).

- La **doxorubicine** est un agent cytotoxique considéré initialement comme un agent intercalant, qui agit également en inhibant des enzymes impliquées dans le déenroulement de l'ADN, les topo-isomérases de type II. Les principaux effets secondaires immédiats de ce médicament sont la toxicité hématologique et la toxicité muqueuse, cette toxicité dépendant de la dose et du schéma d'administration (Link, 1986 ; Kalifa, 2006).

- Le **cisplatine** est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de «ponts inter- et intrabrans» dans les chaînes d'ADN. Ce médicament est généralement administré sur un mode séquentiel avec une dose par cure de 80 à 120 mg/m². Les principaux effets secondaires de ce médicament sont la toxicité hématologique, la toxicité néphrologique, une toxicité neurologique périphérique et auditive. Cette toxicité impose l'administration d'une hyperhydratation saline pendant l'administration du cisplatine (Cvitkovic, 1993).

- L'**ifosfamide** est un agent cytotoxique alkylant qui agit en induisant la formation de ponts interbrins en se fixant sur le N7 des guanines. Ce médicament est généralement administré sur un mode séquentiel. Les principaux effets secondaires de ce médicament sont la toxicité hématologique, l'alopécie, la toxicité neurologique, la toxicité néphrologique et la toxicité vésicale (Cvitkovic, 1993). Cette dernière toxicité impose l'administration conjointe de mesna, un uroprotecteur, et d'une hyperhydratation alcaline. Le cyclophosphamide a également été utilisé dans les programmes de chimiothérapie adjuvante, et de phase II pour les ostéosarcomes. Le taux de réponse en monothérapie est cependant faible et l'efficacité du protocole est discutée (Mosende, 1977).

Le traitement actuel, basé sur une polychimiothérapie néo-adjuvante souvent mal tolérée associée à une chirurgie conservatrice, a largement contribué à l'amélioration du taux de survie des patients dans ces dernières années. Cependant, une absence de réponse aux drogues anti-tumorales peut être observée et demeure un problème majeur conduisant au développement de métastases puis au décès du patient. De plus, les effets indésirables de la chimiothérapie comme la perte des cheveux ou la stérilité par exemple sont difficilement acceptés par les adolescents et jeunes adultes. Les hospitalisations et les interventions chirurgicales répétées (par exemple pour changement de prothèse tous les 10-15 ans) dégradent la qualité de vie du patient.

4) Nouvelles approches thérapeutiques

La découverte de **nouvelles approches thérapeutiques** dans l'optique d'améliorer l'efficacité, la survie, la qualité de vie du patient et de développer un traitement simple, non douloureux, en réduisant au maximum les effets indésirables est donc toujours d'actualité pour l'ostéosarcome.

Le laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (LPRO, INSERM UMR957) étudie depuis plusieurs années les ostéolyses associées aux tumeurs osseuses primitives. Notre équipe a montré que la résorption osseuse qui est exacerbée lors du développement des tumeurs osseuses primitives était une véritable cible thérapeutique, ce qui a conduit au développement de bithérapies anti-tumorale et anti-résorption, en utilisant des modèles murins originaux (Lamoureux, 2007a).

Cette ostéolyse a été bloquée :

*soit par une molécule chimique l'acide zolédronique, appartenant à la famille des bisphosphonates (Gouin, 2006)

*soit par expression génique de récepteurs qui bloquent le ligand du Récepteur Activateur du facteur nucléaire kappaB ou Tumor Necrosis Factor Superfamily member 11 (cytokine RANKL ou TNFSF11) qui est responsable de l'activation des ostéoclastes, seules cellules capables de dégrader l'os (Lamoureux, 2007b ; Lamoureux, 2008)

Les études pré-cliniques associant l'acide zolédronique à un agent de chimiothérapie, l'ifosfamide ont permis d'obtenir des résultats très encourageants pour l'amélioration des traitements des ostéosarcomes et ont constitué le rationnel de l'essai clinique SARCOMÉ2009. Cet essai clinique multicentrique de phase 3 (protocole OS2006) a pour but de tester de façon randomisée l'impact sur la survie sans événement à 3 ans de l'adjonction de Zometa[®] (Novartis) au traitement de référence associant chimiothérapie (HDMTX, API-AI, VP16) et chirurgie pour des ostéosarcomes de l'adulte et de l'enfant. Ce protocole prévoit l'inclusion de 470 patients sur 6 ans, avec un suivi de 3 ans. L'investigateur principal est l'Institut Gustave Roussy (Dr Brugières). Le service d'orthopédie du CHU de Nantes (Pr Gouin) ainsi que le laboratoire de physiopathologie de la résorption osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives (Pr Heymann) sont associés à ce protocole respectivement comme centre recruteur et centre d'analyse des paramètres du remodelage osseux, avec la Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE) et le Groupe Sarcome Français-Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses (GSF-GETO).

Des expériences de thérapie génique ont été menées pour tester *in vivo* le potentiel thérapeutique de molécules inhibitrices de RANKL : l'ostéoprotégérine (OPG) ou une forme soluble de son récepteur membranaire (RANK-Fc). Pour le transfert de gènes, différentes stratégies ont été utilisées : des adénovirus, des vecteurs synthétiques et l'électrotransfert. La surexpression des protéines anti-résorption, OPG et RANK-Fc a permis de bloquer le développement des ostéosarcomes induits chez des rats et des souris. La surexpression de la protéine anti-tumorale TRAIL (Tumor Related Apoptosis Inducing Ligand) permet également une inhibition du développement des ostéosarcomes *in vivo* en se fixant à son récepteur de mort cellulaire programmée sur les cellules tumorales (Picarda, 2010).

5) Place de la chirurgie plastique

Le service de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique du CHU de Nantes participe également à la prise en charge multidisciplinaire des tumeurs osseuses primitives, principalement pour deux problématiques liées à cette pathologie :

A. LA RECONSTRUCTION OSSEUSE LORS DE L'EXERESE DE LA TUMEUR

L'os est le tissu humain le plus greffé. La greffe osseuse est une des plus anciennes greffes de tissus. A titre anecdotique, retenons l'exploit des Saints Côme et Damien, patrons des chirurgiens, qui ont réalisé la première allogreffe de jambe au 5ème siècle après JC.

Van Meekeren (Amsterdam, 1668) relate une autre anecdote : celle d'un soldat russe chez qui on aurait reconstruit partiellement le crâne avec celui d'un chien (xénogreffe). Menacé d'excommunication par l'Eglise, il demanda son ablation et mourut peu après mais dans l'Eglise.

La première autogreffe est attribuée à von Walther en 1820.

La première allogreffe est réalisée chez un enfant par McEwen à Glasgow en 1879, et chez un adulte par Poncet à Paris en 1887.

La première xénogreffe (bovin) est attribuée à Percy, chirurgien militaire vers 1800.

La popularisation de l'autogreffe est due à un chirurgien américain, Albée qui publia un livre sur les techniques d'autogreffe osseuse en 1915.

La chirurgie reconstructrice de l'appareil locomoteur se situe au carrefour des chirurgies plastique, orthopédique, vasculaire et des nerfs périphériques. Elle a nettement amélioré au cours des vingt dernières années le pronostic fonctionnel des lésions complexes des parties molles et des os au niveau des membres. Après une tumeur maligne, comme après un traumatisme grave ou certaines infections, il faut parfois suturer, fixer ou réparer des vaisseaux, des nerfs, des muscles, les os et/ou la peau, de façon à obtenir une restitution aussi anatomique que possible des tissus.

La reconstruction d'un os fonctionnel dans ces grandes pertes de substance osseuse constitue un véritable challenge thérapeutique.

→ Techniques chirurgicales disponibles en pratique clinique courante :

***les autogreffes osseuses**

Il est nécessaire de bien différencier autogreffe non vascularisée (os spongieux, os cortical) et autogreffe vascularisée (technique de Masquelet (Masquelet, 2000), lambeau libre avec composante osseuse (péroné, dentelé antérieur avec côte) (Belt, 2005 ; Duteille, 2005 ; Petersen, 2010)).

Les autogreffes spongieuses constituent toujours le matériau de référence, car elles apportent les cellules progénitrices et un support. Les autogreffes corticales présentent beaucoup moins d'intérêt car, si elles fournissent un support, elles n'entraînent pas d'ostéoinduction et ne sont incorporées que très lentement.

La technique de Masquelet consiste à greffer temporairement au niveau de la perte osseuse un cylindre de ciment orthopédique qui va provoquer une réaction inflammatoire. En réponse à cette agression, l'organisme va former une membrane autour du cylindre de ciment. Dans un second temps, le ciment est retiré et la membrane périphérique est remplie avec de l'os spongieux prélevé au niveau des crêtes iliaques.

Actuellement, dans les situations cliniques difficiles, la technique de référence en chirurgie reconstructrice osseuse est l'utilisation d'autogreffe vascularisée. Cependant, cette solution n'est pas toujours possible. De plus, le prélèvement ne peut se faire qu'en quantité limitée et engendre une morbidité non négligeable.

Dans notre équipe, l'autogreffe vascularisée par lambeau libre avec composante osseuse reste la technique de choix quand elle est possible.

***les allogreffes osseuses**

Les allogreffes massives sont des os complets (bassin, fémur, tibia) prélevés sur des donneurs multi-organes (Lobo Gajiwala, 2003). En France, seules quelques équipes assurent le prélèvement et l'implantation de ces allogreffes massives dont la mise en place impose des mesures d'asepsie maximale (scaphandre opératoire...). Le stockage d'attente des allogreffes est assuré par les « Banques d'Os » travaillant en parfaite transparence et traçabilité en collaboration avec l'« Etablissement Français des Greffes ». L'avenir des allogreffes d'os passe par leur association à des techniques accélérant leur intégration et leur consolidation.

Quelques équipes de recherche travaillent ainsi sur l'association des allogreffes avec des substituts osseux de synthèse ou des facteurs biologiques de croissance osseuse.

Dans certains cas, l'association de ces allogreffes à un lambeau libre avec composante osseuse est la seule solution pour reconstruire des pertes de substance osseuses complexes très étendues.

→ Techniques alternatives en cours d'évaluation (cf Chapitre II.C.2)c)):

***les biomatériaux**

***les facteurs de croissance**

***les cellules.**

Chacune de ces approches, seule ou en association, a probablement sa place en chirurgie reconstructrice osseuse.

Les progrès réalisés au cours des quinze dernières années dans le domaine de la microchirurgie ont permis de réduire considérablement le recours aux amputations dans les tumeurs osseuses malignes et ouvert la voie à la chirurgie dite "conservatrice". Un ostéosarcome doit être extrait en monobloc avec tous les tissus des parties molles avoisinantes. L'énorme perte de substance osseuse qui en résulte doit ensuite être comblée par exemple par un transfert libre de fibula vascularisé lorsque l'articulation de voisinage peut être conservée. La fibula transférée va s'intégrer grâce au rétablissement de la circulation sanguine et adopter les caractéristiques que présentait l'os d'origine à cet endroit. La chirurgie à visée conservatrice des membres n'est malheureusement pas toujours possible et il n'y a alors pas d'autre solution que l'amputation.

Voici le cas clinique d'une enfant de 11 ans sans antécédents particuliers, adressée en consultation d'orthopédie pour une "gêne" mal étiquetée localisée sous le genou droit.

La radiographie standard et l'imagerie par résonance magnétique retrouvent une masse ostéolytique au niveau du ¼ supérieur du tibia droit (Figure 16).

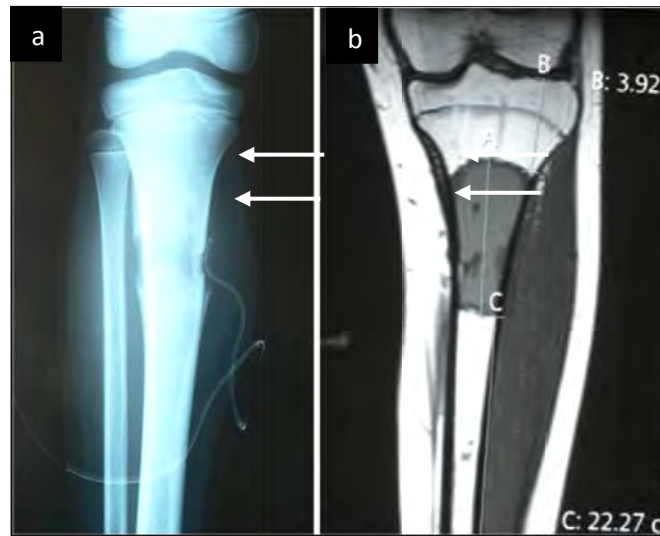


Figure 16 : Bilan radiologique d'un ostéosarcome d'une patiente âgée de 11 ans
 a. Radiographies sans préparation du tibia : ostéocondensations hétérogènes de la métaphyse et de l'épiphyse tibiale supérieure, ostéolyse corticale et ostéogénèse dans les parties molles
 b. Imagerie par Résonance Magnétique : atteinte métaphysaire du tibia

La biopsie confirme le diagnostic d'ostéosarcome. Après chimiothérapie première, la patiente est opérée conjointement avec les chirurgiens orthopédistes infantiles et les chirurgiens plasticiens. Une résection tibiale de 8 cm de hauteur est réalisée. La perte de substance osseuse est reconstruite par un lambeau de fibula controlatérale bifoliée (Figure 17).

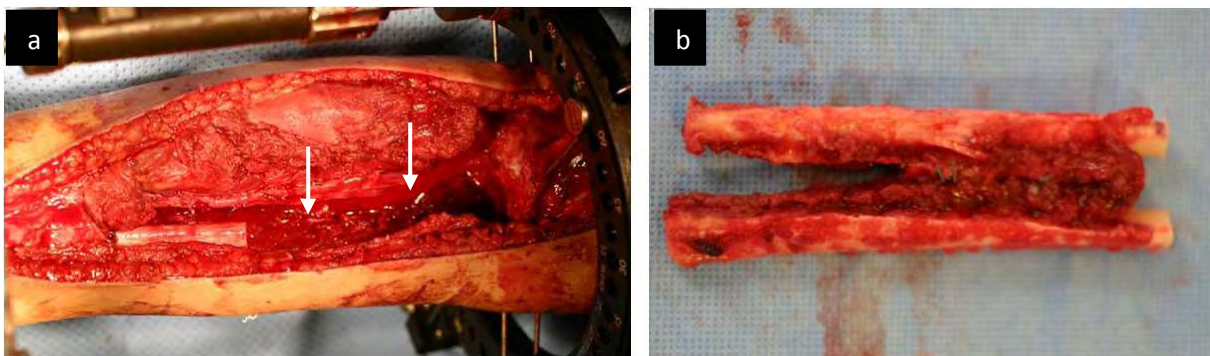


Figure 17 : Prise en charge chirurgicale d'un ostéosarcome d'une patiente âgée de 11 ans
 a. Perte de substance osseuse après résection tibiale de 8 cm
 b. Prélèvement d'un lambeau osseux pur de fibula controlatérale bifoliée

Le greffon est encastré et stabilisé par un fixateur externe. La fibula est ensuite revascularisée par une anastomose termino-terminale sur les vaisseaux tibiaux antérieurs.

L'évolution à distance est favorable avec ablation du fixateur externe à 10 mois après une consolidation obtenue (Figure 18). A 3 ans de recul, la patiente est en rémission complète avec une marche normale.



Figure 18 : Consolidation osseuse à 1 an de recul de la reconstruction par fibula bifoliée

B. LES SEQUELLES ESTHETIQUES ET FONCTIONNELLES DE LA CHIRURGIE D'EXERESE

Plusieurs types de séquelles peuvent apparaître après une chirurgie de l'ostéosarcome : une cicatrice pathologique, une perte de galbe des parties molles suite à l'ablation de la tumeur, un problème d'appareillage sur un moignon d'amputation (Figure 19). Il est parfois difficile pour le patient d'accepter sa nouvelle apparence. De nouvelles opérations peuvent être proposées au patient en fonction de ses souhaits et de ses motivations. De nombreuses techniques de chirurgie plastique permettent une amélioration fonctionnelle et/ou esthétique de la rançon cicatricielle secondaire au geste d'exérèse. Cependant, il faut généralement attendre plusieurs années avant que ces opérations de chirurgie plastique puissent être envisagées.

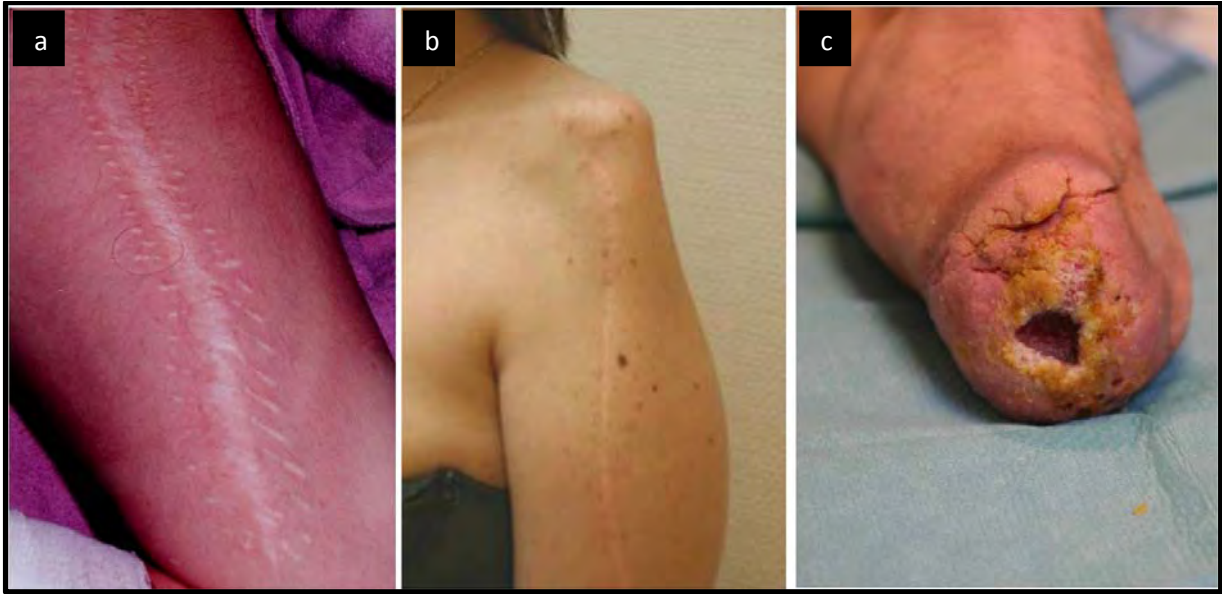


Figure 19 : Séquelles esthétiques et fonctionnelles à distance de la chirurgie d'exérèse
a. Cicatrice pathologique
b. Perte de galbe des parties molles
c. Problème d'appareillage sur moignon d'amputation (plaie chronique)

La chirurgie reconstructrice constitue donc, grâce à la combinaison des connaissances de plusieurs spécialités chirurgicales, un complément précieux et indispensable à la chirurgie orthopédique proprement dite.

II. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

A. Les cellules souches

1. Caractéristiques

Les cellules souches sont des cellules immatures définies et caractérisées par deux propriétés spécifiques (Hall, 1989) :

- leur capacité d'**autorenouvellement**,
c'est-à-dire leur capacité à se diviser à l'identique pendant de très longues périodes. Cette propriété permet ainsi le maintien d'un stock stable et permanent de cellules souches rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire (Smith, 2006)

- leur degré de **plasticité** important,
c'est-à-dire leur pouvoir de différenciation en cellules matures, spécialisées et fonctionnelles constituant le tissu hôte. Elles peuvent ainsi acquérir les caractéristiques de différentes lignées cellulaires suivant l'environnement dans lequel elles se trouvent (Smith, 2006).

Ces deux propriétés font des cellules souches des éléments indispensables à l'organisme puisqu'elles assurent le renouvellement des tissus en remplaçant des cellules mortes par apoptose ou après une lésion. Elles permettent ainsi aux organes de continuer à fonctionner de façon normale pendant toute la vie de l'organisme.

2. Classification

Il est possible de classer les cellules souches suivant leur potentiel de différenciation ou suivant leur origine.

A. SUIVANT LEUR POTENTIEL DE DIFFERENCIATION

On peut mettre en évidence quatre types de cellules souches : les cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes et les cellules souches unipotentes (Smith, 2006) (Figure 20) :

****LES CELLULES SOUCHES TOTIPOTENTES :***

Il s'agit des blastomères, cellules provenant des premières divisions de l'œuf fécondé ou zygote. Les blastomères sont dit totipotents car ils sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme (issues des trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme) ainsi que des annexes extra-embryonnaires (placenta, membranes). De ce fait, la cellule souche totipotente peut conduire seule au développement d'un organisme entier.

****LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES***

Ce sont les cellules souches embryonnaires. Elles proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste et constituent le bouton embryonnaire alors que la couche cellulaire externe, le trophoctoderme, contribue à la formation du placenta. De ce fait et contrairement aux cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes peuvent générer toutes les lignées cellulaires constituant un individu hormis les annexes embryonnaires et ne peuvent donc pas conduire à la formation d'un organisme entier.

****LES CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES***

Il s'agit des cellules souches foetales, de nouveaux-nés ou adultes. Ces cellules sont déjà engagées dans des voies de différenciation mais gardent la capacité de s'autorenouveler. En effet, les cellules souches multipotentes ne sont pas totalement immatures, on dit qu'elles sont « déterminées » pour donner différents types de cellules différenciées et fonctionnelles. Leur plasticité (ou pouvoir de différenciation) est donc plus limitée que celle des cellules souches embryonnaires. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques qui peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) mais qui ne peuvent pas se différencier naturellement en cellules nerveuses par exemple.

***LES CELLULES SOUCHES UNIPOTENTES**

Ces cellules ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire tout en s'autorenouvelant. C'est le cas notamment des cellules souches de la peau, de la muqueuse intestinale et du foie. En effet, ces cellules ont déjà acquis un certain degré de spécialisation durant leur division et sont fonctionnelles.

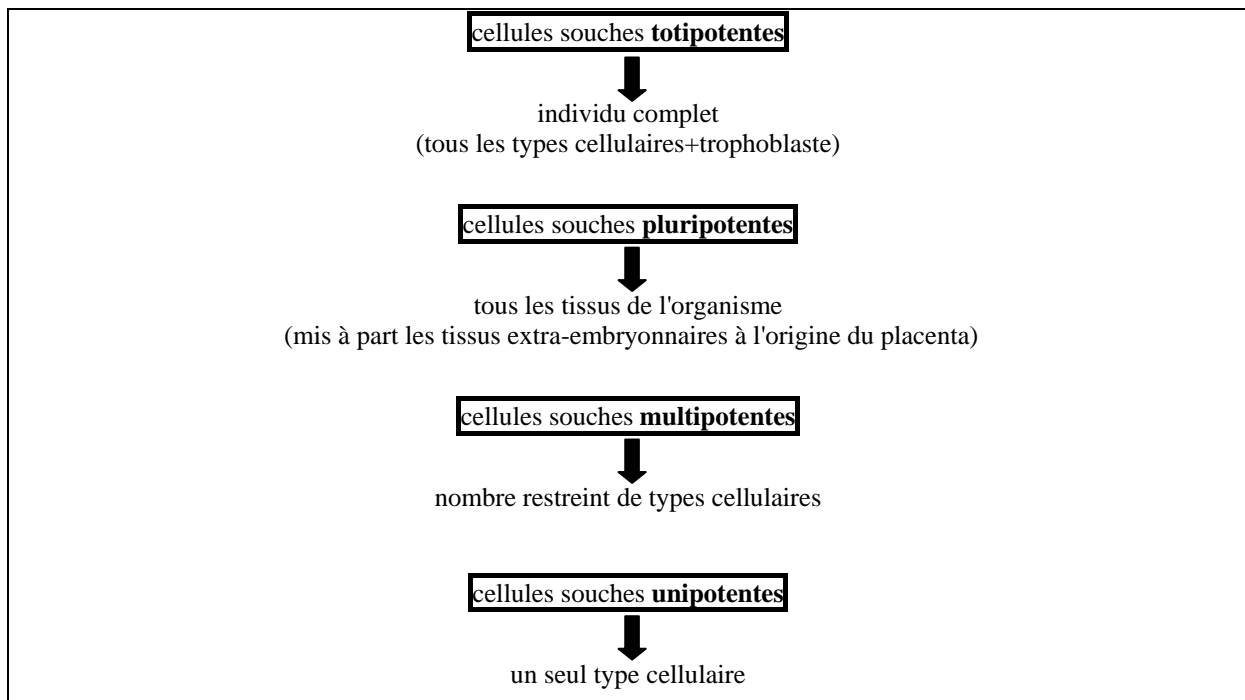


Figure 20 : Classification des cellules souches selon leur degré de différenciation

B. SUIVANT LEUR ORIGINE

On peut mettre en évidence trois types de cellules souches : elles peuvent provenir de l'embryon (cellules souches embryonnaires), du fœtus (cellules souches fœtales) ou de l'organisme adulte (cellules souches adultes). De ce fait, ces cellules ne possèdent pas le même pouvoir de différenciation et leur utilisation dans la réparation tissulaire repose sur la capacité à les isoler, les amplifier et les manipuler ainsi que sur leur degré de plasticité :

****LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES***

Elles sont appelées cellules ES (pour Embryonic Stem cells). Ce sont des cellules souches pluripotentes issues de la masse interne du blastocyste. Elles sont capables de donner l'ensemble des cellules présentes chez l'adulte tout en gardant leur capacité d'autorenouvellement (Biswas, 2007 ; Thomson, 1998). Rapidement après leur isolement (Martin, 1981), des études ont été développées visant à étudier la croissance et la différenciation de ces cellules. Elles ont pu être différenciées en cellules provenant des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et notamment en ostéoblastes, cardiomyocytes, neurones, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules pancréatiques et progéniteurs hématopoïétiques (Duplomb, 2007 ; Nury, 2009 ; Blancas, 2008 ; Levenberg, 2007 ; Lu, 2007 ; D'Amour, 2006 ; Roy, 2006 ; Carpenter, 2003 ; Guan, 1999).

Les cellules souches embryonnaires présentent donc un intérêt pour leur utilisation en médecine régénérative et notamment dans le traitement des pathologies osseuses, cardiaques, neuronales, hépatiques, sanguines et du diabète de type I. Cependant, l'utilisation expérimentale et le transfert en clinique de ces cellules posent plusieurs problèmes (Puceat, 2007). Le premier, d'ordre éthique, est celui de l'utilisation d'embryons humains dans la recherche expérimentale (McLaren, 2001). Le deuxième problème majeur de ces cellules est lié à leur fort pouvoir mitogène et tumorigène. L'équipe de Yamamoto, notamment, a mis en évidence la formation de tératomes après la greffe de ces cellules dans le péritoine de souris Nude (Yamamoto, 2006). Finalement, bien que certains travaux ne l'indiquent pas, la greffe de cellules souches embryonnaires est contraignante puisqu'elle requiert un traitement immunosuppresseur.

****LES CELLULES SOUCHES FOETALES***

Ce sont des cellules souches multipotentes présentant un fort pouvoir de prolifération et pouvant être isolées aussi bien à partir du sang foetal et de la moelle osseuse qu'à partir d'autres tissus foetaux comme le foie ou les reins (O'Donoghue, 2004). Parmi ces cellules, on distingue des cellules souches somatiques et des cellules souches germinales dites EG (pour Embryonic Germ cells). Contrairement aux cellules embryonnaires, ces cellules sont déjà engagées vers un type cellulaire particulier. Cependant, même si leur utilisation en médecine régénérative semble prometteuse, elles posent, au même titre que les cellules souches embryonnaires, certains problèmes éthiques mais aussi de sécurité en raison de leur pouvoir tumorigène et immunogène.

***LES CELLULES SOUCHES ADULTES**

Ce sont des cellules souches multipotentes présentes au sein des tissus adultes majoritairement composés de cellules différenciées. Même si leur capacité de différenciation est plus restreinte que celle des cellules souches embryonnaires ou foetales, les cellules souches adultes présentent de nombreux avantages : elles peuvent provenir du patient lui-même évitant ainsi les rejets d'ordre immunologique (greffe autologue), leur utilisation génère moins de problèmes éthiques et elles ont déjà donné de nombreux résultats pré-cliniques ou cliniques très concluants.

*Le terme de «cellule souche» est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de se multiplier (capacité de **prolifération**) et de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques du tissu (capacité de **différenciation**).*

*Les cellules souches adultes sont, pour leur part, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité et même si certaines d'entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de plusieurs tissus distincts (**multipotentes**), elles ne sont pas comme leurs homologues embryonnaires, **pluripotentes**.*

B. Les cellules souches adultes

1) Caractéristiques

Dans l'espèce humaine, on estime qu'un adulte est composé de dix trillions de cellules ($10 \cdot 10^{18}$). Les cellules contribuant à la structure-fonction des tissus et organes sont différenciées en 411 types cellulaires selon une estimation récente (Vickaryous, 2006).

Ces cellules différenciées pour la plupart ne se divisent plus. Toutefois, pour remplacer ces cellules spécialisées qui disparaissent à cause du vieillissement ou de lésions, on estime qu'à chaque seconde plus de vingt millions de divisions cellulaires sont nécessaires.

Les cellules souches adultes peuvent être extraites de la plupart des tissus : la cornée (Yoshida, 2006), la rétine (Tropepe, 2000), le foie (Walkup, 2006), le pancréas (Choi, 2004), la pulpe dentaire (Gronthos, 2000), le rein (Sagrinati, 2006), le tissu adipeux (Gimble, 2007 ; Sengenès, 2005), le cordon ombilical (Prat-Vidal, 2007 ; Jeong, 2005 ; Lee, 2004), mais également le cerveau (Kukekov, 1999 ; Westerlund, 2003 ; Steindler, 2002) et le cœur (Laugwitz, 2005 ; Dawn, 2005 ; Oyama, 2007), organes longtemps considérés comme définitivement «post-mitotiques» et donc réfractaires à toute régénération.

Ce sont des cellules moins fréquentes par rapport aux cellules différenciées, bien que plus abondantes dans certains tissus. On estime par exemple dans la rétine la fréquence des cellules souches à 1 pour 500 autres cellules (Coles, 2004), et dans la moelle osseuse la fréquence des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Micklethorp, 1987 ; Abkowitz, 2000) et des CSM (Jaiswal, 1997 ; Pittenger, 1999) à 1 cellule souche pour 10^5 autres cellules. Ces fréquences varient sensiblement en fonction des donneurs, mais également en fonction de l'âge avec une possible raréfaction au cours de la vie.

2) *Homéostasie tissulaire*

La **prolifération**, la **différenciation** et la **migration** cellulaires sont trois mécanismes qui permettent de conserver l'homéostasie d'un tissu adulte, c'est à dire le maintien de l'intégrité physiologique des tissus. Ces trois processus cellulaires assurent le remplacement des cellules mortes par apoptose ou par nécrose (après une lésion) et préservent ainsi la fonction de l'organe. Cependant il faut distinguer deux types de tissus : les tissus à renouvellement rapide et les tissus quiescents à renouvellement lent. Il existe dans l'organisme plusieurs tissus à renouvellement rapide, il s'agit des épithélia (comme l'épithélium de la peau ou de l'intestin) et du tissu sanguin. La présence de ces tissus, renouvelés très fréquemment (1 à 2 fois/mois), fournit la preuve de l'existence de cellules souches «actives» qui fonctionnent en permanence pour renouveler l'ensemble des cellules résidentes mortes au cours de la vie d'un individu. Dans les tissus à renouvellement plus lent, tels que les os, les muscles ou le foie, des cellules souches de «réserve» sont également présentes mais elles ne s'activent que lors de lésions tissulaires.

Ces cellules qui permettent ainsi le renouvellement rapide ou lent des tissus de l'organisme adulte et assurent ainsi cette fonction de renouvellement des cellules différenciées sont appelées **cellules souches adultes**. Pour pouvoir assurer ce rôle, ces cellules sont capables, d'une part de se multiplier à l'identique pour assurer un stock permanent de cellules souches dans l'organisme et d'autre part de s'engager dans des voies de différenciation leur permettant d'acquérir les caractéristiques phénotypiques du tissu à réparer.

3) *Activité paracrine*

Plusieurs travaux indiquent que les effets bénéfiques des cellules souches adultes sur la réparation tissulaire seraient dus à leur activité paracrine. En effet, il a été montré que ces cellules produisent et sécrètent de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines.

Une liste de ces facteurs et de leurs effets tissulaires a d'ailleurs été publiée en 2008 par l'équipe de Gnechi (Figure 21).

Facteurs sécrétés	Abréviations	Fonctions proposées
Adrenomedullin	ADM	Cytoprotection
Angio-associated migratory protein	AAMP	Angiogenèse
Angiogenin	ANG	Angiogenèse, prolifération cellulaire
Angiopoetin-1	AGPT1	Migration cellulaire, stabilisation cellulaire
Bone morphogenetic protein-2	BMP2	Développement
Bone morphogenetic protein-6	BMP6	Différenciation cellulaire, croissance
Connective tissue growth factor	CTGF	Angiogenèse, croissance cellulaire
Endothelin-1	EDN1	Cytoprotection, prolifération cellulaire
Fibroblast growth factor-2	FGF2	Prolifération cellulaire, migration
Fibroblast growth factor-7	FGF7	Prolifération et stabilisation cellulaire
Hepatocyte growth factor	HGF	Cytoprotection, angiogenèse, migration
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	Cytoprotection, migration, contractilité
Interleukin-1	IL-1	Stimulation de VEGF
Interleukin-6	IL-6	Stimulation de VEGF
Interleukin-11	IL-11	Cytoprotection
Kit ligand/stem cell factor	KITLG (SCF)	Prolifération et migration cellulaire
Leukemia inhibitory factor	LIF	Prolifération cellulaire, cytoprotection
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	Prolifération cellulaire, réponse inflammatoire
Matrix metalloproteinase-1	MMP1	Dégradation de la matrice, formation de tubule
Matrix metalloproteinase-2	MMP2	Dégradation de la matrice, formation de tubule
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	Dégradation de la matrice
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1	Migration des monocytes
Macrophage-specific colony-stimulating factor	M-CSF	Prolifération et migration des monocytes
Placental growth factor	PGF	Prolifération cellulaire
Plasminogen activator	PA	Dégradation des molécules de la matrice
Platelet-derived growth factor	PDGF	Prolifération et migration cellulaire
Pleiotrophin	PTN	Prolifération cellulaire
Secreted frizzled-related protein-1	SFRP1	Développement
Secreted frizzled-related protein-2	SFRP2	Développement
Stem cell-derived factor-1	SDF-1	"Homing" des progéniteurs cellulaires
Thrombospondin-1	THBS1	Migration cellulaire
Thymosin- ₄	TMSB4	Migration cellulaire; cytoprotection
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	TIMP-1	Migration cellulaire
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	TIMP-2	Migration cellulaire
Transforming growth factor- β	TGF- β	Maturation des vaisseaux, prolifération
Tumor necrosis factor- α	TNF- α	Dégradation de la matrice, prolifération
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Cytoprotection; prolifération; migration; angiogenèse

Figure 21 : Facteurs sécrétés par les cellules souches adultes et leurs effets tissulaires (Gnecchi, 2008).

C. Les cellules souches mésenchymateuses : le rêve des cellules à tout faire

Les **cellules souches mésenchymateuses (CSM)** sont des cellules souches adultes d'origine mésodermique. Elles sont issues notamment de la moelle osseuse et donnent naissance aux différentes composantes du tissu conjonctif : les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les myofibroblastes. Elles génèrent également la composante stromale de la niche hématopoïétique, permettant le maintien d'une population de cellules souches hématopoïétiques, qui fournit l'ensemble des cellules sanguines pendant toute la vie (Abdallah, 2008).

1) *Historique, caractéristiques et définitions*

Le développement croissant ces dix dernières années de la recherche sur les cellules souches est étroitement lié au développement de nouvelles techniques permettant leur isolement. Les **cellules stromales** de la moelle osseuse ont été identifiées initialement par Friedenstein et al. en 1976 (Friedenstein, 1976), qui décrivaient une population de cellules d'aspect morphologique proche des fibroblastes capable de se différencier dans la voie ostéogénique et donc initialement décrite comme précurseur des cellules osseuses. Ils ont ensuite montré qu'*in vivo*, ces cellules transplantées peuvent générer des fragments de tissus osseux, cartilagineux ou adipeux (Friedenstein, 1987 ; Owen, 1988). *In vitro*, elles sont capables d'une prolifération prolongée simplement en présence de sérum de veau fœtal (SVF).

Des études ultérieures ont montré que les capacités de différenciation de ces cellules s'étendaient aux autres lignées de cellules mésodermiques, incluant les chondrocytes, les adipocytes et les myofibroblastes (composant capital du stroma supportant l'hématopoïèse) (Pittenger, 1999 ; Galmiche, 1993 ; Moreau, 1993 ; Charbord, 1998) (Figure 22).

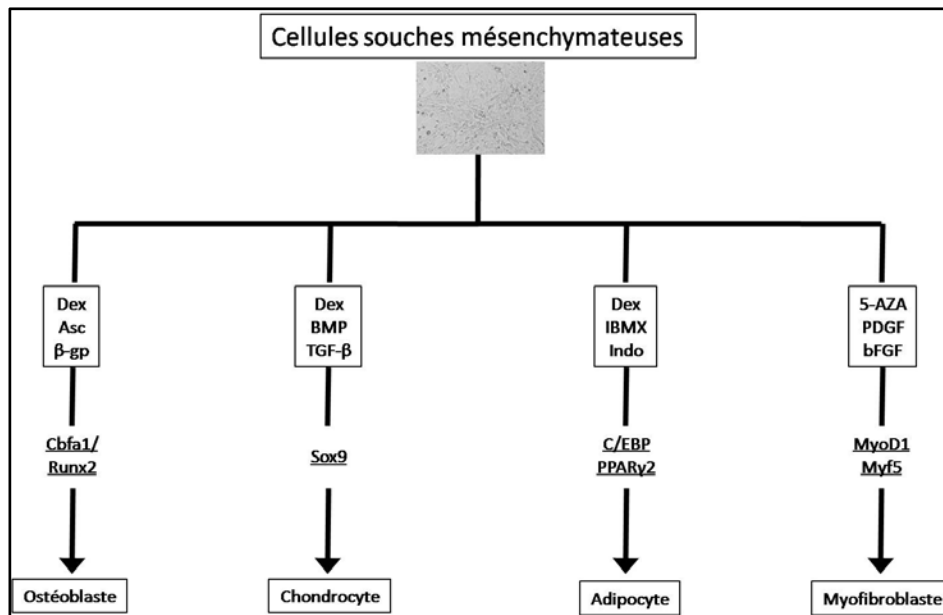


Figure 22 : Capacités de différenciation classique des CSM. D'après (Larghero, 2009). Les facteurs d'induction de la différenciation in vitro sont encadrés. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans les voies de différenciation sont soulignés.

Dex : dexaméthasone ; Asc : acide ascorbique ; β-gp : β-glycerophosphate ; BMP : bone morphogenetic protein ; TGF-β : transforming growth factor beta ; IBMX : isobutylmethylxanthine ; indo : indométhacine ; 5-AZA : 5-azacytidine ; PDGF : platelet-derived growth factor ; bFGF : basic fibroblast growth factor.

Basé sur cette capacité de différenciation en de nombreuses lignées cellulaires, Caplan (Caplan, 1991) a introduit le nom de **cellules souches mésenchymateuses (CSM)**, bien que de nombreux termes aient été utilisés pour décrire une population non homogène de cellules multipotentes issues de la moelle osseuse.

Les CSM sont donc des progéniteurs des cellules de la lignée mésenchymateuse. *In vitro*, ces cellules sont capables de donner naissance à des cellules stromales, support de l'hématopoïèse, et de se différencier en ostéoblaste, en chondrocyte, en adipocyte, en myofibroblaste : c'est la **différenciation "classique"** (Figure 23).

Mais dans des conditions de culture *in vitro* particulières, les CSM pourraient également se différencier en cellules des lignées neuro-ectodermiques ou endodermiques, comme les neurones (Dezawa, 2004 ; Sanchez-Ramos, 2000), les cardiomyocytes (Makino, 1999), les hépatocytes (Schwartz, 2002), l'endothélium, les cellules productrices d'insuline (Oh, 2004). De telles cellules souches multipotentes ont été identifiées dans la moelle osseuse et sont connues sous les noms de multipotent-adult-progenitor-cells (MAPC) (Jiang, 2002) : c'est la **différenciation "induite in vitro"** (Figure 23).

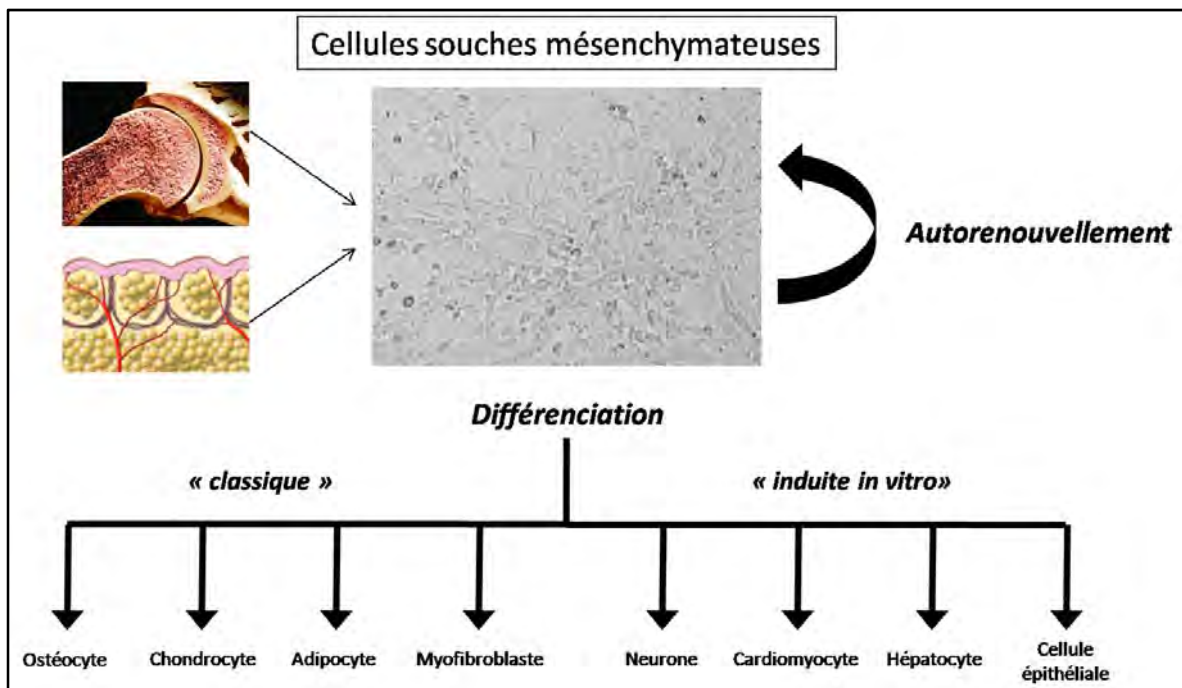


Figure 23 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses

Les CSM pourraient, en plus du lignage mésenchymateux, avoir la potentialité de se différencier dans de nombreux types cellulaires soit après transplantation dans un organe secondaire, soit après traitement inducteur avec des cytokines spécifiques en culture. Même si elles seraient potentiellement le fruit « d'artefact » lié à leur extravasation, ces potentialités nouvelles méritent une complète caractérisation car la thérapie cellulaire offre un espoir thérapeutique complémentaire à l'approche pharmacologique classique.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur membranaire spécifique des CSM, mais il est admis que les CSM présentent les **caractéristiques phénotypiques** suivantes : elles expriment les antigènes de surface marqueurs d'immaturité cellulaire CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146. En revanche, elles n'expriment pas les marqueurs de cellules hématopoïétiques CD34, CD45, CD14, ni les antigènes HLA de classe II. Elles expriment faiblement les antigènes HLA de classe I (Figure 24). Il est donc potentiellement envisageable de transplanter les CSM dans une situation d'allogreffe avec incompatibilité HLA (Pittenger, 1999 ; Gronthos, 1994 ; Deschaseaux, 2000).

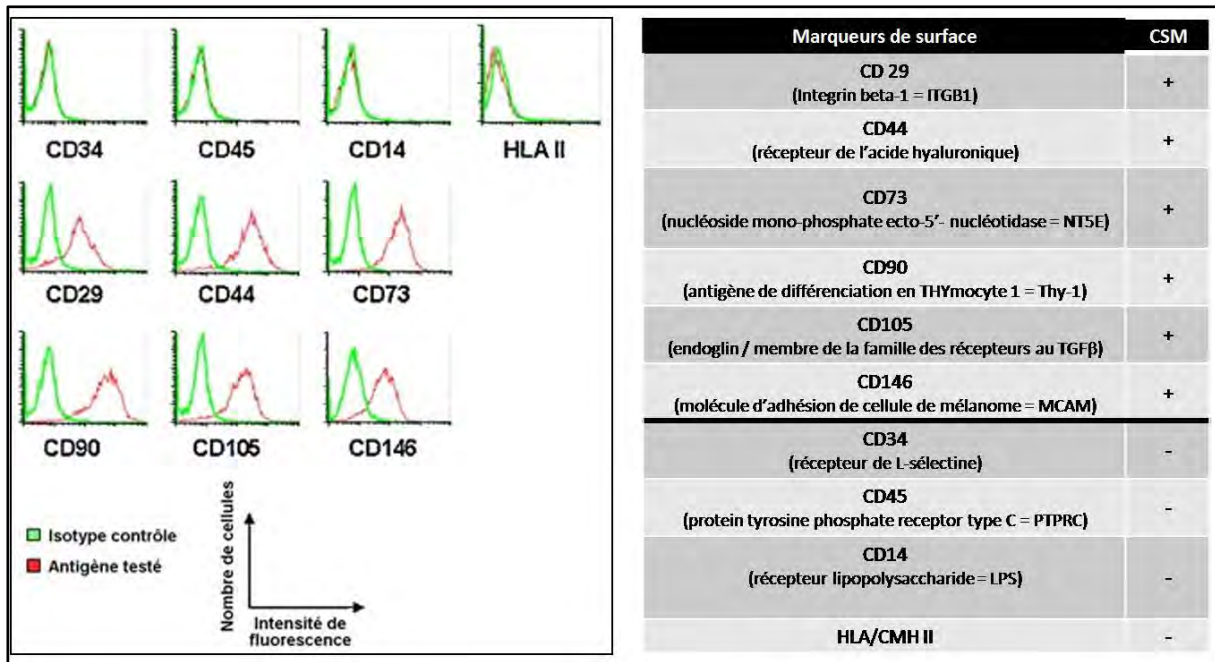


Figure 24 : Phénotype des CSM médullaires.

Les cellules ont été marquées par des anticorps fluorescents dirigés contre les antigènes CD34, CD45, CD14, HLA classe II, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146.

L'analyse a été effectuée par cytométrie de flux.

Elles se caractérisent également par la **synthèse de facteurs de croissance et de cytokines** (M-CSF, IL-6, IL-11, IL-15, SCF, VEGF) impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse, la modulation de la réponse immunitaire, les interactions cellulaires, l'angiogenèse.

D'autres tissus contiennent des cellules très voisines des CSM médullaires. Par exemple, le **tissu adipeux** constitue une source alternative prometteuse de part sa richesse en cellules multipotentes, appelées CSM dérivées du tissu adipeux (Ad-CSM). Les sites de prélèvements les plus courants sont sous-cutanés, en général après une lipoaspiration. Pour le tissu adipeux, le mode de préparation avant la mise en culture diffère du prélèvement médullaire. Il doit comprendre une digestion enzymatique (collagénase) pour libérer les cellules de la matrice extracellulaire et une centrifugation pour éliminer les adipocytes. Il existe des différences spécifiques au niveau transcriptionnel et protéomique entre les CSM médullaires et les Ad-CSM, ainsi que des différences fonctionnelles dans leur processus de différenciation. Néanmoins, *in vitro* ainsi que *in vivo* les Ad-CSM montrent la même capacité que les CSM médullaires pour se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, myofibroblastes, rendant ces deux sources de cellules prometteuses en thérapie régénérative (Noël, 2008).

Récemment, due à l'absence d'une dénomination commune et claire entre les différentes équipes de recherche, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a statué sur une définition concernant les cellules souches mésenchymateuses (Horwitz, 2005 ; Keating, 2006). La définition de l'ISCT stipule que :

«Toute population cellulaire obtenue à partir d'un tissu/organe ayant *in vitro* les caractéristiques minimum suivantes... :

*Adhérence au plastique (par opposition aux cellules hématopoïétiques)

*Capacité à se différencier dans les types cellulaires du lignage mésenchymateux (ostéo-chondro-adipocytes)

*Combinatoire d'un ensemble de marqueurs cellulaires dont :

→ expression de CD44, CD73, CD90, CD105

→ absence d'expression des marqueurs spécifiques des cellules hématopoïétiques CD34, CD45, CD14 et des cellules endothéliales CD31.

... sera dénommée «Cellules Stromales Mésenchymateuses Multipotentes».

Toutefois l'acronyme X-derived cellules stromales mésenchymateuses sera préservé, avec X référant au tissu/organe d'obtention (exemple Adipose tissue-derived cellules stromales mésenchymateuses).

Les auteurs devront démontrer à l'échelle clonale que leur population cellulaire présente les propriétés «souches» afin de pouvoir qualifier la population de «Cellules Souches Mésenchymateuses».

Dans ce manuscrit, nous avons utilisé indifféremment le terme de :

Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSM)

ou

Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM).

2) *Propriétés et utilisations thérapeutiques*

Parmi les différents types de cellules souches, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de l'adulte représentent une population cellulaire dont l'intérêt en clinique humaine s'avère prometteur car elles peuvent être isolées relativement facilement à partir des tissus adultes (moelle osseuse, tissu adipeux) dans le but d'une utilisation clinique. Elles possèdent des propriétés particulièrement intéressantes, notamment une très grande capacité d'expansion et de différenciation *in vitro*, mais aussi des caractéristiques immunologiques d'immunosuppression et de présentation d'antigène. Ces propriétés pourraient être utilisées seules ou de façon cumulée, permettant d'envisager de multiples applications thérapeutiques. Les premiers travaux exploitant le potentiel thérapeutique des CSM se sont principalement intéressés à leurs capacités à faciliter la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et à promouvoir les réparations structurelles et fonctionnelles de tissus endommagés ; leurs propriétés immunomodulatrices ont également permis leur utilisation dans le cadre de thérapie portant sur des maladies immunitaires. Plus d'une centaine d'essais cliniques sont effectués à l'heure actuelle dans le monde avec des CSM de différentes origines, essentiellement de la moelle osseuse et du tissu adipeux (Giordano, 2007).

A. *APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE : HEMATOLOGIE/CANCEROLOGIE*

En pratique clinique, la **transplantation de CSH autologues ou allogéniques** est couramment employée, notamment pour traiter une aplasie secondaire au traitement d'un cancer. Différents facteurs influencent la qualité de la prise du greffon. Il est maintenant bien établi que toute chimiothérapie ou radiothérapie à haute dose précédant la transplantation endommage le microenvironnement de la moelle osseuse, engendrant un retour difficile des fonctions hématopoïétiques.

La **réaction *graft versus host* (GVH)** -ou réaction du greffon contre l'hôte- est la principale complication de la greffe de CSH allogéniques. Une classification clinique en 4 grades permet d'en apprécier la sévérité. Elle peut être aiguë ou chronique.

Les CSM font partie du microenvironnement médullaire hautement spécialisé au sein duquel elles participent notamment à la régulation de l'autorenouvellement et de la différenciation des CSH (Yin T, 2006). Elles contribuent au **soutien de l'hématopoïèse**, en créant un tissu connectif, mais surtout en synthétisant une vaste palette de cytokines (IL6, IL7, IL8, IL11, IL12, IL14 et IL15) et de facteurs de croissance (M-CSF, FMS-Like Tyrosine kinase 3 Ligand (Flt-3L), Stem Cell Factor (SCF)) impliqués dans la différenciation et la maturation des différentes populations de cellules sanguines (Deans RJ, 2000). Les CSM jouent également un rôle dans la lymphopoïèse en participant à la maturation des lymphocytes B grâce à la sécrétion des facteurs SCF et IL7 (Milne CD, 2004).

En plus de leurs propriétés de soutien des fonctions hématopoïétiques, les CSM possèdent des **propriétés immunosuppressives** qui pourraient être exploitées afin de favoriser l'implantation de greffes allogéniques. Il a d'abord été démontré qu'elles ont la capacité d'inhiber la prolifération de lymphocytes T allogéniques en réponse à des cellules allogéniques ou des mitogènes (Rasmusson, 2006). Se basant sur cette découverte, l'équipe de Pittenger a étudié l'interaction des CSM humaines avec différentes cellules du système immunitaire (Aggarwal, 2005). Cette étude a démontré que les CSM ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire à différents niveaux, soit en inhibant deux cytokines centrales du système immunitaire : TNF α et interféron γ (IFN γ), soit en activant la production de cytokines inhibitrices comme l'IL10. Toujours selon cette étude, l'inhibition de la sécrétion de TNF α par les cellules dendritiques empêcherait leur maturation, leur migration et leur fonction. Cette inhibition combinée à la sécrétion de l'IL10 induirait les cellules dendritiques à promouvoir un état anti-inflammatoire et de tolérance immunitaire. Enfin, dans un environnement inflammatoire, les CSM inhiberaient la sécrétion d'interféron γ par les cellules effectrices de la réponse TH1 et les natural killer (NK) d'une part, et augmenteraient la sécrétion d'IL4 par les cellules effectrices de la réponse TH2 d'autre part, induisant un déplacement de la réponse pro-inflammatoire TH1 vers une réponse anti-inflammatoire TH2 (Beyth, 2005). Cependant, une étude récente suggère que les CSM peuvent également inhiber les lymphocytes B (Corcione, 2006). D'autres groupes de recherche ont démontré l'importance de différents facteurs tels que la prostaglandin E2 (PGE2), l'hépatocyte growth factor (HGF), le transforming growth factor β 1 (TGF β 1) et l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans l'immunosuppression médiée par les CSM. Quelques études ont suggéré que les CSM peuvent inhiber les cellules effectrices immunitaires par contact cellulaire direct (Rasmusson, 2006).

Cliniquement, la réaction de GVH est caractérisée par une augmentation de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL1, IL2, IL12) et par l'activation des cellules dendritiques, des macrophages, des NK ainsi que des lymphocytes T cytotoxiques du donneur engendrant des dommages tissulaires majeurs au receveur. Ainsi, l'immunosuppression médiée par les CSM permettrait de contrer la GVH.

*** Propriétés de soutien de l'hématopoïèse des CSM : plusieurs essais cliniques ont analysé l'effet des CSM sur l'implantation des CSH autologues ou allogéniques.**

Le premier essai clinique pilote utilisant des CSM a été réalisé sur 15 volontaires atteints d'une hémopathie maligne. Dans cet essai de tolérance, les patients recevaient des CSM autologues injectées par voie intraveineuse. Aucun effet secondaire immédiat ou tardif n'avait été observé (Lazarus, 1995).

Une deuxième étude de transplantations autologues a été réalisée chez 28 patientes atteintes de cancer du sein recevant une autogreffe de CSH autologues de sang périphérique, précédée d'une chimiothérapie lourde, afin d'évaluer la faisabilité de cette approche (Koc, 2000). Environ 35 jours avant la date prévue de la chimiothérapie et de la transplantation des CSH, 20 à 25 mL de moelle osseuse ont été prélevés par ponction iliaque chez chacune des patientes. Les CSM ont été isolées par gradient de densité cellulaire puis mises en culture à une densité de 1×10^6 cellules/mL dans du milieu de culture additionné de 10 % de sérum bovin fœtal : 72 heures après une chimiothérapie à haute dose, les patientes ont reçu une co-implantation de CSH et de CSM (en moyenne 2×10^6 cellules/kg) autologues. Testée pour la première fois chez l'humain, cette technique démontre la faisabilité de l'isolement et de l'expansion *ex vivo* de CSM autologues. Aucune toxicité liée à la retransplantation de ces CSM n'a pu être détectée et un effet bénéfique a été rapporté concernant la prise de greffe et le retour rapide des fonctions hématopoïétiques : niveau moyen des neutrophiles $> 500/\text{mm}^3$ et des plaquettes $> 20\,000/\text{mm}^3$ après 8 jours.

Dans ces deux essais précités, les CSM injectées étaient d'origine **autologue**. Compte tenu des difficultés à obtenir un nombre suffisant de CSM autologues (stroma altéré par les chimiothérapies antérieures), les CSM autologues ont été secondairement remplacés par des CSM **allogéniques** provenant de la moelle d'un donneur sain.

Un autre essai initié en 2001 (Lazarus, 2005) évaluait des doses croissantes de CSM (1, 2,5 et $5 \times 10^6/\text{kg}$). Quarante-six patients atteints d'une hémopathie maligne avaient reçu une injection de CSM avant la greffe de CSH. La probabilité de survie sans maladie ou sans progression à deux ans était de 53 %. Comparé à un groupe de témoins historiques, l'essai n'a pas montré d'accélération de la reconstitution hématopoïétique ou de prévention de la réaction du GVH.

En 2002, l'équipe de Frassoni a rapporté lors du congrès de l'EBMT une étude rétrospective comparative et appariée évaluant l'intérêt des CSM au cours d'une allogreffe de CSH génoidentiques. Trente-deux patients avaient reçu des CSM provenant du même donneur de CSH. Ces patients étaient appariés et comparés à 32 patients qui avaient reçu une allogreffe de CSH génoidentiques sans CSM. Tous les patients étaient atteints d'une hémopathie maligne. Les résultats ont montré des cinétiques de greffe plus rapide avec les CSM à la fois sur les polynucléaires neutrophiles et les plaquettes. L'incidence de la GVH aigüe était plus faible dans le groupe de patients avec CSM. Ces résultats se traduisaient par une probabilité de survie sans maladie de 76 % avec CSM et 39 % sans CSM (données non publiées).

Dans un essai européen de phase I–II, 14 enfants ont reçu une greffe de CSH haploidentiques associée à une injection de CSM le même jour (Ball, 2007). La reconstitution hématopoïétique n'était pas plus rapide chez ces enfants que celle observée dans un groupe témoin historique de 47 enfants greffés dans les mêmes conditions. En revanche, aucun patient recevant des CSM n'a eu de rejet de greffe (15 % dans le groupe témoin).

Une approche similaire a été utilisée pour une patiente présentant une reconstitution hématopoïétique incomplète après autogreffe de moelle osseuse dans le cadre de la prise en charge d'une leucémie aigüe myéloïde (Fouillard, 2007). Après injection de CSM allogéniques, une amélioration significative des taux de polynucléaires et de plaquettes a été observée. Il n'y a eu aucune GVH ni de rechute de la maladie.

Dans le cas rapporté d'une patiente atteinte d'aplasie médullaire idiopathique résistante aux traitements conventionnels et non éligible pour une allogreffe de CSH, des CSM intrafamiliales provenant du fils ont été réinjectées par voie intraveineuse dans le but de reconstituer un stroma médullaire (Fouillard, 2003). Bien qu'une amélioration de la structure du stroma médullaire ait été obtenue (diminution de l'hémorragie interstitielle, de l'œdème, et de la nécrose adipocytaire), aucune reconstitution du tissu hématopoïétique n'a été observée.

*** Propriétés immunosuppressives des CSM : plusieurs essais cliniques ont analysé l'effet des CSM sur la réaction de GVH secondaire à l'implantation des CSH allogéniques.**

Dans le cadre du traitement des GVH réfractaires aux traitements conventionnels, les premiers résultats présentés par l'équipe de Le Blanc de l'institut Karolinska ont suscité de vifs espoirs. Ils ont effectué une transplantation de CSM allogéniques provenant de la mère chez un enfant de 9 ans atteint d'une GVH aiguë (grade 4) (Le Blanc, 2004). Atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique, cet enfant a reçu une transplantation de CSH allogéniques provenant d'un donneur HLA (*human leukocyte antigen*) identique, accompagnée d'un régime immunosuppresseur et, 70 jours après, une GVH aiguë de grade 4 a été diagnostiquée. Les CSM de la mère du patient ont été isolées puis cultivées *ex vivo* durant 3 semaines au terme desquelles 2×10^6 CSM/kg ont été transplantées par voie intraveineuse à l'enfant. Quatre jours après transplantation, les diarrhées de l'enfant ont diminué en fréquence de 20 à 2 fois par jour et la concentration de bilirubine était en diminution. Quatre-vingts jours après la première transplantation de CSM, le patient a reçu une seconde injection de 1×10^6 CSM/kg. Une semaine plus tard, les diarrhées ont totalement cessé et le niveau de bilirubine indiquait une GVH non plus aiguë mais chronique. Après quelques semaines, la concentration de bilirubine est redevenue normale (8 mmol/L). Alors que le pronostic d'une GVH aiguë de grade 4 est presque toujours mortel, l'enfant traité avec les CSM de sa mère a pu récupérer pleinement, sans récurrence plus de 1 an après le traitement. Aucune immunisation contre les CSM haploidentiques n'était apparue. D'autres études impliquant un nombre plus élevé de patients ont conforté l'hypothèse selon laquelle les CSM pourraient représenter une alternative thérapeutique pour les patients atteints de GVH aiguë post-greffe de CSH (Ringdén, 2006). Très récemment, l'équipe de Le Blanc a rapporté les résultats d'une étude multicentrique européenne obtenus chez 55 patients traités par injection de CSM pour GVH aiguë sévère cortico-résistante après greffe de CSH (Le Blanc, 2008). Une réponse complète a été obtenue chez 30 patients et une amélioration chez neuf autres. La survie globale à deux ans après greffe de CSH était significativement supérieure dans le groupe des patients répondeurs comparé à celui des patients répondeurs partiels ou non répondeurs. Ces résultats montrent que les CSM pourraient être une thérapie efficace pour les patients atteints de GVH aiguë cortico-résistante.

Les résultats préliminaires obtenus dans le contrôle de la GVH survenant après greffe de CSH allogéniques rendent bien compte de la capacité des CSM à inhiber, ou du moins à moduler, la réponse immune. Cependant, ces résultats encourageants ne doivent pas faire oublier que si la GVH représente bien une complication fréquente et parfois sévère des greffes de CSH allogéniques, l'effet *graft versus leukemia* (GVL) qui lui est associée représente, lui, un apport majeur des lymphocytes greffés dans le contrôle de l'immunité antileucémique et donc dans la prévention des rechutes.

Dans ce contexte, l'inhibition de la GVH obtenue après greffe de CSM ne risque-t-elle pas de s'accompagner d'une augmentation du taux de rechute, à l'instar de ce qui a été rapporté chez l'animal ? Il a ainsi été montré dans plusieurs modèles de transplantation chez la souris que les CSM favorisaient la croissance tumorale *in vivo* (Djouad, 2003 ; Uyttenhove, 2003).

Chez l'homme, le rôle potentiel des CSM dans la survenue de rechutes post-greffe a été récemment rapporté dans Leukemia (Ning, 2008). Dans un essai clinique randomisé, ouvert, 25 patients atteints d'hémopathies malignes ont été greffés à partir d'un donneur apparenté HLA identique sans ($n = 15$) ou avec ($n = 10$) injection de CSM. Le nombre médian de CSM perfusées a été de 3,4 fois $10^5/\text{kg}$ (de 0,3 à 15,3 fois $10^5/\text{kg}$), avec une bonne tolérance clinique. Comme attendu, le taux de GVH aigue grade 2–4 et de GVH chronique a été plus faible dans le groupe CSM que dans le groupe témoin. En revanche, si 20 % des patients du groupe témoin ont rechuté, ce taux était de 60 % dans le groupe CSM. De même, la survie sans maladie à trois ans était de 66,7 % dans le groupe témoin et de seulement 30 % pour les patients ayant reçu une cotransplantation de CSM.

La co-transplantation de CSM et de CSH semble donc efficace sur la GVH, mais le taux de rechute de l'hémopathie maligne apparaît beaucoup plus élevé que dans le groupe contrôle.

Ces résultats ont depuis été critiqués dans la littérature, afin d'essayer d'émettre des hypothèses expliquant cette récurrence accrue (Rizzo, 2008) ou de nuancer les conclusions de cette étude (Behre, 2009). De toute façon, l'utilisation des CSM en co-transplantation avec des CSH dans le cadre du traitement d'hémopathie maligne doit être envisagée avec une extrême prudence et seul un essai clinique à grande échelle permettra d'en cerner les indications.

* Propriétés de présentation d'antigène des CSM

Alors que les propriétés immunosuppressives des CSM ont déjà été exploitées dans le cadre d'essais cliniques, l'équipe de S. Pommey vient de décrire une nouvelle propriété immunologique des CSM également très prometteuse. Ils ont démontré que les CSM, suite à une stimulation à l'IFN γ , ont la capacité d'agir comme cellules présentatrices d'antigènes et peuvent ainsi induire une réponse immunitaire adaptative spécifique à un antigène donné (Stagg, 2006). *In vitro*, les CSM humaines et murines peuvent ainsi "endocyter" une protéine extracellulaire telle l'albumine de poulet (ovalbumine), la dégrader en peptides immunogéniques et présenter ces peptides sur les molécules d'histocompatibilité majeures de type II afin d'activer, à l'aide de l'expression du co-stimulateur CD80, les lymphocytes T de type CD4 spécifiques à cet antigène. À l'instar des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, les CSM possèdent donc le double potentiel d'inhiber ou d'activer une réponse immunitaire, selon la nature des stimuli présents dans leur microenvironnement. Les CSM représentent donc une nouvelle source de cellules présentatrices d'antigène et pourraient potentiellement être utilisées comme telle à des fins thérapeutiques, par exemple dans le cadre du traitement du cancer.

Cette équipe a tenté d'immuniser des souris à l'aide de deux injections successives de CSM préalablement pulsées avec la protéine ovalbumine en présence d'IFN γ . Remarquablement, ils ont obtenu la protection de 100 % des souris contre le développement de tumeurs exprimant cette protéine, démontrant ainsi que les CSM peuvent induire *in vivo* une réponse immunitaire cellulaire spécifique à un antigène, suffisamment efficace pour prévenir le développement tumoral. Du point de vue thérapeutique, cette découverte représente un intérêt majeur dans le développement de vaccins cellulaires. En effet, les CSM sont des cellules qui se trouvent en relative abondance dans la moelle osseuse de patients de tous âges et leur capacité d'expansion *ex vivo* permettrait plusieurs générations de «vaccins» à partir d'un seul prélèvement. Enfin, étant donné leur propriété d'expansion, elles constituent des cibles idéales pour divers vecteurs de transfert génique, contrairement aux cellules dendritiques différenciées. Ainsi, l'utilisation de CSM génétiquement modifiées permettrait potentiellement de cibler de multiples antigènes tumoraux, d'augmenter leur capacité d'activation des lymphocytes T de type CD8 ou d'augmenter leurs propriétés de co-stimulation.

B. APPLICATIONS DE THERAPIE GENIQUE : CANCEROLOGIE

La modification génétique des CSM ouvre la voie à différentes applications, qu'il s'agisse de restaurer l'expression d'un gène défectueux ou d'induire la surexpression d'un gène participant à une thérapie anti-tumorale ou à une régénération tissulaire. Plusieurs équipes de recherche ont démontré, dans des études précliniques, que les CSM peuvent être modifiées génétiquement pour exprimer un transgène biologiquement actif et transplantées afin d'induire un effet thérapeutique prolongé. Par exemple, Bartholomew *et al.* (Bartholomew, 2001) ont rapporté avoir détecté de l'érythropoïétine humaine ainsi qu'une augmentation de l'hématocrite chez des babouins chez lesquels avaient été injectées des CSM génétiquement modifiées pour exprimer ce transgène, et ce même 4 mois après implantation.

Une application des transferts géniques dans les CSM serait de cibler une tumeur cancéreuse en délivrant, directement dans son microenvironnement, des molécules inhibant son expansion. L'IFN γ possède toute une variété d'activités biologiques, dont la capacité d'induire la régression tumorale. Cependant, lors d'essais cliniques chez l'homme, même en injectant la dose maximale tolérée, la concentration sérique de l'IFN γ reste souvent trop basse par rapport à celle nécessaire pour obtenir un effet antitumoral.

L'équipe d'Andreef a montré que des CSM injectées par voie intraveineuse à des souris ayant des tumeurs établies avaient la particularité de migrer au lieu de la tumeur (phénomène de "homing") et de s'y implanter. Ils ont donc modifié des CSM de façon à leur faire produire de l'IFN γ , capable d'inhiber *in vitro* la croissance de mélanome (Studený, 2002).

L'équipe de recherche en neurochirurgie de Lang a utilisé des CSM humaines en tant que véhicule cellulaire dans un modèle de glioblastome multiforme. Cette tumeur cérébrale est la plus fréquente chez l'homme et demeure incurable cliniquement, notamment du fait de son inaccessibilité. Cette équipe a tout d'abord démontré que des CSM provenant de différents donneurs humains migrent vers un glioblastome humain xénotransplanté dans un modèle murin, qu'elles soient injectées localement ou par voie intraveineuse. Cette migration est médiée, du moins en partie, par des facteurs de croissance et des cytokines exprimés par la tumeur, tels que PDGF, EGF et SDF1a. En combinant cette découverte avec l'utilisation de CSM modifiées pour délivrer l'IFN γ *in vivo*, il a été possible d'accroître significativement la durée de vie des souris porteuses de gliomes établis (Nakamizo, 2005).

Les CSM modifiées génétiquement pourraient donc être utilisées pour cibler des tumeurs cérébrales jusqu'alors inaccessibles par voie non invasive. Cependant, ces deux études ont été menées dans des modèles de souris immunodéficientes qui ne permettent pas de récapituler l'interaction possible entre le système immunitaire et les CSM.

L'équipe de S. Pommey a démontré pour la première fois qu'il était possible d'utiliser des CSM modifiées génétiquement pour délivrer une molécule immunostimulante antitumorale, dans un modèle de souris immunocompétentes (Stagg, 2004). Ils ont modifié des CSM pour exprimer le gène de l'IL2, cytokine couramment utilisée en thérapie du cancer pour favoriser l'activation du système immunitaire *via* l'activation des NK et l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T activés. En implantant ces cellules dans une matrice de collagène, proche d'une tumeur préétablie, ils ont été capables de prévenir un quelconque développement tumoral chez 90 % des souris, pendant plus de 100 jours. Ils ont observé que les tumeurs des souris ainsi traitées étaient infiltrées par des cellules effectrices de l'immunité NK et NKT (*natural killer T*). De plus, les souris ayant rejeté ces tumeurs ont développé une réponse immunitaire mémoire spécifique à des antigènes tumoraux.

Ainsi, le tropisme des CSM humaines pour certaines tumeurs et la possibilité de les modifier génétiquement permettent d'envisager leur utilisation en tant que véhicule cellulaire capable de délivrer au sein même d'une tumeur établie des molécules thérapeutiques.

Afin d'obtenir une expression prolongée d'un gène thérapeutique donné, cette équipe a démontré que leur implantation immobilisées dans une matrice de collagène permet d'augmenter significativement l'effet thérapeutique des CSM. Ainsi, le confinement des CSM à un implant de collagène a permis l'expression stable d'un transgène pendant plus de 6 mois et a l'énorme avantage de permettre un retrait chirurgical, annulant alors l'effet de la protéine lorsqu'elle n'est plus nécessaire (Eliopoulos, 2004).

C. APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE EN ORTHOPEDIE : REPARATION OSSEUSE

A partir des CSM, des précurseurs sont recrutés. Sous l'action de facteurs hormonaux et systémiques, ils vont proliférer et se différencier en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures synthétisant une matrice organique non minéralisée, qui sera par la suite minéralisée. Enfin, l'ostéoblaste se différencie en un ostéocyte enfoui dans la matrice osseuse ou en une cellule bordante. Il existe donc trois étapes des CSM aux ostéocytes matures : **prolifération, différenciation et minéralisation** via la matrice extra-cellulaire.

*** Ostéogenèse imparfaite :** L'ostéogenèse imparfaite (*osteogenesis imperfecta*) (OI) est une maladie génétique rare et incurable, caractérisée par une fragilité osseuse et des fractures dues à une réduction de la masse osseuse. Provoquée par des mutations sur les gènes COL1A1 ou COL1A2, la production de fibres de collagènes présente alors un défaut quantitatif ou qualitatif. Les mutations affectant la chaîne $\alpha 1$ ont des conséquences plus graves et particulièrement quand une glycine est substituée (Pace, 2008).

La fréquence de l'OI est estimée à 1 pour 10 000. En France, environ 80 enfants naissent chaque année atteints de cette maladie.

Autrement appelée "maladie des os de verre", l'OI existe sous plusieurs formes dépendant des mutations affectant les gènes COL1A1 ou COL1A2 (Rauch, 2004). En effet, la sévérité et la chronologie de l'atteinte est très variable : certains enfants atteints d'OI ont un nombre important de fractures au cours de la petite enfance provoquant de graves répercussions sur leur croissance ; d'autres auront quelques fractures séparées de quelques années. On distingue 7 formes cliniques d'OI, qui se différencient par leurs symptômes (nombre de fractures, trouble de la dentition, taille de l'individu...).

La prise en charge conventionnelle repose sur la physiothérapie ainsi que sur des procédures chirurgicales en insérant au niveau du tibia et du fémur des tiges pour solidifier le squelette ou corriger des déformations.

Depuis une vingtaine d'années, un traitement par les bisphosphonates et notamment le pamidronate chez l'enfant est étudié. Les bisphosphonates sont des molécules qui permettent de ralentir la résorption osseuse effectuée par les ostéoclastes en provoquant leur apoptose et d'avantager ainsi la formation de la masse osseuse. Les études menées montrent que ce type de traitement a des effets bénéfiques, comme une diminution de la douleur osseuse et des fractures (Land, 2006), mais pose des problèmes à long terme avec parfois un phénomène de nécrose osseuse au niveau de la mâchoire ou encore l'apparition d'une calcification des

cartilages. Les traitements actuels sont palliatifs, puisqu'aucun d'eux ne vise les causes de la maladie. Afin que cette maladie ne soit plus considérée comme incurable, la mise en place d'une nouvelle stratégie thérapeutique est essentielle. Elle pourrait alors, soit éliminer le gène mutant, soit inhiber la production de la protéine correspondante.

Pour la première fois en 1999, l'équipe d'Horwitz de l'hôpital Saint-Jude de Memphis a montré qu'une transplantation de moelle osseuse d'un donneur allogénique permettait d'améliorer, au moins de façon transitoire, la condition de 3 enfants atteints de cette maladie (Horwitz, 1999). Le même groupe a ensuite démontré que l'injection de CSM allogéniques purifiées pouvait accroître le bénéfice obtenu par la greffe de moelle chez ces mêmes patients, confirmant la possibilité d'exploiter le potentiel ostéogénique des CSM (Horwitz, 2002).

L'équipe de Le Blanc a également montré que des CSM allogéniques fœtales injectées peuvent se greffer et se différencier en os chez le fœtus in utero atteint d'OI sévère avec fractures multiples, même lorsque le bénéficiaire est immunocompétent et HLA-incompatible (Le Blanc K, 2005).

*** Réparation des pertes de substance osseuses :** la réparation d'une fracture nécessite l'immobilisation des fragments osseux (plâtre, ostéosynthèse chirurgicale) durant 6 à 12 semaines, selon le type de fracture. Cependant, il existe dans 5 à 10 % des cas un retard ou une absence de consolidation, qui correspond le plus souvent à la formation d'un mélange de tissus fibreux et osseux ne permettant pas la restauration de la continuité osseuse (pseudarthrose). La fonction mécanique première du tissu osseux ne peut dès lors plus être assurée. De plus, il existe des indications thérapeutiques spécifiques pour lesquelles il est nécessaire de réséquer des segments osseux de taille importante, par exemple dans certaines pathologies tumorales, infectieuses ou traumatiques. L'importance du déficit est dans ce cas trop importante pour autoriser une néoformation osseuse. La reconstruction d'un os fonctionnel dans ces grandes pertes de substance est alors problématique.

Les techniques chirurgicales disponibles en pratique courante sont les autogreffes vascularisées ou non vascularisées et les allogreffes (cf Chapitre I.B.5a)).

Les techniques biologiques alternatives en cours d'évaluation sont de trois types : les biomatériaux, les facteurs de croissance et les cellules.

Chacune de ces approches, seule ou en association, a probablement sa place en chirurgie reconstructrice osseuse.

→ Les méthodes biologiques :

Elles font appel à des substituts susceptibles de remplacer des éléments naturels essentiels au cours de la consolidation osseuse.

***Biomatériaux ostéoconducteurs**

(Ostéoconduction : propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact de ce matériau)

Ce sont des matériaux qui constituent un support pour la repousse de l'os néoformé, lorsqu'ils sont en contact avec l'os du receveur. Ces matériaux doivent être biocompatibles, poreux et si possible résorbables. La taille des pores nécessaire pour la repousse osseuse doit être comprise entre 100 et 500 μm . Le premier des substituts osseux utilisés fut le corail. Il a été utilisé en clinique mais avec des résultats très variables. On lui préfère actuellement les céramiques de phosphate de calcium. L'hydroxyapatite (HAP) fut introduite la première. Sa composition est assez proche de celle de la phase minérale de l'os. Elle ne se résorbe que très lentement. Le tricalcium phosphate (TCP) au contraire se résorbe rapidement. Les céramiques biphasées sont une combinaison d'HAP et de TCP. Ce sont les plus utilisées à l'heure actuelle (Hollinger, 1996 ; Johnson, 1996 ; Moore, 1987 ; Wolff, 1994 ; Holmes, 1987). Ces matériaux n'ont pas d'activité biologique intrinsèque, ce qui nécessite le recrutement local de précurseurs ostéoprogéniteurs pour réparer la perte de substance osseuse. Elles donnent de bons résultats dans le comblement des pertes de substance osseuses de petite taille et en traumatologie maxillo-faciale. L'utilisation de la céramique biphasée permet d'éviter ou de limiter la prise d'autogreffe avec tous ses risques de complications. Pour obtenir la réhabilitation en profondeur du substitut ostéoconducteur dans les grandes pertes de substance, il est souhaitable de le rendre ostéoinducteur.

***Biomatériaux ostéoinducteurs**

(Ostéoinduction : capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable)

Les facteurs ostéoinducteurs biochimiques ou facteurs de croissance sont encore mal connus et leurs interactions complexes rendent leur utilisation clinique encore expérimentale. Ils n'ont un intérêt que dans les cas où le foyer est riche en cellules progénitrices en assurant la multiplication et la différenciation de ces cellules en cellules osseuses. L'IGF-I et le PDGF

peuvent avoir une action réciproque pour améliorer la consolidation. L'administration locale de ces deux facteurs de croissance dans des défauts corticaux n'a aucun effet si un seul d'entre eux est utilisé mais entraîne une amélioration notable de l'épaisseur et de la minéralisation du cal si les deux sont associés. De nombreuses expérimentations animales ont été réalisées pour étudier les problèmes et les limites de l'utilisation clinique des BMP (Bostrom, 1998 ; Trippel, 1998 ; Wozney, 1998). Le Genetics Institute de Cambridge (États-Unis) a réussi à identifier, puis à isoler, le gène de la BMP2 humaine. Il a ainsi pu produire rhBMP2 (recombinant human BMP2). Les publications concernant son expérimentation animale se sont multipliées (Murakami, 2003 ; Por, 2008 ; Yan, 2010). Les essais ont été réalisés, soit par injection locale directe de rhBMP2, soit par greffe d'une association collagène-BMP2. Dans les deux cas la consolidation a été accélérée et le cal renforcé mécaniquement. Des expérimentations cliniques sont en cours : les premiers résultats montrent que les BMP permettent d'obtenir une quantité d'os supérieure ou égale à celle obtenue avec une autogreffe. Par contre, les conséquences du passage systémique des BMP et leur potentiel carcinogène local sont encore peu explorés. Les BMP sont retrouvées à des taux élevés dans certaines tumeurs osseuses malignes (Marie, 1999). On ne peut donc encore, pour le moment, qu'inciter le praticien à la plus grande prudence dans leur utilisation. De nouvelles études pour déterminer le meilleur véhicule susceptible de délivrer localement les facteurs de croissance sont indispensables.

***Biomatériaux ostéogéniques**

(Ostéoformation ou ostéogénèse : construction de la matrice osseuse par des cellules ostéoformatrices)

Le principe de la thérapie cellulaire osseuse est d'implanter, au niveau de la perte de substance osseuse, des cellules ayant un potentiel de différenciation ostéoblastique associées à un matériau support. A la différence des deux précédentes, cette approche fournit les cellules ostéoprogénitrices : elle ne dépend donc pas du recrutement local de précurseurs ostéoblastiques pour la néoformation osseuse. Elle est donc particulièrement adaptée chez les patients présentant :

- une perte de substance osseuse complexe avec des tissus environnants de vitalité douteuse : traumatisme sévère, sepsis, diabète ou tabagisme
- une possibilité limitée de recrutement local d'ostéoprogéniteurs : radiothérapie, personne âgée (Inoue, 1997 ; Quarto, 1995).

Friedenstein a donné les premières preuves de l'existence de cellules progénitrices du tissu osseux dans la moelle osseuse (Friedenstein, 1976). Le premier cas d'injection percutanée de moelle osseuse autologue a été rapporté en 1986 (Connolly, 1986). En 1995, le même auteur a publié les résultats d'une série de 100 patients traités, entre 1986 et 1995, par greffe de moelle osseuse associée à une stabilisation adéquate : 80 % des patients ont formé de l'os alors que chez 20 % d'entre eux, aucune formation osseuse n'a été constatée (Connolly, 1995).

Puis certains auteurs ont cherché à sélectionner uniquement les cellules ostéoprogénitrices par différents procédés (Hernigou, 1997). Le plus facile est la centrifugation per-opératoire du prélèvement de moelle. La moelle est prélevée au trocard dans la partie antérieure des deux crêtes iliaques, au besoin par deux équipes. Environ 300 cm³ sont ainsi prélevés. La centrifugation permet ensuite de ne conserver que les cellules nucléées qui sont réinjectées localement. Malgré le succès de ces travaux (Cummine, 1983 ; Ohgushi, 1989), cette solution a rapidement montré ses limites, en raison de l'impossibilité fréquente de prélever une quantité suffisante de moelle osseuse, c'est à dire d'obtenir le nombre requis de cellules ostéoprogénitrices. En effet, la moelle osseuse comprend seulement 0,001 à 0,01 % de cellules capables de se différencier dans la lignée ostéoblastique : les CSM (Bruder, 1997). La moelle osseuse peut être associée à du collagène, de l'os déminéralisé, des polymères d'acide polylactique ou polyglycolique, ou des céramiques phosphocalciques. Tiedeman et al. ont montré que l'association moelle osseuse-os déminéralisé donne des résultats équivalents à ceux obtenus avec une autogreffe (Tiedeman, 1995). Notre équipe a montré, in vitro, que des cellules de moelle osseuse cultivées sur une céramique en phosphate de calcium expriment des propriétés ostéogènes. La céramique cultivée acquiert une capacité d'ostéoinduction (Heymann, 2001). L'association moelle osseuse et rhBMP2 a été expérimentée chez le rat en 1999 par Lane et al. Les résultats obtenus sont spectaculaires puisque la consolidation de larges pertes de substance a été obtenue dans 100 % des cas en 6 semaines, alors que ce pourcentage était de 38 % avec une autogreffe spongieuse et de 80 % avec la rhBMP seule (Lane, 1999).

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses équipes explorent la possibilité d'utiliser ces CSM issues de la moelle osseuse comme source de cellules compétentes pour la reconstruction osseuse. Les CSM doivent être associées à un matériau support, pour garder le volume de la perte de substance disponible pour la reconstruction osseuse lors de l'implantation. Plusieurs études ont évalué l'ostéoformation induite en site orthotopique par l'association d'un matériau support et de CSM, chez le rat (Kadiyala, 1997), le chien (Bruder,

1998a), le lapin (Lin, 2010) et l'homme (Bruder, 1998b). Une seule série clinique rapporte l'utilisation de CSM pour la réparation de grandes pertes de substances osseuses post-traumatiques. Les CSM avaient été cultivées en présence de fibroblast growth factor 2 et avaient été implantées localement en association avec une matrice (Quarto, 2001). Aucune complication n'a été observée chez les patients traités.

La reconstruction de défauts osseux segmentaires après résection de tumeurs osseuses malignes est un problème majoré par la chimiothérapie. En effet, les agents chimiothérapeutiques sont de puissants inhibiteurs de la division cellulaire et ils peuvent affecter la régénération de l'os à partir des cellules ostéoprogénitrices. Une étude chez le rat a démontré qu'une approche d'ingénierie tissulaire utilisant des CSM au sein d'une colle de fibrine après chimiothérapie peut être bénéfique pour le traitement des défauts osseux segmentaires après résection de la tumeur (Lee, 2005).

Une étude analysant l'implantation de CSM médullaires et de céramiques biphasées semble montrer l'efficacité de cette procédure dans la réparation d'ostéonécrose de hanche et dans la prévention du descellement de prothèse (Yamasaki, 2010).

Ces résultats montrent que les CSM sont capables de combler une perte de substance osseuse de taille critique et que l'os néoformé possède des qualités mécaniques proches de l'os natif. L'utilisation des CSM dans cette approche de thérapie tissulaire est donc particulièrement encourageante.

Mais dans ce cas, la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique s'effectue après l'implantation *in vivo* : dans l'espoir d'accélérer et d'augmenter la néoformation osseuse, des auteurs ont donc exploré l'idée d'utiliser des ostéoblastes, différenciés *in vitro* avant l'implantation. La culture des CSM en présence de dexaméthasone, d'acide ascorbique et de β -glycérophosphate induit leur différenciation vers la lignée ostéoblastique (Bruder, 1997). Trois études montrent en effet que l'utilisation d'ostéoblastes accélère le processus de réparation osseuse par rapport à l'utilisation de CSM (Breitbart, 1998 ; Okumura, 1997 ; Yoshikawa, 1996). A partir de fragments osseux, les ostéoblastes sont difficiles à isoler et possèdent une capacité de prolifération limitée. La seule solution envisageable est donc d'obtenir des ostéoblastes mûres à partir de CSM amplifiées.

Dans le cadre du **projet européen REBORNE**, nous envisageons la régénération de pertes osseuses à partir de biomatériaux et de cellules souches mésenchymateuses (CSM). Ce projet, dont la coordination scientifique est assurée par le Dr Pierre Layrolle (Inserm UMR957), regroupe 24 partenaires avec pour la moitié des services cliniques (Hôpital de Madrid, Nantes, Tours, Henri-Mondor, Liège, Institut orthopaedica Rizzoli), des centres de recherche académiques, des unités de production cellulaire (EFS, DRK, Cell-Factory) et des PME fabricants de biomatériaux sur la période 2010-2014. Après validation chez l'animal, cinq essais cliniques sont envisagés en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale :

*Consolidation des fractures des os longs en pseudarthrose sur 30 patients à partir de cellules souches autologues et de granules céramiques

*Injection de cellules souches autologues encapsulées dans un hydrogel dans les ostéonécroses de la tête fémorale sur 30 patients

*Traitement des ostéonécroses par des cellules souches allogéniques sur 30 jeunes patients après greffe de moelle osseuse et rémission d'une leucémie

*Augmentation osseuse avant la pose d'implants dentaires sur 60 patients à partir de cellules autologues et de biomatériaux

*Reconstruction de fentes alvéolaires de l'os palatin à partir de céramiques et de cellules souches chez 20 enfants.

C'est dans ce contexte qu'en 2004, lors de mon arrivée en master 2 dans le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (unité INSERM U957), j'ai choisi en tant que chirurgien plasticien un projet de recherche inspiré par la problématique clinique de la reconstruction osseuse.

L'originalité de mon travail avait consisté à évaluer, en site hétérotopique, une **technique de reconstruction osseuse combinant une approche chirurgicale** (lambeau périosté vascularisé) et **biologique** (thérapie cellulaire osseuse locale par MSC encapsulées dans des microsphères d'alginate).

On associait ainsi une autogreffe vascularisée (lambeau périosté), des cellules (CSM médullaires) et des biomatériaux (alginate) (Perrot, 2007 : cf Annexes-Article 1).

Article 1 :**«Ostéoformation en site extra-osseux par association de cellules souches mésenchymateuses et d'un lambeau périosté chez le rat.»**

Ann Plast Surg. 2007 Aug;59(2):201-6.

Perrot P, Heymann D, Charrier C, Couillaud S, Rédini F, Duteille F.

Matériel et méthodes :

Nous avons utilisé des CSM issues de la moelle osseuse de rat, obtenues en mettant en culture de la moelle osseuse totale dont on ne conserve que la fraction adhérente au plastique. Elles sont ensuite cultivées adhérentes ou encapsulées à J15 dans des microsphères d'alginate.

Leur cinétique de différenciation vers la lignée ostéoblastique a été analysée par RT-PCR et leur capacité à induire une minéralisation par coloration au rouge alizarine. Puis l'ostéoformation induite *in vivo* en site para-tibial a été étudiée par l'association d'un lambeau périosté et de microsphères d'alginate contenant ou non des CSM.

Résultats :

A J17, les CSM adhérentes montraient un degré de différenciation moins marqué que les CSM encapsulées. Leur capacité à minéraliser une matrice organique a été démontrée dans les 2 conditions de culture à J20. *In vivo*, les radiographies standards montraient des calcifications en regard de la zone d'implantation dans les 2 groupes. Les résultats histologiques révélaient l'absence d'ostéoformation dans le groupe sans cellules, au contraire du groupe avec cellules où l'on retrouvait de l'os lamellaire néoformé.

Discussion :

Dans nos conditions de culture, la différenciation des CSM vers la lignée ostéoblastique, cultivées adhérentes en monocouche, est croissante jusqu'à J10 ; puis l'expression des marqueurs ostéoblastiques (en particulier OC et BSP) est progressivement décroissante, ce qui correspond à une dédifférenciation des CSM au cours des divisions cellulaires successives. Par contre, l'expression des marqueurs ostéoblastiques reste constante quand les CSM sont encapsulées à J10 dans des microsphères d'alginate, ce qui signifie que les CSM conservent leur degré de différenciation. Une étude réalisée par Okumura *et al.* (Okumura, 1997) suggère que l'hydroxyapatite pourrait faciliter la différenciation ostéogénique des CSM. Nous ne pouvons déterminer si c'est la nature du matériau support ou la structure tridimensionnelle qui est responsable de cette différenciation, même si la culture des CSM dans une configuration à 3 dimensions est probablement plus proche de la réalité *in vivo* qu'une culture en monocouche à 2 dimensions (Heng, 2004).

Les études en site orthotopique sont certes plus proches de la réalité clinique, mais présentent l'inconvénient de provoquer la libération de signaux chémo-attractants et angiogéniques lors de la réalisation de la perte de substance osseuse, ce qui peut entraîner un biais dans l'étude du phénomène de réparation osseuse. Les études en site extra-osseux permettent probablement d'évaluer plus précisément l'apport réel des différentes techniques de reconstruction osseuse envisagées. C'est la raison pour laquelle nous avons privilégié une implantation en site extra-osseux.

In vivo, des billes d'alginate seules au sein d'un lambeau périosté vascularisé ne génèrent pas de formation osseuse, mais une simple minéralisation périphérique. Par contre, l'association de CSM encapsulées dans des billes d'alginate et d'un lambeau périosté entraîne la néoformation d'os lamellaire chez le rat après 10 semaines d'implantation.

Cette étude ne nous permet pas de conclure sur le rôle précis du lambeau périosté. Un lambeau périosté seul n'entraîne pas de formation de tissu osseux, mais l'implantation de billes d'alginate+CSM au sein d'un lambeau périosté vascularisée est-elle plus efficace qu'au sein d'un lambeau musculaire vascularisé ? Néanmoins, dans d'autres expérimentations n'utilisant pas les CSM, le potentiel d'un lambeau périosté dans la néoformation osseuse en site hétérotopique et orthotopique a déjà été démontré par plusieurs auteurs (Payement, 1996 ; Romana, 1990 ; Vogelín, 2002). Hertel *et al.*, par exemple, ont reconstruit des pertes de substance osseuses de 7 cm au niveau du tibia chez la chèvre en associant de l'autogreffe spongieuse avec soit un lambeau périosté vascularisé, soit un lambeau musculaire vascularisé. Les animaux traités avec un lambeau périosté vascularisé ont généré une quantité et une qualité supérieures d'os néoformé en comparaison de ceux traités avec un lambeau musculaire vascularisé (Hertel, 1994).

L'équipe de Warnke rapporte un cas clinique de réparation d'une perte de substance mandibulaire étendue par un lambeau ostéo-musculaire préfabriqué sur mesure à l'intérieur du muscle grand dorsal d'un patient adulte. Des reconstructions 3D ont été utilisées pour créer une cage en titane qui a été remplie d'os déminéralisé, de 7 mg de BMP2 et de 20 ml de moelle osseuse du patient. La cage a été implantée dans le muscle grand dorsal et 7 semaines plus tard, transplantée comme un lambeau libre ostéomusculaire pour réparer la mandibule. Une scintigraphie osseuse a montré *in vivo* le remodelage osseux et la minéralisation à l'intérieur du lambeau à la fois avant et après la transplantation. Une tomодensitométrie a prouvé la réalité d'une néoformation osseuse. L'induction osseuse hétérotopique à l'intérieur du muscle grand dorsal est possible chez l'homme, permettant d'éviter la création d'une lésion osseuse secondaire et fournit également un bon résultat en trois dimensions (Warnke, 2004).

D. APPLICATIONS DE THERAPIE CELLULAIRE EN CHIRURGIE PLASTIQUE : CICATRISATION

Les cellules souches mésenchymateuses ont une place démontrée dans la cicatrisation et la réparation cellulaire cutanée. En effet, elles n'ont certes pas la capacité de différenciation en kératinocytes, mais elles libèrent dans le milieu environnemental des facteurs de croissance, permettant de mobiliser les cellules basales résiduelles. Des essais réalisés chez la souris avec des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine ont montré cette potentialité d'aide à la cicatrisation en cas d'irradiation aiguë localisée (François, 2007 ; Mourcin, 2005 ; Doucet, 2005). Les analyses histologiques ont mis en évidence ces cellules au niveau de la peau, mais en très petite quantité après les injections. Elles migrent spontanément vers les tissus lésés, quelque soit leur mode d'administration par voie locale ou systémique, et s'opposent aux réactions en chaîne de l'inflammation. L'équipe de Percy a publié à ce jour 4 cas cliniques d'utilisation des CSM, dans la prise en charge des irradiations aiguës localisées, comme un traitement adjuvant complémentaire et indissociable de la chirurgie (Bey, 2007 ; Lataillade, 2007, Bey, 2010). Les cellules utilisées étaient obtenues après prélèvement médullaire iliaque et cultivées en une quinzaine de jours (Doucet, 2005). Ils ont observé des phénomènes de cicatrisation particulièrement remarquables et également la disparition des douleurs liées à ce type d'agression.

L'exploitation des CSM est étudiée dans plusieurs domaines de la médecine régénérative (orthopédie, chirurgie plastique, cardiologie, neurologie) mais aussi dans le traitement des cancers et de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Alors que, dans certains de ces domaines, la recherche en est encore à un stade assez fondamental, dans d'autres les premiers essais cliniques humains ont déjà fourni des résultats préliminaires prometteurs. Malgré tout, il reste un énorme travail de recherche à fournir de façon à mieux caractériser ces cellules et leurs modes d'action, mais aussi à confirmer les résultats de ces études cliniques préliminaires.

3. Risques et perspectives

À ce jour, à l'exception des greffes de peau, de tissu graisseux et de moelle osseuse, il n'existe pas de thérapie systématique utilisant la transplantation de cellules souches, qu'il s'agisse de cellules souches indifférenciées ou de cellules plus ou moins différenciées *in vitro*. Enfin, on ne sait pas contrôler la multiplication et le maintien de la différenciation des cellules *in vivo*, une fois qu'elles sont administrées au patient.

Les greffes faisant intervenir des cellules souches adultes qui ne posent pas de problèmes majeurs concernent les **autogreffes** (cellules, tissus du patient), par exemple, la greffe de peau chez les grands brûlés, l'injection de graisse à visée de comblement ou la transplantation de moelle osseuse dans les cas de patient ayant eu une irradiation intensive suite à une leucémie.

L'un des traitements les plus anciens faisant intervenir des cellules souches adultes est la transplantation de moelle osseuse, dans laquelle des CSH sont transférées via une **allogreffe** de moelle osseuse issue d'un donneur adulte.

Elle est utilisée de façon routinière depuis les années 1970 en hématologie et permet de traiter certaines maladies du sang et du système immunitaire. Dans tous les cas de figure, la technique de thérapie cellulaire consiste à transférer des cellules souches dans le tissu à réparer puis à obtenir et à maintenir une différenciation adéquate *in vivo*. Les techniques reposent sur le transfert de CSH allogéniques, c'est-à-dire qui proviennent d'un donneur HLA-compatible.

A. AUTOGREFFE OU ALLOGREFFE DE CSH

Deux problèmes se posent pour les CSH :

*la **quantité de cellules à transplanter**. Pour y remédier, dans le cadre des protocoles expérimentaux précédents, le donneur doit recevoir avant le prélèvement des cellules un traitement (G-CSF+/-Plerixafor) qui stimule la multiplication des cellules souches présentes dans le sang ou la moelle osseuse.

*la **compatibilité immunologique** et le **risque de rejet** du transplant/greffon. Pour le limiter, de façon générale pour tous les protocoles thérapeutiques, la réussite de la thérapie cellulaire

requiert que le donneur et le receveur soient les plus HLA-compatibles possibles. Cela signifie qu'ils doivent présenter des antigènes d'histocompatibilité (HLA) les plus proches possibles. Cette condition obligatoire limite fortement le nombre de greffon disponible. En outre, le receveur sera traité «à vie» avec des immunosuppresseurs afin de réduire ses défenses immunitaires, condition requise pour le succès de la greffe. L'inconvénient est qu'il devient alors plus sensible aux agents pathogènes et infectieux.

Par contre, les CSH ne nécessitent pas de culture *ex vivo* avant utilisation.

B. AUTOGREFFE OU ALLOGREFFE DE CSM

Ces 2 problèmes ne se poseraient pas pour les CSM :

*la **quantité de cellules à transplanter**. Pour y remédier, dans le cadre de la plupart des protocoles expérimentaux, elles sont obtenues au niveau de la moelle osseuse ou de la graisse superficielle chez l'homme, puis sont multipliées en culture *ex vivo*. La quantité de cellules nécessaires pour être efficace reste encore inconnue.

*la **compatibilité immunologique** et le **risque de rejet** du transplant/greffon. La particularité des CSM est que l'on pourrait envisager de les utiliser en autogreffe, mais également en allogreffes sans problèmes particuliers, car leurs propriétés immunosuppressives pourraient permettre de les exploiter sans traitement pharmacologique immunosuppresseur.

Par contre, les CSM nécessitent une culture *ex vivo* avant utilisation, ce qui oblige à envisager d'autres risques : les infections, les différenciations inappropriées, les cancers et l'acquisition de caractères cytogénétiques anormaux en culture.

*Comme pour toutes les greffes, les transplantations et les transfusions, il faut s'assurer que le donneur de cellules souches ne soit pas porteur d'agents pathogènes transmissibles. Il faut s'assurer également que la culture des cellules souches est saine, exempte de contamination microbienne.

*Si on transplante dans un organe lésé des cellules souches provenant d'un autre tissu, ces cellules pourraient générer des types cellulaires inadéquats non compatibles avec la fonction du tissu/organe à restaurer.

*Les similitudes entre cellules cancéreuses et cellules souches font craindre que ces dernières puissent se transformer en cancers ou promouvoir le développement de tumeurs préexistantes.

*Un autre risque vient des méthodes de culture *ex vivo* de ces cellules qui pourrait entraîner l'acquisition de caractères cytogénétiques anormaux.

Dans la littérature, certains auteurs ont décrit des modifications cellulaires de CSM dues à un nombre de repiquages élevés (Tolar, 2007) : des modifications caryotypiques avec la perte du chromosome 7, la présence anormale de 2 chromosomes X, une perte progressive de l'inhibition de contact, et même une transformation en cellules ostéosarcomateuses (Rubio, 2005). Cette étude était contraire aux résultats de nombreux laboratoires utilisant les CSM. D'autres données montrent que l'apparition de cellules aneuploïdes au cours de la culture des CSM n'est pas liée aux conditions de culture mais qu'elle pourrait être donneur-dépendant, et qu'elle correspondrait à la sénescence de ces cellules, écartant ainsi tout risque de transmission de ces caractères anormaux. Malgré tout, une méthode validée et reproductible de culture des CSM semble nécessaire pour harmoniser les résultats pré-cliniques et envisager des applications cliniques en toute sécurité.

Enfin, bien que les CSM soient utilisées dans des essais cliniques depuis plusieurs années, leurs effets à long terme sur les fonctions immunes ainsi que les risques tumorigènes qui en découlent restent toujours controversés. Le risque potentiel d'un traitement avec les CSM vient justement du fait qu'elles soient capables d'inhiber des réponses immunes et de promouvoir la croissance de tumeurs et métastases. Certaines questions restent donc à élucider, et mieux comprendre ces problématiques permettra d'appliquer ces nouvelles connaissances concernant les CSM au développement de thérapies cliniques efficaces.

III. Le tissu adipeux

A. Un organe et une source de CSM

Il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun (Cinti, 2005).

1) Tissu adipeux blanc (TAB)

Le tissu adipeux blanc (TAB) est probablement l'organe où le degré de nos connaissances et la variété de fonctions ont évolués le plus ces quinze dernières années.

Pendant longtemps, il a été considéré comme un organe relativement inerte stockant de l'énergie sous forme de triglycérides. Sécrétant une vaste gamme de peptides d'actions variées et multiples, c'est devenu un organe central du métabolisme et de l'inflammation. En effet, certains de ces peptides ont tout d'abord inscrit leurs effets dans le catalogue des effets métaboliques, mais par la suite d'autres propriétés telles que celles liées à l'inflammation ont été démontrées pour des hormones telles que la **leptine** et l'**adiponectine**. D'autres protéines sont des cytokines bien caractérisées telles que IL-6 et IL-1, et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) ou encore le TNF α , dont les effets vont bien au-delà de leurs propriétés pro- ou anti-inflammatoires.

Le TAB est constitué d'adipocytes, cellules différenciées gorgées de lipides. Les adipocytes représentent 40 à 60% des types cellulaires du tissu adipeux. Les adipocytes sont émaillés par un réseau de fibres de réticuline (fibre de collagène de type III) (Nakajima, 1998). Le tissu conjonctif de soutien (riche en fibres de collagène de type I) est traversé par de très nombreux vaisseaux capillaires, ainsi que par des fibres nerveuses orthosympathiques noradrénergiques. Les autres éléments cellulaires du stroma sont des leucocytes tissulaires (des histiocytes et des mastocytes), ainsi que des cellules de type fibroblastique parmi lesquelles on suppose l'existence des CSM/progénérateurs du tissu adipeux.

On distingue sur des critères anatomiques et fonctionnels, trois types de tissus adipeux blancs : le TAB de structure, le TAB de réserve et le TAB de la moelle osseuse.

a. TAB de structure

Il constitue un support adaptatif face à des contraintes mécaniques et de pressions au niveau de nombreux organes qu'il entoure (reins, ganglions lymphatiques, graisse périorbitaire des yeux, etc). Ce tissu adipeux possède ainsi un rôle de protection, ou de répartition des charges (coussinets palmo-plantaires, zones périphériques des grosses articulations). Ce tissu adipeux peut aussi représenter un tissu de comblement transitoire dans des organes ou tissus soumis à remaniements. C'est le cas des seins chez la femme, où le tissu adipeux occupe une grande part volumique en dehors des épisodes de lactation où les glandes mammaires vont se développer pour devenir sécrétrices.

Par définition, le tissu adipeux de structure est peu sensible aux conditions nutritionnelles ; il ne varie que peu, même dans des conditions d'amaigrissement extrême : il ne disparaît jamais totalement.

b. TAB de réserve

Le tissu adipeux de réserve est très largement répandu. Il occupe principalement les zones sous-cutanées ainsi que la cavité abdominale. Son rôle principal est le stockage des nutriments énergétiques sous forme de triglycérides. A noter également, que ce tissu adipeux sécrète de nombreuses hormones (leptine, adiponectine.) dans la circulation générale impliquées notamment dans la régulation du métabolisme énergétique ; et à ce titre il est considéré comme faisant parti du système endocrinien (Ailhaud, 2006 ; Chudek, 2006). Enfin ce tissu possède de fortes capacités d'isolement thermique assurant ainsi une protection contre le froid.

Le tissu adipeux blanc de réserve est particulièrement sensible aux conditions métaboliques, s'hypertrophiant en réponse à un régime hypercalorique, ou à l'inverse, s'hypotrophiant au cours des carences d'apport où il peut quasiment disparaître laissant place à des pré-adipocytes conséquence de la lipolyse intense qu'on subit les adipocytes. L'hypertrophie du tissu adipeux se caractérise à l'échelle cellulaire d'abord par l'hypertrophie d'adipocytes préexistants, puis se poursuit par une hyperplasie qui nécessite un recrutement de cellules souches/progéniteurs/précurseurs dans l'adipogenèse (prolifération et différenciation).

c. TAB de la moelle osseuse

Les adipocytes sont le type cellulaire quantitativement majoritaire dans la moelle osseuse. Ces adipocytes ainsi que leurs progéniteurs CSM, via vraisemblablement des interactions paracrines, auraient un rôle trophique positif sur l'hématopoïèse (Corre, 2004 ; Cheng, 2000 ; Mbalaviele, 1999) ainsi que sur l'ostéogenèse (Figure 25).

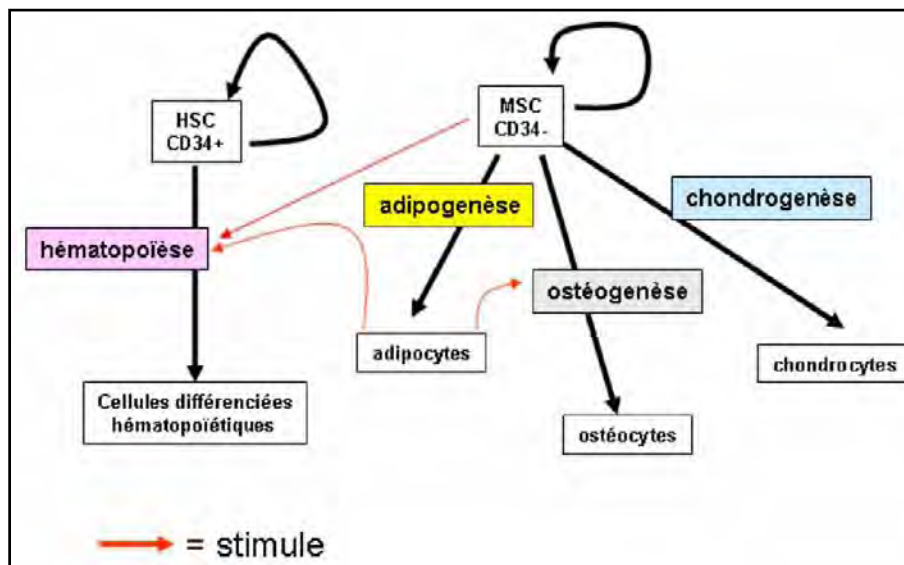


Figure 25 : Relations trophiques entre les lignées hématopoïétique et mésenchymateuse

Au cours de l'embryogenèse, le tissu adipeux n'est pas détectable de façon macroscopique. Peu d'informations sont disponibles sur le développement du TAB. Dans le tronc et les membres, le TAB se forme principalement après la naissance dans les territoires mésenchymateux. Le mésenchyme étant d'origine mésodermique, on peut supposer que les adipocytes sont issus de progéniteurs mésodermiques mésenchymateux.

A ce jour l'ontogénie des adipocytes n'est pas clairement identifiée, en excluant les adipocytes de l'extrémité céphalique pour lesquels une origine neurectodermique a pu être établie.

2) Tissu adipeux brun (TABr)

Il est largement répandu chez les animaux hibernant, et est spécialisé dans la thermogénèse, c'est-à-dire la production de chaleur (Sell, 2004). Cette thermogénèse permet à ces animaux de conserver un minimum de température dans l'attente du réveil. Les dépôts de TABr sont beaucoup plus vascularisés que le tissu blanc. A la différence des adipocytes blancs, les adipocytes bruns sont **directement** innervés par des efférences orthosympathiques

noradrénergiques. Ces efférences contrôlent positivement la lipolyse et la mitochondrogenèse dans les adipocytes bruns.

Chez l'homme le TABr est bien développé chez le nouveau-né; son rôle serait de protéger ce dernier de l'agression thermique qu'il subirait à sa naissance. Le tissu brun disparaît ensuite assez rapidement. Chez l'adulte, le tissu adipeux brun en tant que tel n'existe plus, mais des adipocytes bruns (ou de phénotype proche) peu fréquents pourraient persister dispersés au sein du tissu adipeux blanc.

B. Interactions avec le métabolisme osseux

Les chercheurs ne s'intéressent au tissu adipeux et aux adipocytes que depuis quelques années. Pendant longtemps, on n'accordait au type adipeux qu'un rôle de réserve énergétique mais pas de fonction métabolique majeure. Depuis la découverte de cytokines régulatrices sécrétées par les adipocytes, il fait désormais l'objet de nombreuses voies de recherche.

Chez un sujet non obèse, le tissu adipeux est composé de 20 à 30 milliards d'adipocytes. Le tissu adipeux représente de 20 à 25 % de la masse totale chez la femme, 15 à 20 % chez l'homme. L'obésité est un excès de tissu adipeux et est définie par un indice de masse corporel supérieur à 30 kg/m² [IMC = poids (kg) / taille² (m²)]. Les études épidémiologiques ont montré que l'obésité augmentait la survenue de nombreuses pathologies (maladies gastro-intestinales, métaboliques, cardiovasculaires...) (Klein, 2002).

Par la sécrétion de nombreuses cytokines (aussi appelées adipocytokines ou adipokines), les adipocytes participent à la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, à la thermorégulation mais aussi à la **régulation du métabolisme osseux**. En effet, la masse corporelle totale influence le renouvellement osseux et sa densité. Ainsi, un poids léger est un facteur de risque d'ostéoporose. Plus particulièrement, la masse grasseuse est directement corrélée à la densité osseuse : plus la masse grasseuse augmente, plus la densité osseuse augmente et moins le risque fracturaire est élevé (Reid, 2008).

Le tissu adipeux sécrète de nombreuses adipocytokines (leptine, adiponectine, résistine...) et autres cytokines (TNF- α , IL-6, angiotensine II, plasminogen activator inhibitor-1...). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la leptine et l'adiponectine, deux adipocytokines spécifiques du tissu adipeux (Cornish, 2009 ; Housa, 2006).

1) *Leptine*

La leptine est une cytokine produite et sécrétée quasi-exclusivement par les adipocytes. C'est la première hormone du tissu adipeux à avoir été identifiée en 1994 (Zhang, 1994).

La concentration plasmatique de la leptine est habituellement proportionnelle à la masse grasse. Son action essentielle est de diminuer la prise alimentaire grâce à sa fixation sur l'hypothalamus. Sa présence en quantité plus importante augmente aussi la dépense énergétique en majorant la production de chaleur par l'organisme (thermogenèse).

Sur le plan métabolique, une sécrétion importante de cette cytokine induit une lipolyse, inhibe la lipogenèse et augmente la sensibilité à l'insuline. Par ailleurs, elle diminue également la sécrétion en insuline. À l'inverse, le manque de leptine induit une augmentation du stockage de masse grasse ainsi qu'une augmentation de l'affinité pour les aliments.

La leptine participe aussi à la régulation du métabolisme osseux. L'expression de récepteurs à la leptine à la surface des ostéoblastes suggère une action périphérique directe de cette adipokine sur le renouvellement osseux. La leptine semble favoriser la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et inhiber l'ostéoclastogénèse par la réduction de l'expression de RANK et l'augmentation des taux d'ostéoprotégérine (Cornish, 2009 ; Cornish, 2002 ; Holloway, 2002).

Par une action centrale indirecte au niveau de récepteurs hypothalamiques, la leptine pourrait aussi avoir des effets inverses sur le métabolisme osseux. Via le système nerveux sympathique, la leptine pourrait inhiber la formation osseuse (Ducy, 2000 ; Takeda, 2002).

2) *Adiponectine*

L'adiponectine est une adipocytokine sécrétée exclusivement par les adipocytes. La concentration plasmatique en adiponectine est inversement corrélée à la masse grasse et à l'indice de masse corporel. Ses principales fonctions sont anti-athéromateuse, anti-inflammatoire et insulino-sensibilisante. Elle participe aussi au métabolisme glucidique et lipidique.

Les récepteurs à l'adiponectine (Adipo-R1 et R2) ayant été mis en évidence à la fois sur les ostéoblastes et sur les ostéoclastes, la participation de cette cytokine au métabolisme osseux est très probable, mais elle a fait l'objet de publications discordantes. Selon certains auteurs, l'adiponectine stimule *in vitro* la croissance et la différenciation ostéoblastique et inhibe l'ostéoclastogénèse (Williams, 2009 ; Oshima, 2005 ; Yamaguchi, 2007).

Cependant, les effets *in vivo* de l'adiponectine sur la masse osseuse chez ces mêmes auteurs sont opposés, montrant une diminution de la masse osseuse (Williams, 2009 ; Oshima, 2005).

Une autre publication ne met pas en évidence de variation de la masse osseuse chez des modèles murins surexprimant ou n'exprimant pas l'adiponectine, et observe même une inhibition de la croissance ostéoblastique *in vitro* (Shinoda, 2006).

Les effets de l'adiponectine sur la formation osseuse, par des actions directes et indirectes (modulation de la sensibilité à l'insuline) sont donc encore très mal connus. Cependant, la somme des informations suggère une influence négative de l'adiponectine sur la masse osseuse *in vivo* (Cornish, 2009).

C. Le lipomodelage

1) *Historique et description de la technique*

L'utilisation du tissu adipeux comme produit de comblement en chirurgie plastique et esthétique est ancienne et a fait l'objet de nombreuses études. C'est à la fin du XIXe siècle que l'utilisation d'un greffon graisseux autologue est rapportée pour la première fois. Les idées et les techniques ont fortement évolué au cours du siècle dernier.

Dès que les premières **lipoaspirations** ont été réalisées, les chirurgiens plasticiens ont eu l'idée de réutiliser la graisse ainsi extraite pour la réinjecter en un autre endroit du corps, dans un but de comblement. Cette technique de réinjection de graisse autologue, appelée **lipomodelage**, s'est longtemps avérée décevante : la graisse réinjectée avait tendance à se résorber dans une proportion importante, rendant les résultats aléatoires et éphémères.

La greffe d'adipocytes a bénéficié d'un regain d'intérêt ces dernières années en particulier du fait de la description de la **technique de Coleman** (Coleman, 1995 ; Coleman, 1997), qui est

un procédé récent de greffe d'adipocytes, basé sur un matériel spécifique et une méthodologie stricte.

Le principe est de réaliser une véritable autogreffe de cellules graisseuses par réinjection de la graisse prélevée sur le patient lui-même.

Il faut cependant garder à l'esprit que le lipomodélage doit toujours être considéré comme une véritable intervention chirurgicale qui doit être réalisée par un chirurgien plasticien compétent et qualifié, formé spécifiquement à ce type de technique et exerçant dans un contexte réellement chirurgical.

Chaque chirurgien adopte une technique qui lui est propre et qu'il adapte à chaque cas pour obtenir les meilleurs résultats.

Toutefois, on peut retenir des **principes de base communs** :

- repérage précis des zones de prélèvement ainsi que des sites de réinjection de la graisse.
- prélèvement du tissu graisseux de façon atraumatique par une micro-incision cachée dans les plis naturels, à l'aide d'une très fine canule d'aspiration.
- centrifugation de 3 minutes à 3000 tours, de manière à isoler la graisse purifiée
- réinjection du tissu graisseux, à l'aide de micro-canules par plusieurs incisions de 1 mm, dans différents plans et selon des directions multiples et divergentes, afin d'augmenter la surface de contact entre la graisse implantée et les tissus receveurs.

La durée de l'intervention est fonction de la quantité de graisse à réinjecter et du nombre de localisation à traiter. Elle peut varier de 30 minutes à 2 heures en cas de lipomodélage isolé.

2) Indications et controverses

On peut résumer les indications de ce type d'intervention de la manière suivante :

*Les indications d'ordre **esthétique** :

- Le comblement et l'atténuation de certaines rides, notamment au niveau du visage.
- La restauration des volumes et des formes du visage : il peut s'agir notamment de la restauration d'un visage émacié par le vieillissement.
- Un complément associé à certains liftings cervico-faciaux pour améliorer le galbe du tiers moyen de la face.

*Les indications en chirurgie **plastique et reconstructrice** :

- Le comblement d'une dépression tissulaire à la suite d'une intervention chirurgicale ou d'un traumatisme (en particulier en reconstruction mammaire).
- La correction d'irrégularités secondaires à une lipoaspiration mal conduite.
- La correction des fontes graisseuses après trithérapie chez les patients porteurs du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

La chirurgie carcinologique dite «conservatrice» est très souvent mutilante et certains patients sont demandeurs d'améliorations fonctionnelles et/ou esthétiques de la rançon cicatricielle secondaire au geste d'exérèse. La technique actuelle de greffe d'adipocytes est une technique simple, efficace et reproductible. Elle semble à ce jour être le meilleur moyen de restaurer les défauts de volume. Son application dans tous les domaines de la chirurgie plastique constitue un apport essentiel à la spécialité.

A l'exception d'une recommandation en 1987 de la Société Américaine de Chirurgie Plastique et Reconstructrice rapportant que le lipomodelage au niveau mammaire pouvait induire des microcalcifications susceptibles de perturber la détection mammographique du cancer du sein, le lipomodelage est considéré comme un geste sans risque, en particulier en raison de son caractère autologue.

Différents travaux scientifiques ont montré le caractère atraumatique de cette technique et la survie du tissu adipeux transplanté (Lidagoster, 2000 ; Markey, 2000 ; Baran, 2002 ; Rieck, 2003a). Cependant, peu de publications portent sur les interactions potentielles entre le tissu adipeux injecté et le tissu receveur, en particulier dans un contexte post-tumoral (Gosset, 2008).

Pour améliorer la survie du tissu adipeux transplanté, la richesse en CSM semble un élément primordial. Il existe donc en chirurgie plastique un intérêt croissant pour des systèmes per-opératoires utilisant des enzymes spécifiques de type collagénase, qui permettraient de concentrer les CSM prélevées au milieu de la graisse superficielle chez l'homme. Ces CSM pourraient ensuite être réintroduites dans la graisse injectée, augmentant ainsi sa capacité de survie de façon très importante (Rieck, 2003b).

Cependant, des études récentes montrent que le microenvironnement des cellules tumorales joue un rôle important dans l'initiation du processus néoplasique, sa progression et sa dissémination métastatique. Les cellules d'origine mésenchymateuses semblent y avoir un rôle central. Elles pourraient être responsables des récurrences locales tardives ou des évolutions métastatiques différées.

L'injection de graisse autologue à proximité d'une éventuelle tumeur provoque une modification majeure de son microenvironnement (apport d'adipocytes et d'Ad-CSM, sécrétant de multiples cytokines) susceptible d'influer sur sa progression et sa dissémination métastatique.

Le lipomodélage est essentiellement utilisé en chirurgie reconstructrice dans le cadre du traitement du cancer du sein :

- après chirurgie radicale (mastectomie) : corrections de volume après reconstruction mammaire par lambeau autologue ou prothèse
- après chirurgie conservatrice (tumorectomie) : correction des séquelles esthétiques de traitements conservateurs.

Si son efficacité n'est plus remise en question, son innocuité est toujours en cours d'évaluation.

Ces nouvelles données ont contribué en décembre 2007 à l'émission d'une recommandation par la Société Française de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique concernant l'injection de graisse dans le sein.

"Les autogreffes de tissu graisseux ont largement prouvé leur efficacité et leur innocuité au niveau de toutes les régions du corps, avec un double effet remarquable de comblement et d'amélioration de la trophicité des tissus injectés.

Au niveau de la glande mammaire toutefois, et à ce niveau seulement, les données scientifiques acquises sont encore actuellement insuffisantes en ce qui concerne les éventuelles interactions du tissu graisseux injecté avec la glande mammaire.

Dans l'attente de données complémentaires, la SoFCPRE ne cautionne pas l'injection de tissu graisseux autologue dans la glande mammaire en dehors du cadre de protocoles de recherche clinique, comportant en particulier un suivi des patientes à moyen et à long terme."

Avant-propos

1/ Le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (LPRO, INSERM U957) cherche à développer de nouvelles voies thérapeutiques de l'ostéosarcome puisque la réponse au traitement de référence est insuffisante.

Les CSM pourraient donc avoir un double intérêt dans le traitement de l'ostéosarcome : servir de vecteur pour produire une protéine thérapeutique à activité anti-tumorale ou anti-résorption osseuse et participer à la reconstruction du tissu osseux souvent dégradé près du site tumoral. Cependant, leurs effets apparaissent très variables dans un contexte tumoral, avec une activité anti- ou pro-tumorale. De plus, le microenvironnement d'où proviennent les CSM jouerait un rôle primordial dans le développement des ostéosarcomes, or les interactions entre CSM et ostéosarcomes sont encore mal connues.

La première partie de ce travail vise à aboutir à une meilleure connaissance des interactions entre CSM et cellules d'ostéosarcome. Les objectifs sont d'évaluer le potentiel des CSM comme **outil thérapeutique** dans des modèles murins d'ostéosarcomes. Si les CSM se révèlent plutôt jouer un rôle pro-tumoral, elles représenteront alors elles-mêmes une nouvelle **cible thérapeutique** et pour cela il nous faut décrypter les processus moléculaires impliqués.

2/ En chirurgie plastique et reconstructrice, des greffes autologues de graisse (lipomodelage) peuvent être proposées pour corriger les séquelles esthétiques consécutives à la chirurgie d'exérèse des tumeurs osseuses. Cependant, un cas de récurrence locale tardive d'ostéosarcome après lipomodelage de la région concernée a été observé par les services de Chirurgie Plastique et d'Orthopédie du CHU de Nantes. Une récurrence locale d'un ostéosarcome 10 ans après la prise en charge initiale est un événement exceptionnel, en particulier dans ce cas précis, en raison du sous-type de la tumeur (ostéosarcome téléangiectasique) et de la bonne réponse à la chimiothérapie.

Dans ce contexte, la seconde partie de ce travail vise à comprendre les interactions complexes qui existent d'une part entre les cellules d'ostéosarcome et la graisse, et d'autre part entre les cellules d'ostéosarcome et les CSM contenues dans la graisse (Ad-CSM). Les objectifs sont d'aboutir à l'encadrement de la technique chirurgicale de **lipomodelage**, en particulier dans un environnement post-tumoral.

La mise en place de protocoles pré-cliniques pour répondre à ces questions apparaît importante pour accompagner sans risque l'évolution de pratique chirurgicale de reconstruction tissulaire post-tumorale et le développement de thérapie cellulaire anti-cancéreuse.

Partie 1 :

Précurseurs ostéoblastiques et thérapie cellulaire dans l'ostéosarcome

Le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (LPRO) (unité INSERM U957) cherche à développer de nouvelles voies thérapeutiques de l'ostéosarcome puisque la réponse au traitement de référence (chimiothérapie et chirurgie) est insuffisante. L'ostéolyse est une cible thérapeutique potentielle car ce mécanisme physiologique est exacerbé lors du développement de tumeurs osseuses et stimule en retour la progression tumorale (Figure 15). La preuve en a été faite dans des études pré-cliniques où des molécules anti-résorption osseuse telles que l'ostéoprotégérine (OPG) ou le récepteur activateur de NF- κ B (Rank) sous une forme soluble (Rank-Fc) ont été produites *in vivo* par transfert transitoire de gènes et ont montré un véritable potentiel anti-tumoral (Lamoureux, 2007b ; Lamoureux, 2008). Afin de stabiliser l'expression de telles molécules, nous avons proposé d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou les précurseurs ostéoblastiques comme vecteur. Par leurs propriétés de différenciation vers la voie ostéoblastique, ces cellules pourraient participer à la reconstruction du tissu osseux souvent dégradé près du site tumoral.

L'objectif de mon projet de doctorat était d'évaluer les **potentialités thérapeutiques** des CSM ou des précurseurs ostéoblastiques dans la prise en charge de l'ostéosarcome.

Avant d'envisager d'utiliser ces cellules modifiées, comme une alternative thérapeutique dans l'ostéosarcome, il convient de connaître leur effet sur la tumeur elle-même. De plus, l'environnement médullaire osseux d'où proviennent ces cellules jouerait un rôle primordial dans le développement des ostéosarcomes, comme cela a été démontré pour les tumeurs osseuses secondaires (Casimiro, 2009).

Dans la littérature, on retrouve des effets contradictoires pro ou anti-tumoraux en fonction des types de tumeurs et des modèles étudiés :

***anti-tumoral** sur le sarcome de Kaposi (Khakoo, 2006), le carcinome hépatique (Qiao, 2008), l'adénocarcinome pancréatique (Cousin, 2009), la leucémie (Zhu, 2009), le cancer du sein (MCF7) (Qiao, 2008)

***pro-tumoral** sur le mélanome (Hung, 2005 ; Djouad, 2006), le glioblastome et l'adénocarcinome bronchique (Yu, 2008), le cancer du sein (4T1) (Muehlberg, 2009)

***pro-métastatique** sur le cancer du sein (MCF7/Ras31 et MDA-MB-231) (Karnoub, 2007).

Dans le sarcome de Kaposi, l'équipe de Khakoo a démontré que les CSM sans modifications génétiques, injectées par voie systémique, migraient jusqu'à la tumeur et avaient un effet antitumoral, en inhibant la protéine kinase Akt. Cette inhibition s'effectuerait par contact cellulaire direct (Khakoo, 2006).

Dans le gliome, Nakamura *et al.* ont observé un fort tropisme des CSM pour la tumeur. Et, une fois modifiées pour exprimer une substance anti-tumorale, elles ont permis une diminution du volume tumoral (Nakamura, 2004 ; Nakamizo, 2005).

Par contre, dans le mélanome et le cancer du colon, un effet pro-tumoral des CSM a été décrit (Hung, 2005 ; Sun, 2008). Cette action pro-tumorale serait multifactorielle : soit, par les caractéristiques immunologiques des CSM (Djouad, 2003) ; soit, par la sécrétion de facteurs angiogéniques (Sun, 2008) ; soit, par la stimulation par les CSM de la sécrétion de cytokines (ex : CCL5) (Karnoub, 2007).

Dans plusieurs publications, les CSM favorisaient également la dissémination métastatique dans le cancer du sein (Karnoub, 2007 ; Fierro, 2004).

En ce qui concerne l'ostéosarcome, rien n'était encore écrit sur le sujet au début de mon travail de thèse. Notre objectif était de connaître l'action des CSM ou des précurseurs ostéoblastiques sur le développement tumoral des cellules d'ostéosarcomes, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Pour éviter, *in vivo*, toutes interactions avec les CSM et les précurseurs ostéoblastiques présents dans l'environnement osseux, nous avons réalisé des expérimentations hors tissu osseux.

Cette première partie visait donc à aboutir à une meilleure connaissance de ces interactions entre CSM ou précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes, et à évaluer le potentiel thérapeutique des CSM ou des précurseurs ostéoblastiques dans les modèles murins (souris et rat) d'ostéosarcomes disponibles au laboratoire LPRO.

Elle comprenait quatre étapes :

** Obtention et caractérisation des CSM ou des précurseurs ostéoblastiques d'origines variées : CSM de rat et de souris issues de la moelle osseuse, pré-ostéoblastes de rat (pré-ob) issus de la calvaria.*

** Etudes in vitro des interactions entre CSM ou précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes POS-1 (souris) ou OSRGa (rat).*

** Etudes in vivo des interactions entre CSM ou précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes POS-1 (souris) ou OSRGa (rat).*

** Utilisation des CSM ou des précurseurs ostéoblastiques dans des protocoles pré-cliniques d'ostéosarcomes.*

I. Matériel et méthodes

A. Milieux et solutions

*Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute ; Biowhittaker, Verviers, Belgique) contenant de la L-glutamine

*Milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Biowhittaker) contenant 4,5 g/L de glucose et 2 mM de L-glutamine

*Milieu α MEM (Minimum Essential Medium- α ; Biowhittaker) ne contenant pas de L-glutamine

*Antibiotiques (ATB) (Pénicilline 100 U/mL et Streptomycine 100 mg/L ; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)

*Sérum de Veau Foetal (SVF) (HyClone Perbio, Logan, USA)

*DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sans Ca ni Mg ; Biowhittaker)

*Trypsine-EDTA : trypsine 0,5g/L et EDTA 0,2g/L (Biowhittaker)

*Solution de bleu trypan (Bleu trypan 0,4%, chlorure de sodium 0,81%, phosphate de potassium 0,006% ; Sigma, St Quentin Falavier, France)

*Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France)

*Luciférine 12 mg/mL (Interchim, France)

*Sel de Tétrazolium XTT (Roche) : Sodium 3'-(1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium)-bis(4-méthoxy-6-nitro) benzen sulfonic acid hydrat

*Supports plastiques stériles (Corning, New York, USA ; BD Falcon, Franklin Lakes, USA)

*Chambres de co-cultures : cell culture insert, 3 μ m pore size, PET track-etched membrane 24 well format (BD Falcon, Franklin Lakes, USA)

*Anesthésiants : tous les modèles murins bénéficie d'une induction avec du gaz isoflurane (Florène®, Abbot) / air (1,5%-1 l/min)

Protocole d'entretien pour les souris : 30 ml de PBS, 5mL d'Imalgène 500 (Bayer, Pharma, Puteaux, France) et 3mL de rampun 2% (Merial, Lyon, France), injection intrapéritonéale de 100 μ L pour 100 gr

*Acide ascorbique (L-Ascorbic Acid ; Sigma)

*Dexaméthasone (Sigma)

* β -glycérophosphate (β -glycérophosphate, Disodium Salt ; Sigma)

B. Anticorps utilisés

- *Anticorps de rat couplé FITC anti-CD45 de souris 0,5 mg/mL (Pharmagen Technical Data Sheet, USA) dilué au 1/50ème
- *Anticorps de hamster couplé FITC anti-CD29 de souris 0,5 mg/mL dilué au 1/100ème
- *Anticorps de rat couplé PE anti-CD105 de souris 0,2 mg/mL dilué au 1/50ème
- *Anticorps de souris couplé PE anti-CD90 de rat 1ng/100 000 cellules dilué au 1/100ème
- *Anticorps de souris couplé FITC anti-CD45 de rat 0,1 mg/mL (AbD Serotec, France) dilué au 1/50ème
- *Anticorps isotype contrôle de rat, de hamster, et de souris, couplé FITC IgG2 (Jackson Immuno Research, West Groce, USA)
- *Anticorps isotype contrôle de rat, et de souris couplé PE IgG2 (AbD Serotec, France)

C. Lignées cellulaires

1) *Obtention des précurseurs ostéoblastiques d'origines variées*

**CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE MOELLE OSSEUSE DE RAT (CSM)*

Chez le rat, les CSM ont été isolées à partir de moelle osseuse de rat Sprague-Dawley mâles de 4 à 6 semaines. Après amputation des 2 membres inférieurs, les 2 fémurs et 2 tibias sont disséqués et nettoyés de façon stérile sous hotte à flux laminaire. Les épiphyses sont coupées, puis le fût diaphysaire est nettoyé de sa moelle osseuse à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille contenant une solution d' α MEM 10% SVF avec 1% d'ATB. Les cellules sont centrifugées à 1500 tr/min pendant 5 minutes à température ambiante. L'ensemble des cellules est ensuite remis en suspension dans 10 mL de milieu α MEM 10% SVF avec 1% ATB, etensemencé dans des flasques de 75 cm² (0,33 million de cellules par cm²).

Après 24 heures de culture, le surnageant (contenant les cellules hématopoïétiques non adhérentes) est ôté pour ne laisser que les cellules adhérentes au plastique, représentant potentiellement des CSM. Elles sont décollées lorsqu'elles sont à confluence (entre 7 et 10 jours).

***MODELE DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE SOURIS (CCL226)**

Nous avons tenté d'isoler des CSM à partir de moelle osseuse de deux séries de 2 souris mâles C57BL/6, appelées A-B et C-D.

Pour les souris A et B, 100 000 cellules par cm² en ont étéensemencées avec du milieu α MEM 10% SVF et 1% ATB. Entre 10 et 12 jours de culture ont été nécessaires pour atteindre une confluence cellulaire de 80%. Ensuite, la vitesse de croissance a ralenti dès le premier repiquage et s'est arrêtée définitivement vers le 3^{ème} repiquage.

Afin d'éviter cet arrêt prématuré de la croissance cellulaire, nous avons suivi le protocole décrit par Sun pour les souris C et D (Sun, 2008). Il consiste à ajouter au milieu de culture (α MEM 10% SVF et 1% ATB) un milieu conditionné. Ce milieu conditionné est préparé en récupérant et en cultivant des fragments résiduels de tibia et de fémur dans du milieu α MEM supplémenté avec 20% de SVF pendant 3 jours. Après centrifugation, ce milieu est collecté et ajouté à hauteur de 10% au milieu de culture des cellules de moelle osseuse de souris dès le premier repiquage. Malgré cela, la croissance cellulaire observée a été identique à la première expérience : un ralentissement après chaque passage et un arrêt entre le 3^{ème} et le 4^{ème} repiquage. Aucune amplification cellulaire n'a donc été possible.

Sur les souris A, B, C et D nous avons réalisé une analyse en cytométrie de flux au 3^{ème} repiquage. Des anticorps dirigés contre les antigènes CD105, CD29, CD45 couplés au fluorochrome FITC ont été utilisés indépendamment les uns des autres. En contrôle, un anticorps avec le même isotype, marqué par le même fluorochrome FITC a été utilisé. Il correspond à l'intensité de fluorescence due à une fixation aspécifique des anticorps.

À l'analyse des antigènes CD29, nous avons observé deux populations cellulaires. Une se trouvait sous le contrôle isotypique et était donc négative pour CD29. L'autre population représentant environ 60% des cellules, exprimait CD29 à leur surface et correspondait donc potentiellement à des cellules souches. Pour l'antigène CD105, l'analyse a révélé une population cellulaire hétérogène, les courbes étaient étalées et seulement 20% des cellules étaient positives. L'analyse de l'antigène CD45 a montré que 40% des cellules portaient cet antigène à leur surface. Ainsi, au 3^{ème} repiquage, 40% des cellules étaient des cellules hématopoïétiques, donc seulement 20% des cellules étaient potentiellement des CSM.

Nous avons testé différentes souches de souris (C3H/HeN et C57BL/6) et différentes conditions de culture décrites dans la littérature comme l'addition du facteur de croissance des fibroblastes (bFGF), de milieu conditionné obtenu à partir de fragment d'os ou de sérum de cheval. Les cellules obtenues ne se renouvelaient pas ou très peu en culture. De plus, une forte proportion (jusqu'à 50%) de cellules d'origine hématopoïétique (CD45 positives en cytométrie en flux) a été identifiée dans nos cultures. Chez la souris, l'obtention de CSM de moelle osseuse s'est donc révélée difficile et insatisfaisante.

L'alternative a consisté à utiliser la lignée C3H/10T1/2 (CCL-226) qui correspond à des fibroblastes embryonnaires de souris C3H/HeN. Ces cellules peuvent être considérées comme des CSM, car elles sont capables d'autorenouvellement et peuvent se différencier dans les lignages ostéoblastique, chondroblastique et adipocytaire (Reznikoff, 1973 ; Smith, 1993).

****PRE-OSTEOBLASTES DE RAT ISSUS DE LA CALVARIA (pré-ob)***

Elles sont obtenues après décapitation de rats Sprague-Dawley nouveaux-nés (2-4 jours). La calvaria est disséquée, prélevée, puis fragmentée sous hotte à flux laminaire. Après deux digestions par de la collagénase 0,1 mg/mL, de 30 à 45 minutes à 37°C dans un incubateur, les fragments sont récupérés etensemencés dans des flasques de 25 cm² avec du α MEM 10% SVF avec 1% ATB, puis laissés sans changer de milieu une semaine dans l'incubateur. La confluence est alors surveillée, et elles sont décollées vers 80-90% de confluence.

2) Présentation des lignées cellulaires d'ostéosarcomes murins utilisées

****OSRGA (RAT)***

OSRGA est une lignée de cellules adhérentes, établie à partir d'un ostéosarcome radio-induit chez le rat (Jasmin, 1982). Ces cellules sont entretenues dans du DMEM 10% SVF.

****POS-1 (SOURIS)***

POS-1 est une lignée de cellules adhérentes, obtenue à partir d'un ostéosarcome murin développé spontanément chez une souris de souche C3H/HeN (Uesugi, 2000). Elles sont cultivées en RPMI 10% SVF.

Toutes ces cellules sont incubées dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Les manipulations s'effectuent sous hotte à flux laminaire vertical. Lorsque les cellules sont à 80-90% de confluence, le tapis cellulaire est lavé au DPBS, puis incubé 2 à 3 minutes à 37°C dans 40µL/cm² de trypsine-EDTA, permettant de décoller les cellules du support et de les séparer entre elles. La trypsine est ensuite neutralisée par du milieu de culture supplémenté avec SVF 10%.

D. Caractérisation des lignées cellulaires

1) Analyse par cytométrie en flux

Cent mille cellules par puits sont déposées dans une plaque 96 puits à fond en «V», rincées dans 200 µL de DPBS, puis saturées avec 200 µL de DPBS-BSA 4%.

Les anticorps d'intérêt aux dilutions appropriées, sont ajoutés dans 50 µL.

Les cellules sont incubées avec les anticorps à 4°C, pendant 30 minutes.

Après deux autres rinçages (l'un au DPBS-BSA 4%, l'autre au DPBS), les cellules sont fixées dans du PBS avec 1% de paraformaldéhyde (PFA) et transférées dans un tube pour lecture au cytomètre FACSCalibur™ (BD Biosciences) ou au cytomètre Cytomics™ FC500 (Beckman Coulter). L'acquisition est réalisée, de façon respective, par le logiciel Cellquest Pro ou le CXP™ Cytometer. L'analyse est effectuée, dans tous les cas, à l'aide du logiciel WinMDI.

Pour caractériser les CSM et les pré-ostéoblastes, parmi les divers antigènes membranaires répertoriés, nous avons retenus :

*pour les CSM de rat issues de la moelle osseuse et les pré-ostéoblastes de rat issues de la calvaria: l'antigène CD45 (tyrosine phosphatase, exprimé par les lymphocytes et les CSH) et CD90 (Thy-1, antigène de différenciation en thymocyte 1). L'antigène CD90 est utilisé comme un marqueur d'immaturité cellulaire, puisqu'il est exprimé à la surface des cellules

souches qu'elles soient mésenchymateuses ou hématopoïétiques. Le CD45 est quant à lui présent uniquement sur les cellules de la lignée hématopoïétique.

Ces cellules (CSM ou précurseurs ostéoblastiques de rat) sont donc CD90+ et CD45-.

*pour les fibroblastes embryonnaires de souris CCL226 : l'antigène CD29 ($\beta 1$ intégrine, présent à la surface des lymphocytes B, sur quelques LT, et sur les cellules souches), CD105 (endoglin, présent à la surface des cellules endothéliales et sur les cellules souches) et CD45 (tyrosine phosphatase, exprimé par les lymphocytes et les CSH). Les antigènes CD29 et CD105 sont utilisés comme des marqueurs d'immatunité cellulaire, puisqu'ils sont exprimés à la surface des cellules souches qu'elles soient mésenchymateuses ou hématopoïétiques. Le CD45 est quant à lui présent uniquement sur les cellules de la lignée hématopoïétique.

Ces cellules (modèles de CSM de souris) sont donc CD29+, CD105+ et CD45-.

2) Capacité de différenciation vers la lignée ostéoblastique

Elle est vérifiée à l'aide d'un test de minéralisation. Les précurseurs ostéoblastiques sont ensemencés à 10000 cellules/cm² en plaque 6 puits, puis cultivées dans leur milieu complété avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques jusqu'à confluence (environ 7 jours). La première semaine, les cellules sont cultivées dans leur milieu complété avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques, 50 μ g/ml d'acide ascorbique et 10⁻⁸ M de dexaméthasone. Le milieu est changé tous les 2 jours. La deuxième semaine, 10 mM de β -glycérophosphate sont ajoutés au milieu de culture. Le milieu est alors changé tous les jours. Après deux semaines de culture, une coloration au rouge alizarine est utilisée pour détecter les nodules minéralisés formés *in vitro*. Après avoir retiré le milieu, les cellules sont rincées au DPBS puis fixées une heure avec une solution froide d'éthanol à 70%. L'éthanol est ôté, les cellules fixées sont rincées avec de l'eau distillée et incubées 10 minutes à température ambiante avec 40 mM de rouge alizarine à pH 7,4 préparé en eau distillée. Le rouge alizarine est éliminé par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

E. Analyse par bioluminescence

Ce travail nécessitait la mise au point des conditions de détection *in vivo* de photons libérés de la luciférine D sous l'action de la luciférase. Deux appareils d'imagerie de bioluminescence *in vivo* ont été utilisés : le NightOwl LB981 avec caméra CCD NC 320 (Berthold, Thoiry, France) et le Photon Imager (Biospace, Paris, France) qui a été acquis en collaboration avec le Cancéropôle Grand Ouest.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec Julie Rousseau, doctorante au laboratoire LPRO qui a développé les vecteurs lentiviraux permettant le transfert stable du gène codant la luciférase et dont le but était de suivre par bioluminescence *in vivo* les cellules d'ostéosarcomes (Rousseau, 2010 : cf Annexes-Article 2).

Les deux appareils permettent la détection des cellules d'ostéosarcomes exprimant la luciférase, mais le Photon Imager est apparu comme prévu plus performant que le NightOwl LB981. La détection *in vivo* des précurseurs ostéoblastiques exprimant la luciférase a donc été réalisée à l'aide du Photon Imager.

Article 2 :

«Avantages de l'imagerie par bioluminescence pour le suivi des traitements par siRNA ou par chimiothérapie dans des modèles pré-cliniques d'ostéosarcome.»

Cancer Gene Ther. 2010 Jun;17(6):387-97.

Rousseau J, Escriou V, **Perrot P**, Picarda G, Charrier C, Scherman D, Heymann D, Rédini F, Trichet V.

1) Transduction des précurseurs ostéoblastiques par des particules lentivirales

Afin de suivre *in vivo* les précurseurs ostéoblastiques, ces cellules sont modifiées pour exprimer le gène qui code pour l'enzyme luciférase, par la technique lentivirale (Figure 26).

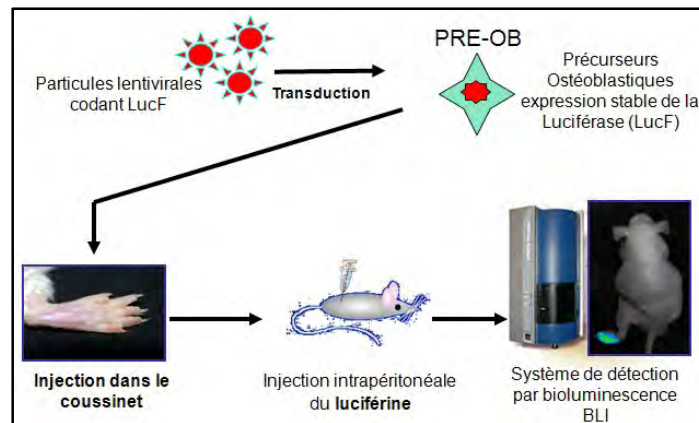


Figure 26 : Détection et suivi des précurseurs ostéoblastiques in vivo : utilisation de la bioluminescence (BLI)

La production de lentivirus contenant le gène codant pour la luciférase a été effectuée dans un laboratoire de niveau de sécurité L2 adapté à la manipulation des particules lentivirales faiblement pathogènes (défectueuses pour la réplication et pour lesquelles le transgène n'est pas pathogène). Dix mille cellules dans 500 μL de milieu sontensemencées la veille en plaque 6 puits, et transduites avec 50, 100 ou 150 μL de solution contenant les particules lentivirales. Le lendemain, le milieu est remplacé et après 4 jours, les cellules peuvent être amplifiées au laboratoire de niveau L1.

Les pré-ostéoblastes de rat ou les CCL-226 de souris ainsi transduits codent pour la luciférase et sont appelés respectivement pré-ob LucF et CCL226 LucF.

2) Mesure de l'activité luciférase in vitro

L'activité luciférase des cellules modifiées pour exprimer le transgène firefly luciférase, est mesurée en utilisant le kit « Steady-Glo® luciferase system » (Promega, Charbonnières, France). Elle permet la détection du dégagement de lumière due à l'oxydation du substrat luciférine selon la réaction suivante (Figure 27) :

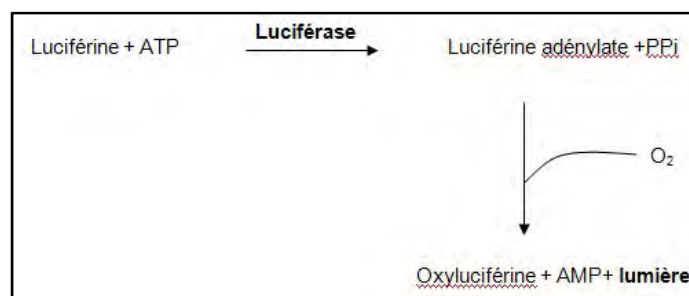


Figure 27 : Dégradation de la luciférine par la luciférase et libération de photons

10^5 cellules sontensemencées dans 100 μL de milieu par puits en plaque 96 puits à parois opaques (96 well Optical bottom plate, NUNC, USA) avec 50 μL de Steady-Glo®. Ce réactif permet à la fois la lyse cellulaire et apporte le substrat de la luciférase. Après 5 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, la plaque est placée dans un lecteur de plaque VICTOR (Perkin Elmer). Ce spectrophotomètre mesure la lumière dégagée sur 10 secondes. Le résultat correspond à l'activité luciférase et est exprimé en unité relative de luminescence (URL). Les données sont exploitées à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

F. Étude *in vitro* des interactions entre précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes

1) Culture avec milieux conditionnés (MC)

Les CSM de moelle osseuse de rat sont cultivées dans des flasques 75 cm^2 jusqu'à 80-90% de confluence. Le milieu de culture ôté, les cellules sont rincées au PBS, puis entretenues dans du milieu αMEM sans SVF. Au bout de 24 heures, le milieu est récupéré et correspond au milieu conditionné (MC) des CSM de rat testé sur la prolifération des cellules ostéosarcomateuses.

Mille cinq cent cellules ostéosarcomateuses par puits sont placées dans des plaques 96 puits, dans 20 μL de milieu sans SVF, avec 25, 50 ou 75 μL de MC, et complété avec du milieu de culture sans SVF pour obtenir 95 μL dans chaque puits. 5 μL de SVF sont ajoutés pour obtenir une concentration constante de SVF à 5%. Ces tests sont réalisés en triple exemplaire. Les cellules ostéosarcomateuses dans leur milieu DMEM avec 5% de SVF sans MC constituent le groupe témoin.

À 24 heures et 48 heures de culture, un test d'activité mitochondriale cellulaire (test XTT) est réalisé en ajoutant 50 μL de mélange XTT (Roche) à chaque puits. Cette manipulation est effectuée sous hotte dans des conditions de faible luminosité. Après 4 heures, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 490 nm au lecteur de plaque VICTOR (Perkin Elmer). Les données sont ensuite traitées au moyen du logiciel Microsoft Excel. Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération par rapport au contrôle.

Le principe d'un test XTT est de réaliser un dosage colorimétrique de quantification non-radioactive de la prolifération et de la viabilité cellulaire, basé sur le clivage du sel de tétrazolium XTT (jaune) en formazan (orangé) par l'activité métabolique des cellules (activité déshydrogénase des mitochondries). Le formazan (soluble en solution aqueuse) est quantifiable par mesure de la Densité Optique à 490 nm (DO). Ce dosage nécessite le mélange de deux réactifs : le réactif de marquage XTT (Roche) et le réactif de couplage électronique (Roche) à diluer au 1/50^e dans le XTT labelling reagent.

2) Co-culture indirecte

Dans des plaques 24 puits à J0, 30 000 cellules ostéosarcomateuses sont disposées par puits dans leur milieu de culture avec 10% de SVF. Dans des chambres de co-culture adaptées (pore size PET track-etched membrane 24 well format, 3 μ m, cell culture insert), 15 000 précurseurs ostéoblastiques (CSM de rat, CCL226 de souris ou pré-ob de rat) sont déposés et cultivés dans leur milieu de culture α MEM et 10% de SVF. Ces tests sont réalisés en trois exemplaires.

À J1, après rinçage au PBS, les précurseurs ostéoblastiques placés dans les chambres de co-culture, sont assemblés aux cellules ostéosarcomateuses.

À J3, un comptage au bleu trypan est réalisé. Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération par rapport au groupe contrôle (les cellules ostéosarcomateuses cultivées seules correspondent au groupe témoin).

Le principe d'un comptage au bleu Trypan repose sur la capacité du bleu Trypan à pénétrer dans toutes les cellules et à être exclu des cellules viables par un processus ATP dépendant. Elle permet de faire la distinction entre cellules mortes et cellules vivantes, les vivantes devenant réfringentes et les cellules mortes apparaissant bleues. Le comptage est ensuite effectué sous microscope optique sur une cellule de Malassez.

G. Étude *in vivo* des interactions entre précurseurs ostéoblastiques et cellules ostéosarcomateuses

L'activité du LPRO dans le domaine des modèles pré-cliniques s'est d'abord focalisée sur le développement de modèles syngéniques orthotopiques d'ostéosarcomes chez le rat et la souris. Ces modèles sont induits soit par transplantation de fragments tumoraux, soit par injection de cellules tumorales en intra-musculaire au contact de l'os ou directement en site intra-osseux dans la cavité médullaire du tibia.

Toutes les manipulations ont été effectuées sur des souris, au sein de l'unité de thérapeutique expérimentale (Plateau technique de l'IFR26, Université de médecine de Nantes) en accord avec les autorités compétentes et sous la direction de personnel agréé.

Deux modèles d'ostéosarcomes disponibles au laboratoire LPRO ont été modifiés pour les adapter à nos expérimentations.

1) Modèle d'ostéosarcome de souris chez des souris immunocompétentes

Des souris immunocompétentes C3H/HeN, mâles, âgées de 6 semaines, reçoivent des greffes cellulaires **syngéniques**.

Un groupe de 6 souris reçoit des cellules **POS-1** seules (2 millions dans 50 µl de PBS). Le développement tumoral de ce groupe est comparé à celui d'un groupe de 6 souris qui reçoit la co-injection de cellules POS-1 et de cellules **CCL226** LucF (2 millions et 1 million respectivement dans 50 µl de PBS). Un troisième groupe de 6 souris reçoit des cellules **CCL226** LucF seules (1 million dans 50 µl de PBS).

A J0, toutes les souris sont injectées au niveau de la face plantaire du coussinet de la patte arrière droite.

A J1, une première mesure de bioluminescence est effectuée.

2) *Modèle d'ostéosarcome de rat chez des souris immunodéficientes*

Des souris immunodéficientes nude Swiss Nu/Nu, mâles, âgées de 6 semaines, reçoivent des greffes cellulaires **xénogéniques**. Un groupe de souris reçoit des cellules **OSRGa** seules (2 millions dans 50 µl de PBS). Le développement tumoral de ce groupe est comparé à celui d'un groupe de souris qui reçoit la co-injection de cellules OSRGa et de cellules **pré-ob** LucF (2 millions et 1 million respectivement dans 50 µl de PBS). Un troisième groupe de souris reçoit des cellules **pré-ob** LucF seules (1 million dans 50 µl de PBS).

A J0, toutes les souris sont injectées au niveau de la face plantaire du coussinet de la patte arrière droite.

A J1, une première mesure de bioluminescence est effectuée.

3) *Suivi expérimental*

**VOLUME TUMORAL*

La tumeur est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse, selon deux axes perpendiculaires et la formule suivante permet d'obtenir le volume tumoral en mm³ (Figure 28) :

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{L+l^2}{2}$$

L : le plus grand axe

l : le plus petit axe

Figure 28. : Formule de calcul du volume des tumeurs à partir de la mesure du plus grand axe L et du plus petit axe l

En coussinet, chez la souris, l'euthanasie de l'animal est décidée lorsque le volume tumoral dépasse 2500 mm³ ou lorsque la nécrose tumorale entraîne des ulcérations cutanées.

***BIOLUMINESCENCE IN VIVO**

Le suivi de la bioluminescence au cours du temps nous a permis de suivre l'évolution des cellules transduites pour exprimer la luciférase : soit les cellules d'ostéosarcomes (Rousseau, 2010 : cf Annexes-Article 2), soit les précurseurs ostéoblastiques (fibroblastes embryonnaires de souris (CCL226) et pré-ostéoblastes issus de la calvaria de rat (pré-ob)). Les animaux sont préalablement anesthésiés. L'injection du substrat luciférine (12 mg/mL, Interchim, France) est réalisée par voie intrapéritonéale à la dose de 100 µL pour 100 gr de souris, 7 minutes avant l'acquisition. L'acquisition est réalisée avec un imageur de bioluminescence *in vivo* : le Photon imager (Biospace, Paris, France). Les animaux sont ensuite placés dans la chambre et l'acquisition est effectuée sur 5 minutes. Les photons, secondaires à la dégradation du substrat luciférine par la luciférase, traversent les tissus et sont captés par une caméra. La bioluminescence mesurée une à deux fois par semaine, est exprimée en nombre de photons par seconde au sein d'une région d'intérêt auquel le bruit de fond a été soustrait.

***METASTASES PULMONAIRES ET HEPATIQUES**

La technique de détection par BLI s'est avère très utile pour détecter précocément des tumeurs quand celles-ci expriment la luciférase (Rousseau, 2010 : cf Annexes-Article 2). Par contre, ce n'est pas un outil satisfaisant pour la détection des métastases pulmonaires. En effet, la détection de cellules exprimant la luciférase dans les poumons n'a pu être possible qu'après l'explantation des poumons et donc nécessitait l'euthanasie de l'animal, ce qui ne correspond pas à un suivi *in vivo*. Ainsi, la présence de métastases pulmonaires a été recherchée macroscopiquement sur tous les animaux euthanasiés.

4) Analyses statistiques

La comparaison de la prolifération *in vitro*, à partir de test XTT des cellules ostéosarcomateuses est faite par analyse de la variance (test non paramétrique de Kruskal-Wallis, avec un post test de Dunn). La comparaison de la prolifération *in vitro*, à partir des comptages au bleu trypan des cellules ostéosarcomateuses est faite par analyse des moyennes en réalisant des tests de Student. Les volumes moyens tumoraux ont été comparés par analyse de la variance (test paramétrique ANOVA, avec post test de Bonferonni). La significativité a été retenue pour un $p < 0,05$.

II. Résultats

A. Caractérisation des précurseurs ostéoblastiques et des cellules d'ostéosarcomes

1) CSM de rat issues de la moelle osseuse (CSM)

**COMBINATOIRE D'EXPRESSION DE MARQUEURS CELLULAIRES*

Pour caractériser les phénotypes des précurseurs ostéoblastiques de rat, l'anticorps anti-CD90 (commun aux cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques) et l'anticorps anti-CD45 (présent uniquement sur les cellules de la lignée hématopoïétique) ont été utilisés. Sur 3 séries de 2 rats, une analyse en cytométrie de flux au 2^{ème} et au 7^{ème} passage a été réalisée. Le double marquage montre des cellules uniquement positives pour CD90 dans le carré supérieur gauche, permettant d'identifier des CSM potentielles (Figure 29a). Les CSH positives pour CD45 et CD90 sont identifiées dans le carré supérieur droit. Au 2^{ème} repiquage, 37% des cellules étaient des CSH, puisqu'elles exprimaient à leur surface CD90 et CD45 ; 62% étaient des CSM potentielles, exprimant uniquement CD90. Au 7^{ème} repiquage, les CSH avaient pratiquement disparu. En effet, seulement 2% de doubles positifs pour 98% de simples positifs pour CD90 étaient observés. Une quantité importante et relativement purifiée de CSM potentielles peut donc être obtenue dans nos conditions de culture. Pour un rat, la culture a été poursuivie jusqu'au 16^{ème} repiquage (80 jours de culture), et une nouvelle analyse en cytométrie de flux a été effectuée avec les mêmes marqueurs (CD45, CD90). Aucun changement phénotypique n'a été observé ; cependant des variations de moyenne d'intensité de fluorescence ont été notées, qui pourraient être expliquées par des conditions de cultures différentes comme la confluence cellulaire (variabilité de l'intensité de l'expression de CD90 en fonction de la confluence cellulaire) (Figure 29b).

**CAPACITE DE DIFFERENCIATION VERS LE LIGNAGE OSTEOLASTIQUE*

Des tests de minéralisation (rouge alizarine) sur ces CSM potentielles (cellules adhérentes CD90+ et CD45-) au 2^{ème} et au 7^{ème} passage ont révélé la présence de nodules de minéralisation. Ce résultat permet d'affirmer que ces cellules au 2^{ème} ou 7^{ème} repiquage étaient toujours capables de se différencier en ostéoblastes (Figure 29c) et constituent donc de véritables CSM.

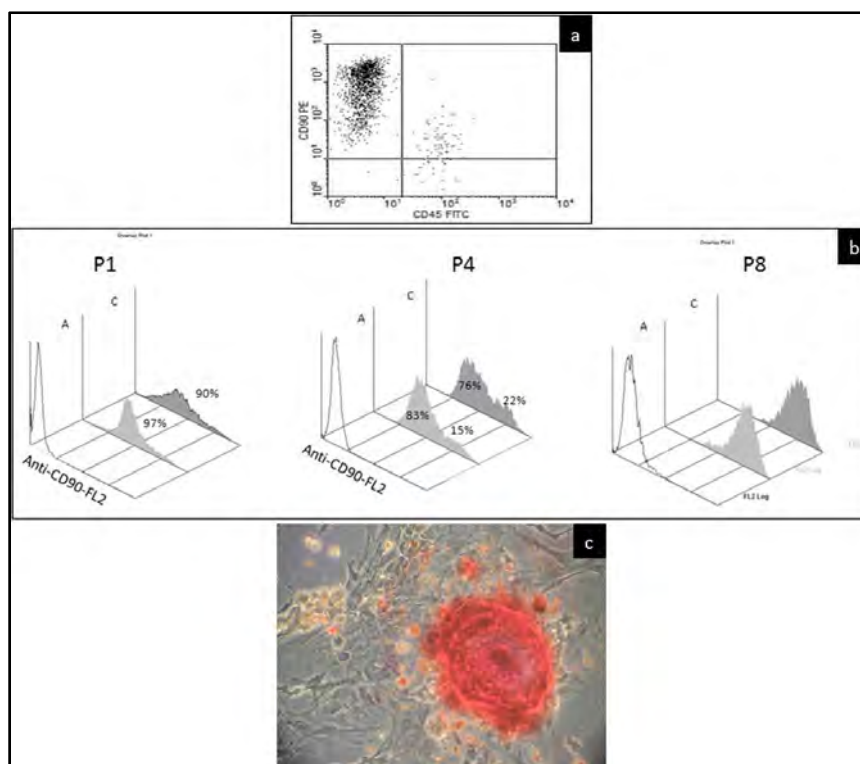


Figure 29 : *Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de rat issues de la moelle osseuse (CSM)*

- a. Analyse par cytométrie en flux en double marquage de CD90 et CD45 au 7^{ème} repiquage.
En abscisse, intensité de marquage due aux anticorps anti-CD45 FITC (FL1).
En ordonnée, intensité de marquage due aux anticorps anti-CD90 PE (FL2).
- b. Analyse par cytométrie en flux en simple marquage de CD90 aux 1^{er}, 4^{ème} et 8^{ème} passages.
L'intensité de marquage des cellules est indiquée sur l'axe des abscisses.
Le nombre de cellules est indiqué sur l'axe des ordonnées.
Courbe vide : contrôle isotypique. Courbes pleines grises : fluorescence liée à la fixation de l'anticorps anti-CD90, couplé au PE (FL2) chez 2 rats A et C.
- c. Capacité de différenciation vers la lignée ostéoblastique confirmée par la formation de nodules de minéralisation visualisés par coloration au rouge alizarine sur des CSM adhérentes en monocouche (microscopie optique à contraste de phase, grossissement original x50)

2) CSM de souris issues de fibroblastes embryonnaires (CCL226)

La difficulté d'isoler et d'amplifier les CSM issues de la moelle osseuse de souris nous a conduit à utiliser des cellules issues d'un clone de fibroblastes embryonnaires de souris : les CCL226. Elles représentent un modèle de CSM de souris (Reznikoff, 1973 ; Smith, 1993). L'expression des antigènes CD29, CD105 et CD45 de ces cellules a été analysée en cytométrie de flux, révélant une population cellulaire très homogène CD29+, CD 105+ et CD45- (un seul pic) (Figure 30).

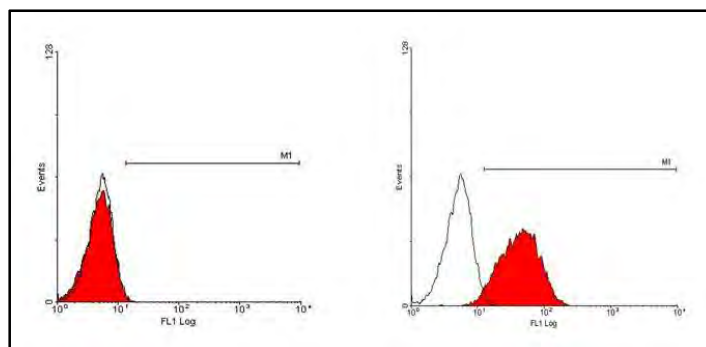


Figure 30 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses de souris issues de fibroblastes embryonnaires (CCL226) : analyse par cytométrie en flux en simple marquage au 7^{ème} repiquage.

L'intensité de marquage des cellules est indiquée sur l'axe des abscisses.

Le nombre de cellules est indiqué sur l'axe des ordonnées.

Courbe vide : contrôle isotypique. Courbe pleine rouge : fluorescence liée à la fixation des anticorps anti-CD29 (à gauche) ou anti-CD45 (à droite), couplé au FITC (FL1).

3) Pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria (pré-ob)

Nous employons le terme de «pré-ostéoblastes» (pré-ob) pour les cellules de rat issues de la calvaria, car elles expriment fortement *cbfa1/runx2* et sont donc déjà engagées dans la voie de différenciation ostéoblastique. Ces cellules peuvent s'auto renouveler et se diviser en culture tout comme les cellules souches. Cependant, elles ont perdu leur caractère pluripotent et ne sont plus capables de se différencier en chondrocyte ou en adipocyte.

L'analyse en cytométrie de flux a montré que ces cellules présentaient un marquage semblable aux CSM pour CD45 et CD90 (Figure 31). Par RT-PCR (amplification en chaîne après Reverse Transcription), l'expression du facteur de transcription *Cbfa1* a été confirmée (données non montrées).

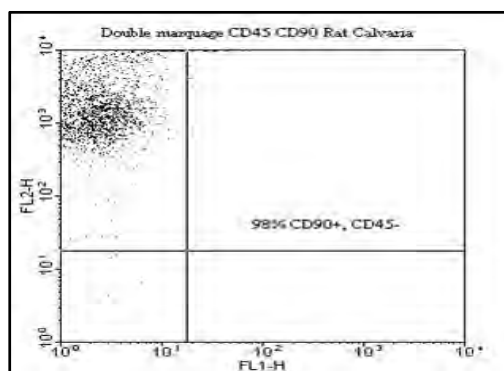


Figure 31 : Caractérisation des pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria (pré-ob) : analyse par cytométrie en flux en double marquage de CD90 et CD45 au 7^{ème} repiquage.

En abscisse, intensité de marquage due aux anticorps anti-CD45 FITC (FL1).

En ordonnée, intensité de marquage due aux anticorps anti-CD90 PE (FL2).

4) Cellules ostéosarcomateuses de rat (OSRGa) et de souris (POS-1)

L'analyse phénotypique des cellules ostéosarcomateuses de rat (OSRGa) a montré qu'elles ne portaient ni le marqueur d'immatunité cellulaire CD90, ni le marqueur de la lignée hématopoïétique CD45. *In vivo*, ces cellules sont capables de synthétiser la matrice osseuse qui minéralise, phénomène observé dans les modèles animaux d'ostéosarcomes de rat au laboratoire. Par contre, l'analyse phénotypique des cellules ostéosarcomateuses de souris (POS-1) était positive pour le marqueur d'immatunité cellulaire CD29. Tout comme les pré-ostéoblastes, ces cellules expriment le facteur de transcription Cbfa1. En revanche, dans les modèles animaux, aucune minéralisation de la matrice osseuse n'est observée avec les POS-1, ce qui confirme leur caractère plus immature que les OSRGa.

Les OSRGa sont des ostéoblastes transformés. Les POS-1 apparaissent moins différenciées. Elles pourraient correspondre à des «pré-ostéoblastes» transformés. Les OSRGa et les POS-1 sont donc des cellules transformées issues de la lignée ostéoblastique, à des stades différents de maturation.

B. Activité luciférase des précurseurs ostéoblastiques

Nous avons voulu suivre *in vivo* le comportement des précurseurs ostéoblastiques : leur prolifération, leur disparition, leur migration. Nous avons choisi la technique d'imagerie par bioluminescence et utilisé des précurseurs ostéoblastiques modifiés pour exprimer l'enzyme luciférase. Nous les avons désignées cellules LucF.

1) Transfert du gène luciférase

Les fibroblastes embryonnaires de souris (CCL226) et les pré-ostéoblastes issus de la calvaria de rat (pré-ob) ont été modifiées à l'aide de particules lentivirales non infectieuses contenant le gène luciférase. Les cellules transduites sont appelées cellules LucF (CCL226 LucF et pré-ob LucF).

Un test *in vitro* mesurant l'activité luciférase a été réalisé pour valider l'intégration et l'expression du gène luciférase dans le génome des cellules modifiées. L'activité a été mesurée sur les lysats de 100 000 cellules avec le kit «Steady-Glo® Luciferase Assay System». Ces tests ont été réalisés lors du 2^{ème} repiquage, 10 jours après la transduction, et sont répétés lors de l'injection de ces cellules *in vivo*. Le témoin négatif correspondait à des cellules non modifiées n'exprimant pas la luciférase. Le témoin positif était soit des cellules POS-1 exprimant la luciférase (LucF), avec une bioluminescence détectable *in vivo* (Rousseau, 2010), soit des HEK (Human Embryonic Kidney cells) avec une intensité lumineuse supérieure à celle des cellules POS-1 LucF *in vitro*. L'activité luciférase des pré-ostéoblastes de calvaria de rat était supérieure à l'activité du témoin positif, les HEK LucF (Figure 32a), ce qui nous a permis de valider l'intégration du transgène luciférase, et de prédire leur détectabilité *in vivo*. Ce test a été renouvelé, dans les mêmes conditions, après l'amplification des cellules, lors de l'injection *in vivo*, afin de vérifier la persistance de l'expression du transgène luciférase après décongélation et 4 repiquages. Les CCL226 LucF et les pré-ob LucF, avant l'expérimentation *in vivo*, avaient une activité luciférase nettement supérieure au témoin négatif, et très légèrement inférieure aux cellules POS-1 LucF. La stabilité dans le temps de l'expression de la luciférase était ainsi validée (Figure 32b).

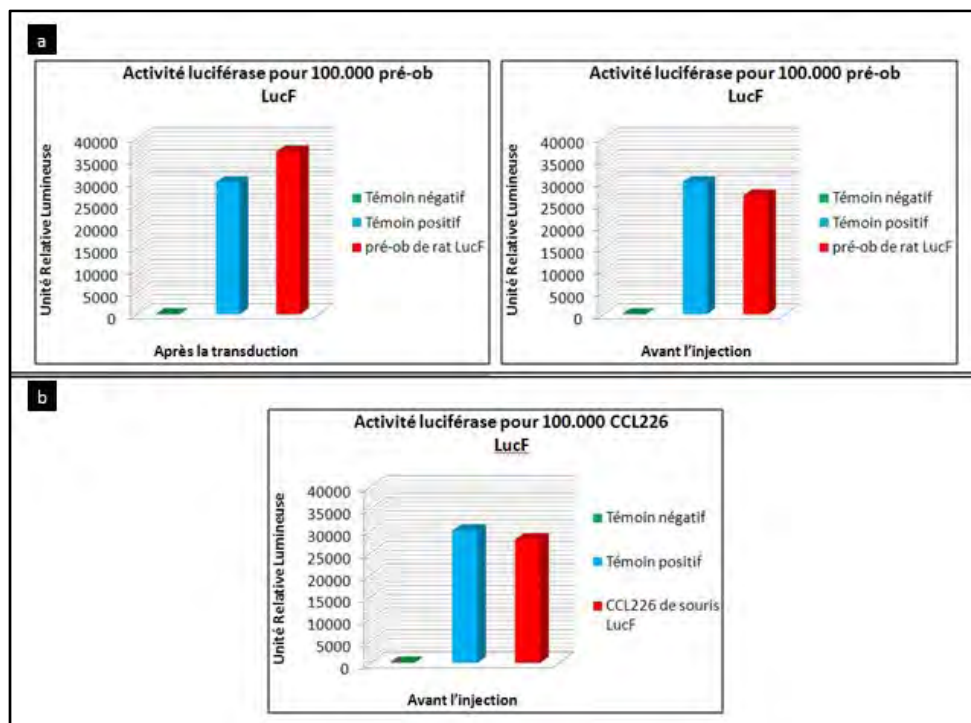


Figure 32 : Mesure de l'activité luciférase *in vitro* sur lysat cellulaire
 a. des pré-ob LucF issus de calvaria de rat, après transduction et avant injection *in vivo* (témoin positif HEK LucF)
 b. des CCL226 LucF, modèle de CSM de souris, avant injection *in vivo* (témoin positif POS-1 LucF)

L'expression du gène luciférase n'a pas eu d'incidence sur le phénotype cellulaire. Des CCL226 non modifiées et des CCL226 LucF ont été comparées en cytométrie de flux. Elles avaient subi le même nombre de repiquages. Les courbes d'expression de CD29 et de CD45 sont superposables avec des moyennes d'expression équivalentes, 100% des cellules expriment CD29 avec la même intensité (Figure 33a).

2) *Corrélation entre bioluminescence et nombre de cellules*

**IN VITRO*

Dans une plaque 96 puits type Elisa, des quantités croissantes de CCL226 LucF : 0, 50 000, 100 000, 150 000, 200 000, ont été placées en double exemplaire. L'activité luciférase a été mesurée sur les lysats cellulaires avec le kit «Steady-Glo® Luciferase Assay System». L'acquisition a été effectuée sur 2 minutes dans le photon imageur (Biospace, Paris, France). Les mesures ont montré une très bonne corrélation linéaire (coefficient de corrélation (R^2) très proche de 1) entre le nombre de cellules LucF et l'intensité de la bioluminescence (Figure 33b).

**IN VIVO*

Deux quantités différentes de CCL226 LucF ont été injectées au niveau des coussinets plantaires des pattes arrières d'une souris C3H/HeN : un million dans 50 μ L de PBS dans le coussinet arrière gauche, et deux millions dans 50 μ L dans le coussinet arrière droit. Après anesthésie et injection intrapéritonéale du substrat luciférine, la souris a été placée dans l'imageur. L'acquisition s'est effectuée entre la 7^{ème} et la 12^{ème} minute.

Comme attendu, le signal de bioluminescence du coussinet arrière droit est supérieur à celui du coussinet arrière gauche (Figure 33c).

Nous retrouvons, *in vivo*, une corrélation linéaire entre l'intensité biolumineuse et le nombre de cellules exprimant la luciférase, avec un coefficient de corrélation (R^2) très proche de 1 (Figure 33d).

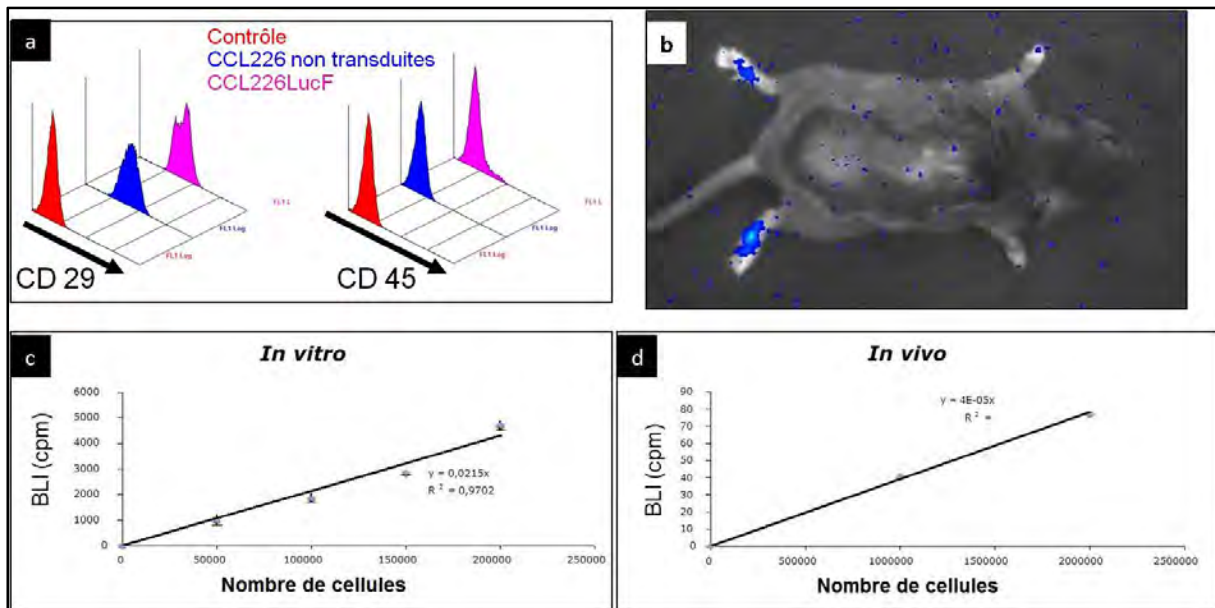


Figure 33 : Analyse des CCL226 LucF

a. Absence de modification du phénotype cellulaire pour CD29 et CD45 entre les CCL226 et les CCL226 LucF

b. Photographie à l'imageur d'une souris C3H/HeN injectée avec 500 000 CCL226 lucF dans le coussinet gauche, et 1 million dans le coussinet droit

c. Corrélacion linéaire in vitro entre bioluminescence et nombre de cellules CCL226 LucF

d. Corrélacion linéaire in vivo entre bioluminescence et nombre de cellules CCL226 LucF

La transduction, par la technique lentivirale, des CCL226 de souris et pré-ostéoblastes de rat a permis une expression du transgène stable dans le temps.

L'intensité de la bioluminescence in vivo reflète le nombre de cellules LucF. Nous pouvons suivre l'évolution de ces cellules : une augmentation de la bioluminescence correspond à une augmentation du nombre de cellules.

En revanche, nous ne pouvons assurer que la disparition du signal correspond à la disparition des cellules. En effet, soit la sensibilité de l'imageur peut être insuffisante et dans ce cas-là, il ne détecte plus les signaux trop faibles ; soit la prolifération d'un clone cellulaire n'exprimant pas le transgène luciférase, au sein de la population injectée, pourrait s'effectuer en l'absence de sélection préalable à l'injection.

C. Les précurseurs ostéoblastiques favoriseraient la croissance des cellules d'ostéosarcomes *in vitro*

1) Effet du milieu conditionné des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules d'ostéosarcomes

Le milieu conditionné (MC) a été obtenu en récupérant le milieu de culture dans lequel des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de moelle osseuse de rat ont été cultivées pendant 24 heures sans SVF.

La viabilité des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa a ensuite été testée en présence de 25% de milieu conditionné. Puis un test d'activité mitochondriale cellulaire (XTT) des OSRGa a été réalisé après 48 h de culture. Une augmentation de 23% du nombre de cellules OSRGa vivantes sans variation du nombre de cellules mortes a été observée lors de l'ajout de 25% de milieu conditionné dans le milieu de culture. Nous avons mis en évidence une différence statistiquement significative entre l'activité mitochondriale cellulaire des OSRGa sans MC et des OSRGa avec 25% de MC (Figure 34a).

Une nouvelle culture d'OSRGa avec 50% de milieu conditionné de CSM, suivie à 48 h d'un comptage au bleu trypan, a alors été réalisée. Nous avons observé en présence de MC une augmentation de 23% du nombre de cellules OSRGa vivantes sans variation du nombre de cellules mortes, ce qui est significatif ($p < 0,05$) (Figure 34b).

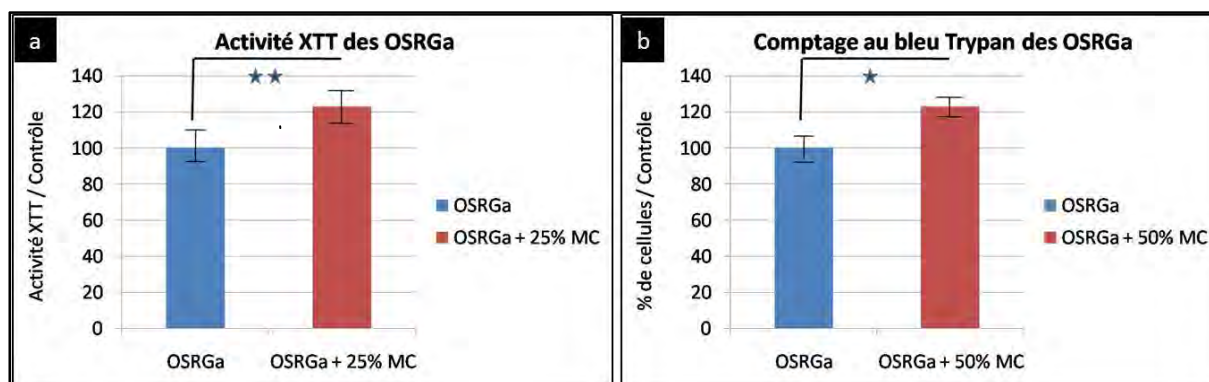


Figure 34 : Effet du milieu conditionné (MC) de cellules souches mésenchymateuses (CSM) médullaires de rat sur des cellules d'ostéosarcome de rat OSRGa

a. Test d'activité XTT des OSRGa cultivées seules ou avec 25% de MC (résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle considéré comme 100%)

b. Comptage au bleu trypan des OSRGa cultivées seules ou avec 50% de MC (résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle considéré comme 100%)

** Test statistique par analyse de la variance (Test non paramétrique de Kruskal-Wallis) significatif $p < 0,05$.

* Test statistique par analyse des moyennes (Test de Student) significatif $p < 0,05$

L'étude du milieu conditionné des précurseurs ostéoblastiques de rat (CSM de moelle osseuse) a montré une augmentation de la prolifération des cellules ostéosarcomateuses de rat (OSRGa).

2) Effet des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules d'ostéosarcomes sans contact cellulaire

Les cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa ou de souris POS-1 ont été cultivées en présence de précurseurs ostéoblastiques respectivement de rat (CSM de moelle osseuse ou pré-ostéoblastes issus de la calvaria) ou de souris (fibroblastes embryonnaires CCL226) dans des chambres de co-culture avec un rapport de 2:1, pendant 72h. Un comptage au bleu trypan a ensuite été effectué. Le nombre de cellules ostéosarcomateuses cultivées en présence des précurseurs ostéoblastiques (groupe étudié) a été comparé au nombre de cellules ostéosarcomateuses cultivées seules (groupe contrôle) (expression du nombre de cellules en % de celui du groupe contrôle).

Lors de l'analyse de la culture des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa en présence de précurseurs ostéoblastiques de rat (CSM de moelle osseuse/pré-ostéoblastes issus de la calvaria), nous avons observé une augmentation du nombre de cellules OSRGa vivantes, avec une différence significative ($p < 0,05$). Cette augmentation du nombre de cellules OSRGa est apparue nettement supérieure en présence des CSM (Figure 35a), qu'en présence des pré-ostéoblastes (80% versus 25%) (Figure 35b).

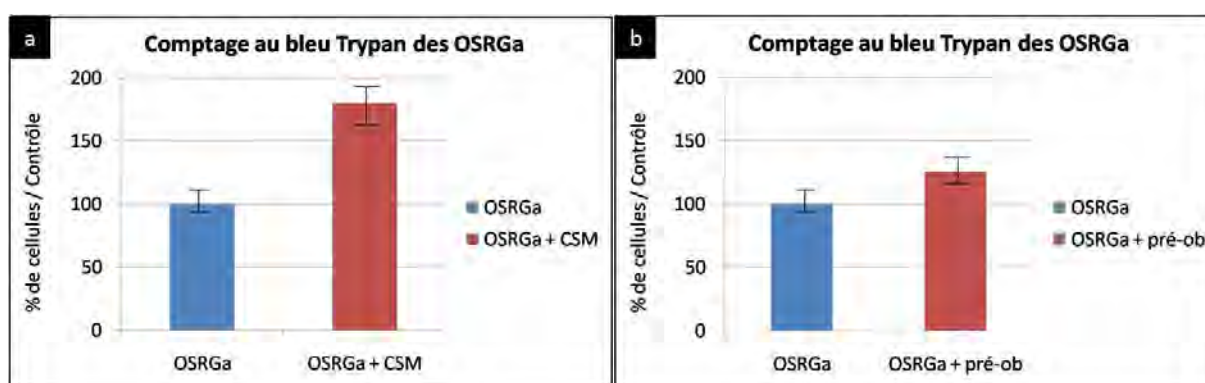


Figure 35 : Analyse *in vitro* de la prolifération des cellules d'ostéosarcome de rat (OSRGa) cultivées seules (histogrammes en bleu) ou en co-culture sans contact direct avec des précurseurs ostéoblastiques de rat (histogrammes en rouge)
 a. avec des CSM de moelle osseuse de rat
 b. avec des pré-ostéoblastes issus de calvaria de rat
 (résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle considéré comme 100%)

Lors de l'analyse de la culture des cellules ostéosarcomateuses de souris POS-1 en présence de précurseurs ostéoblastiques de souris (fibroblastes embryonnaires CCL226), nous avons également observé une augmentation de 25% de la prolifération des cellules POS-1 (Figure 36).

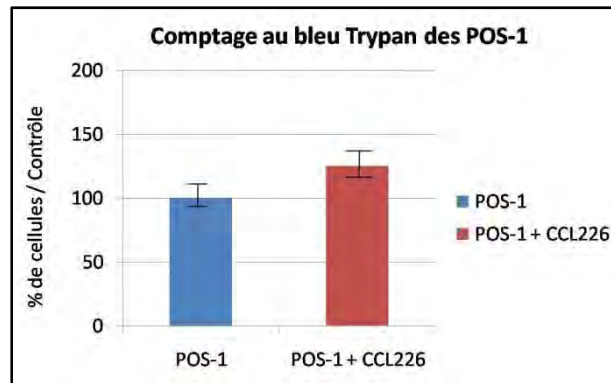


Figure 36 : Analyse in vitro de la prolifération des cellules d'ostéosarcome de souris (POS-1) cultivées seules (histogramme en bleu) ou en co-culture sans contact direct avec des précurseurs ostéoblastiques de souris (CCL226) (histogramme en rouge) (résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle considéré comme 100%)

In vitro la prolifération des cellules ostéosarcomateuses est amplifiée par la présence des précurseurs ostéoblastiques, quel que soit leur degré de maturité cellulaire, et sans contact cellulaire. L'effet semble cependant plus important avec des CSM qu'avec des pré-ostéoblastes. L'immaturité des précurseurs pourrait être un facteur favorisant la prolifération tumorale in vitro.

L'effet prolifératif observé des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules ostéosarcomateuses, sans contact cellulaire direct, nous laisse supposer qu'un ou plusieurs facteurs solubles interviendraient dans la communication entre ces cellules.

D. Les précurseurs ostéoblastiques favoriseraient la croissance des cellules d'ostéosarcomes *in vivo*

1) Stratégie

L'effet des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules ostéosarcomateuses a été observé en comparant le **volume tumoral** des groupes recevant les co-injections cellules ostéosarcomateuses et précurseurs ostéoblastiques LucF au groupe ayant reçu les cellules ostéosarcomateuses seules.

Pour évaluer le comportement des précurseurs ostéoblastiques *in vivo* au niveau du coussinet et vérifier qu'ils n'étaient pas eux-mêmes tumorigènes, un 2^{ème} groupe témoin a été formé et a reçu uniquement des précurseurs ostéoblastiques modifiés pour exprimer la luciférase.

L'effet des cellules ostéosarcomateuses sur les précurseurs ostéoblastiques a été évalué en comparant la **bioluminescence *in vivo*** du groupe recevant les co-injections de cellules ostéosarcomateuses et de précurseurs ostéoblastiques LucF au groupe ayant reçu uniquement les précurseurs ostéoblastiques LucF.

Aucun effet ostéolytique ou ostéoformateur sur les os des pattes des souris n'a été relevé par des radiographies standards, confirmant notre choix de travailler en dehors du microenvironnement osseux pour éviter toutes interactions avec les composants du tissu osseux de l'hôte.

2) *Co-injection de précurseurs ostéoblastiques de souris (CCL226) et de cellules d'ostéosarcome de souris (POS-1) chez la souris immunocompétente C3H/HeN*

Nous avons utilisé 18 souris C3H/HeN, mâles, âgées de 6 semaines, réparties en 3 groupes de 6 souris. Nous avons injecté au niveau de leur coussinet plantaire des cellules POS-1 seules pour un groupe, des cellules POS-1 associées à des cellules CCL226 LucF pour un autre, et enfin des cellules CCL226 LucF seules pour le dernier. L'expérimentation a duré 36 jours.

*ANALYSE DU VOLUME TUMORAL

Pour le groupe ayant reçu des cellules POS-1 seules, 5 souris sur 6 ont développé une tumeur au niveau du coussinet. L'apparition clinique de ces tumeurs s'est étalée dans le temps entre le 15^{ème} et le 29^{ème} jour. Trois souris ont été euthanasiées à J19 en raison d'ulcérations cutanées secondaires à une nécrose tumorale importante. Les deux autres ont été euthanasiées à J29 et à J35, également en raison d'ulcérations cutanées secondaires à une nécrose tumorale importante (Figure 37).

En ce qui concerne le groupe ayant reçu des cellules POS-1 associées aux cellules CCL226 LucF, toutes les souris (6/6) ont développé une tumeur. De plus, l'apparition clinique des tumeurs était synchrone vers le 10^{ème} jour et s'est avérée plus précoce que pour le groupe des cellules POS-1 seules. La croissance de développement de la tumeur a également été plus rapide que dans le groupe des cellules POS-1 seules, entraînant l'euthanasie de cinq souris à J19 et la dernière à J21 en raison d'ulcérations cutanées (Figure 37).

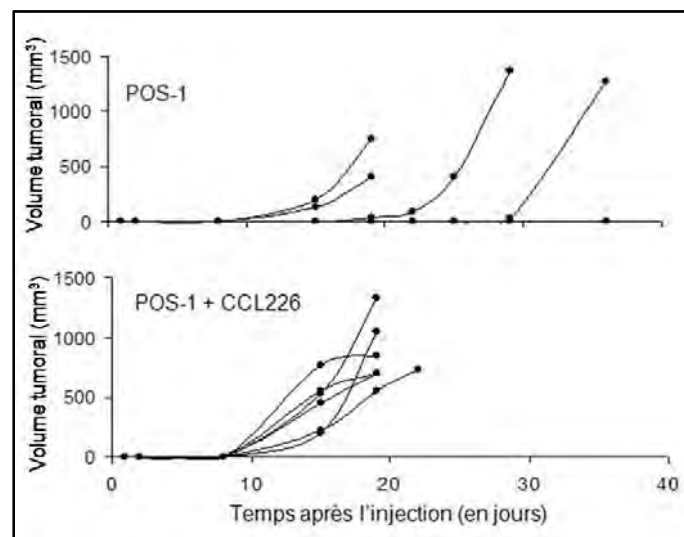


Figure 37 : Evolution des volumes tumoraux chez des souris immunocompétentes C3H/HeN ayant reçu des cellules d'ostéosarcome de souris seules (POS-1), ou associées à des précurseurs ostéoblastiques de souris CCL226 (POS-1 + CCL226).

Dans le groupe des précurseurs ostéoblastiques de souris modifiés pour exprimer la luciférase (CCL226 LucF seules), après une courte phase inflammatoire locale de cinq à sept jours, l'aspect du coussinet ayant reçu l'injection était strictement similaire au controlatéral. À l'issue de l'expérimentation, aucune tumeur n'était observée. L'augmentation des masses tumorales observée dans le groupe ayant reçu les cellules POS-1 + CCL226 ne s'explique donc pas par la prolifération massive anormale de cellules CCL226 qui seraient transformées.

Lorsque nous avons comparé les volumes tumoraux moyens entre eux, nous avons observé une cinétique de développement tumorale différente. La vitesse de croissance des tumeurs du groupe POS-1 avec les CCL226 LucF était beaucoup plus rapide que la croissance tumorale du groupe POS-1 seules. Au 19^{ème} jour le volume tumoral moyen du groupe POS-1 avec CCL226 était presque 3 fois supérieur au volume tumoral moyen du groupe POS-1 seules (900cm³ versus 300cm³ environ), et il existait une différence significative ($p < 0,001$) (Figure 38).

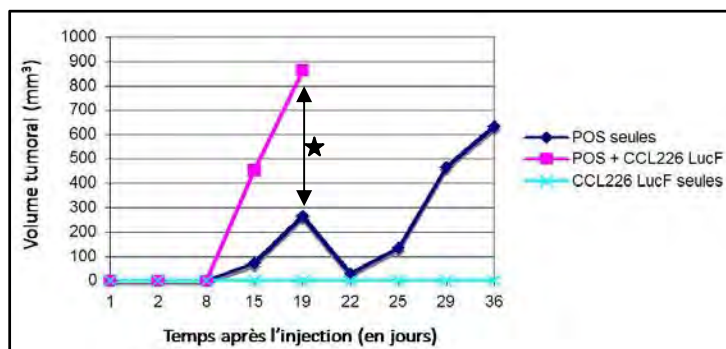


Figure 38 : Evolution des volumes tumoraux moyens chez des souris immunocompétentes C3H/HeN ayant reçu des cellules d'ostéosarcome de souris seules (POS-1), ou des précurseurs ostéoblastiques de souris (CCL226 LucF seules), ou la co-injection des deux (POS-1+CCL226 LucF).

**Test statistique par analyse de la variance (Test paramétrique ANOVA) significatif $p < 0,05$*

Les précurseurs ostéoblastiques de souris, modifiés pour exprimer la luciférase (CCL226 LucF), favoriseraient un développement tumoral plus précoce et plus rapide des cellules d'ostéosarcome de souris POS-1, dans le modèle en coussinet chez la souris immunocompétente C3H/HeN.

***ANALYSE DE LA BIOLUMINESCENCE**

Comme attendu aucun signal de bioluminescence n'a été enregistré chez les souris ayant uniquement reçu les cellules POS-1 (Figure 39a). Ce signal pour les autres groupes est resté localisé au niveau du coussinet plantaire, aucune migration des cellules CCL226 LucF n'a donc pu être détectée.

Pour le groupe des cellules CCL226 LucF seules, cinq souris sur six ont présenté un signal de bioluminescence détectable. Pendant sept jours, le signal a augmenté pour atteindre une intensité maximale à J7 puis il a diminué pour devenir à peine détectable après J21 (Figure 39b). L'intensité de bioluminescence reflétant le nombre de cellules LucF, les

CCL226 LucF après une 1^{ère} phase d'amplification cellulaire ont subi une phase de décroissance cellulaire.

Pour le groupe ayant reçu la co-injection de cellules POS-1 et CCL226 LucF, toutes les souris ont présenté un signal de bioluminescence détectable. L'évolution dans le temps du signal a été similaire à celle du groupe CCL226 LucF seules, à savoir : une 1^{ère} phase comprise entre J1 et J7 pendant laquelle l'intensité a augmenté, suivie d'une 2^{ème} phase comprise entre J7 et J15 pendant laquelle l'intensité a décliné. Cinq souris ayant été euthanasiées à J19, nous n'avons pas pu analyser l'évolution du signal de bioluminescence après cette date. Toutefois deux souris semblaient présenter un maintien, et non une décroissance, du signal de bioluminescence entre J15 et J21 (Figure 39c). A nouveau, on en déduit que ce n'est pas la prolifération *in vivo* des cellules CCL226 LucF qui peut expliquer l'augmentation de masse tissulaire observée. Cet accroissement est donc très probablement dû à une prolifération plus massive des cellules POS-1.

Après injection, les cellules CCL226 LucF seules ou les cellules CCL226 LucF associées aux cellules POS-1 ont la même cinétique jusqu'au 15^{ème} jour : une phase initiale de croissance cellulaire, suivi d'une deuxième phase de décroissance. Une différence semble apparaître ensuite (Figure 39d). Les CCL226 LucF persisteraient en présence de cellules ostéosarcomateuses, alors que seules, elles disparaîtraient plus rapidement. Les cellules POS-1 pourraient favoriser la survie des cellules CCL226 LucF.

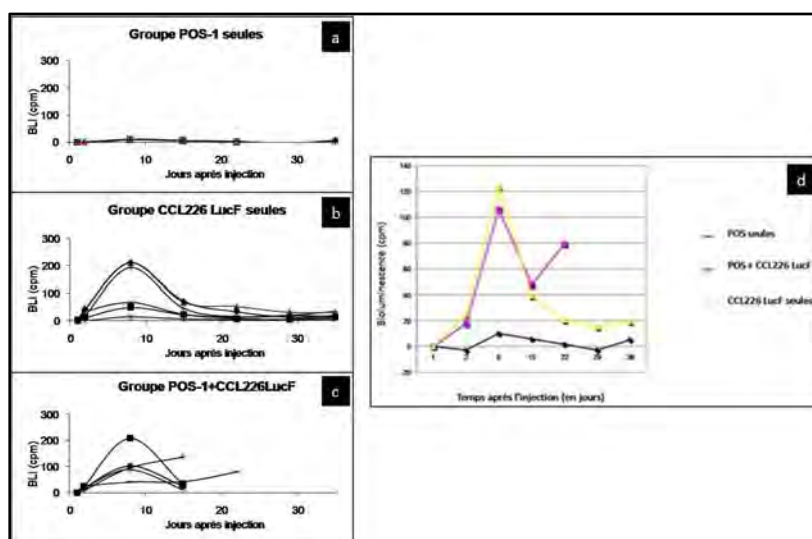


Figure 39 : Evolution de la bioluminescence chez des souris immunocompétentes C3H/HeN ayant reçu :

- des cellules d'ostéosarcome de souris seules (POS-1)
- des précurseurs ostéoblastiques de souris (CCL226 LucF seules)
- la co-injection des deux (POS-1+CCL226 LucF)
- évolution de la bioluminescence moyenne des 3 groupes

***RECHERCHE DE METASTASES**

À l'autopsie des animaux, nous n'avons observé aucune métastase ni pulmonaire ni hépatique. Dans le modèle POS-1 en transplantation habituellement utilisé au LPRO, la survenue de métastases pulmonaires se fait dans des proportions comparables à l'histoire naturelle de la pathologie humaine (Rousseau, 2010 : cf Annexes-Article 2). Dans ce modèle POS-1 en coussinet, l'absence de survenue de métastases pourrait s'expliquer par l'implantation de la tumeur en site extra-osseux.

Les précurseurs ostéoblastiques de souris, modifiés pour exprimer la luciférase (CCL226 LucF), auraient une activité pro-tumorale locale, dans le modèle d'ostéosarcome en coussinet de cellules ostéosarcomateuses de souris POS-1 chez la souris immunocompétente C3H/HeN, entraînant un développement tumoral plus précoce et plus important.

Nous avons voulu savoir si une communication intercellulaire semblable serait reproduite dans un autre modèle, utilisant des précurseurs ostéoblastiques et des cellules ostéosarcomateuses d'une autre espèce. Nous avons fait le choix de réaliser cette expérimentation avec des cellules de rat chez la souris nude. De plus, comme le rôle pro-tumoral local des précurseurs ostéoblastiques pourrait être lié à leurs propriétés immunosuppressives, l'utilisation de souris immunodéficientes permettait de s'affranchir de la composante immunitaire liée à l'activité des lymphocytes T.

3) Co-injection de précurseurs ostéoblastiques de rat (pré-ob) ou de cellules souches mésenchymateuses de rat (CSM) et de cellules d'ostéosarcome de rat (OSRGa) chez la souris immunodéficiente nude Swiss Nu/Nu

→ ETUDE PRELIMINAIRE : pré-ob+OSRGa

Nous avons utilisé 12 souris nudes, mâles, âgées de 6 semaines, réparties en 3 groupes de 4 souris. Nous avons injecté au niveau de leur coussinet plantaire des cellules OSRGa seules pour un groupe, des cellules OSRGa associées à des cellules pré-ob LucF dérivées de

la calvaria pour un autre, et enfin des cellules pré-ob LucF seules pour le dernier. L'expérimentation a duré 85 jours.

***ANALYSE DU VOLUME TUMORAL**

Dans le groupe ayant reçu les cellules OSRGa seules, une souris est décédée sans étiologie retrouvée avant l'apparition clinique d'une tumeur. Les trois autres ont présenté une tumeur vers le 70^{ème} jour après l'injection (Figure 40).

Dans le groupe ayant reçu des cellules OSRGa associées à des cellules pré-ob LucF, une souris est également décédée sans étiologie retrouvée avant l'apparition clinique d'une tumeur. Les trois autres ont développé une tumeur plus précocement, vers le 56^{ème} jour après l'injection (Figure 40).

À l'issue de l'expérimentation, nous n'avons observé aucune tumeur au niveau des coussinets dans le groupe ayant uniquement reçu les cellules pré-ob LucF. Ces cellules modifiées pour exprimer la luciférase n'induisent donc pas de tumeur lors de leur prolifération *in vivo* (Figure 40).

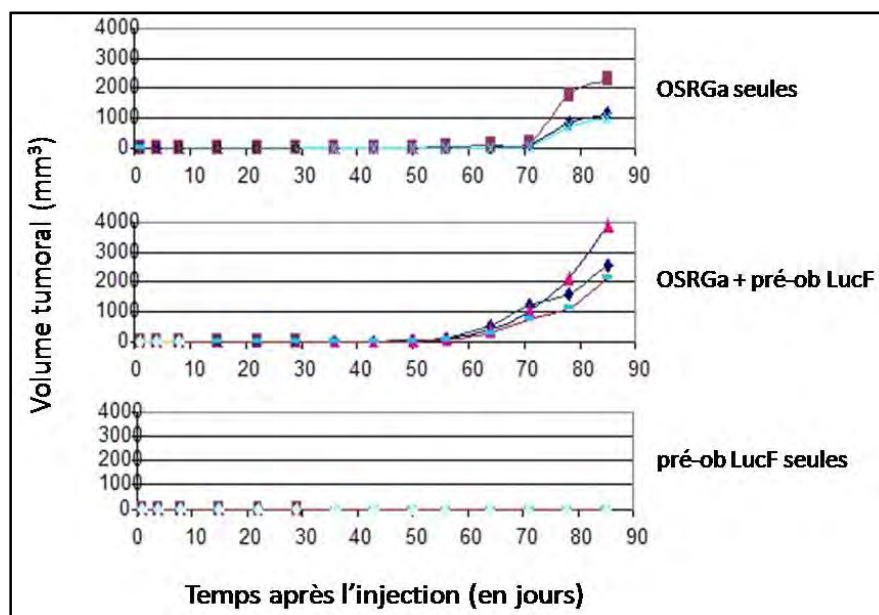


Figure 40 : Evolution des volumes tumoraux chez des souris immunodéficientes nudes Swiss Nu/Nu ayant reçu des cellules d'ostéosarcome de rat seules (OSRGa), ou des cellules OSRGa associées à des pré-ostéoblastes de rat exprimant la luciférase (OSRGa + pré-ob LucF), ou des pré-ostéoblastes de rat exprimant la luciférase seules (pré-ob LucF).

A l'analyse des volumes tumoraux moyens, nous avons là encore observé une apparition plus précoce de la tumeur et un développement tumoral plus rapide dans le groupe "OSRGa + pré-ob LucF" que dans le groupe "OSRGa seules" (Figure 41).

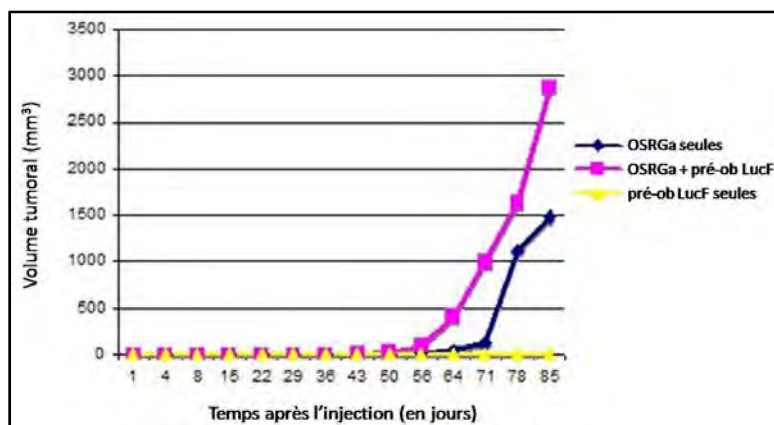


Figure 41 : Evolution des volumes tumoraux moyens chez des souris immunodéficientes nudes Swiss Nu/Nu ayant reçu des cellules d'ostéosarcome de rat seules (OSRGa), ou des pré-ostéoblastes de rat exprimant la luciférase seules (pré-ob LucF), ou la co-injection des deux (OSRGa + pré-ob LucF).

Les précurseurs ostéoblastiques de rat, modifiés pour exprimer la luciférase (pré-ob LucF), favoriseraient un développement plus précoce et plus rapide des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa, dans le modèle en coussinet chez la souris immunodéprimée nude Swiss Nu/Nu.

***ANALYSE DE LA BIOLUMINESCENCE**

Aucun signal de bioluminescence n'a été détecté chez les souris du groupe ayant reçu les cellules OSRGa seules (Figure 42a).

Ce signal est resté localisé au niveau du coussinet plantaire pour les autres groupes "OSRGa + pré-ob LucF" et "pré-ob LucF seules". Aucune migration des cellules pré-ob LucF n'a donc pu être détectée.

Tout comme dans la 1^{ère} expérience, pour les groupes ayant reçu des cellules qui exprimaient la luciférase (groupe pré-ob LucF seules et groupe OSRGa+pré-ob LucF), nous avons observé deux phases comprises entre le 1^{er} jour et le 22^{ème} jour après l'injection : une première phase d'augmentation de l'intensité lumineuse suivie d'une deuxième phase de diminution progressive de l'intensité.

La durée de cette expérimentation nous a permis d'analyser l'évolution du signal de bioluminescence bien après la phase de décroissance (plus de 50 jours après). Pour le groupe ayant reçu les pré-ostéoblastes modifiées pour exprimer la luciférase (pré-ob LucF seules),

nous avons observé une perte complète du signal chez toutes les souris après le 29^{ème} jour (Figure 42b).

Alors que pour le groupe "OSRGa + pré-ob LucF", nous avons observé une persistance du signal de bioluminescence jusqu'au 71^{ème} jour, chez toutes les souris (Figure 42c).

La co-injection de cellules d'ostéosarcome de rat OSRGa associée aux pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria aurait donc permis le maintien des pré-ostéoblastes dans le coussinet, alors que les pré-ostéoblastes injectés seuls auraient disparu 40 jours plus tôt (Figure 42d).

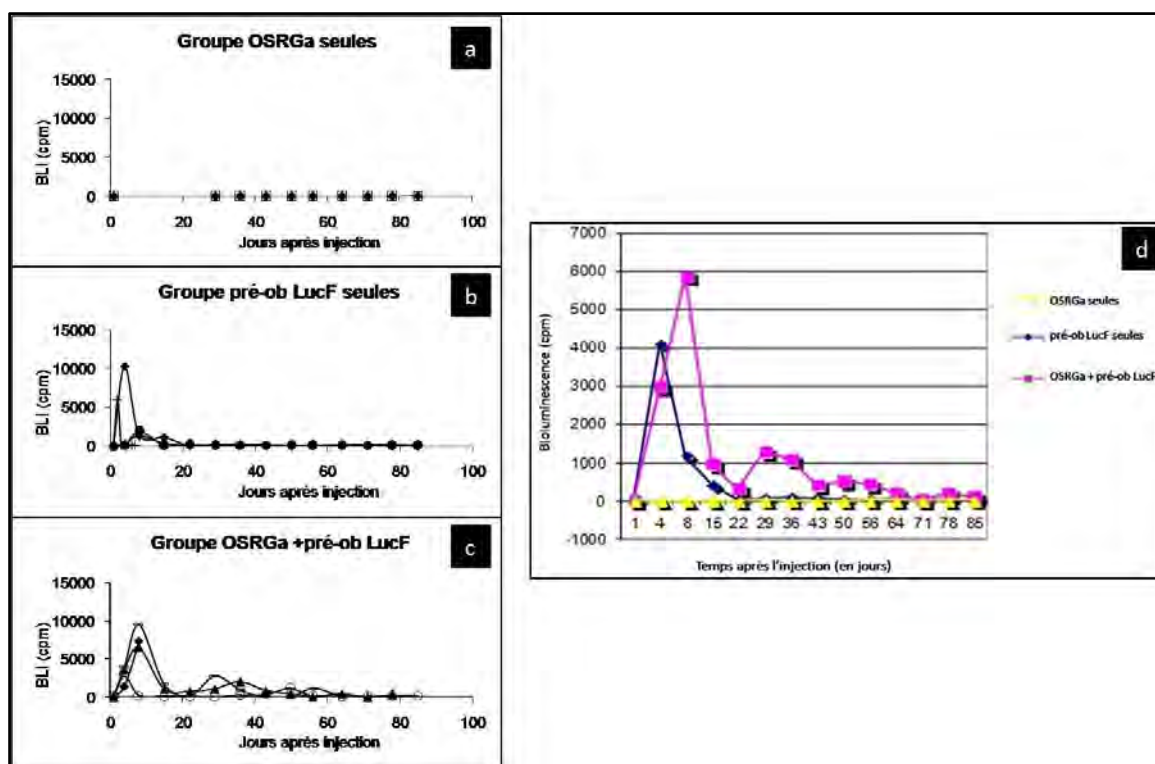


Figure 42 : Evolution de la bioluminescence chez des souris immunodéficientes nues Swiss Nu/Nu ayant reçu :

- a. des cellules d'ostéosarcome de rat seules (OSRGa)*
- b. des pré-ostéoblastes de rat exprimant la luciférase seuls (pré-ob LucF)*
- c. la co-injection des deux (OSRGa + pré-ob LucF)*
- d. évolution de la bioluminescence moyenne des 3 groupes*

***RECHERCHE DE METASTASES**

À l'autopsie de ces animaux, nous n'avons observé aucune métastase ni pulmonaire ni hépatique.

Chez la souris immunodéficiente, les précurseurs ostéoblastiques favoriseraient là encore un développement tumoral local plus précoce et plus rapide. Elles auraient donc une action pro-tumorale locale sur les cellules ostéosarcomateuses.

De plus, à leur tour, les cellules ostéosarcomateuses interagiraient avec les précurseurs ostéoblastiques en favorisant leur maintien dans la tumeur.

La survie des précurseurs ostéoblastiques en présence de cellules ostéosarcomateuses semble se confirmer avec cette expérience.

Puisque l'immaturation des précurseurs ostéoblastiques pourrait être un facteur favorisant la prolifération tumorale in vitro, nous avons voulu savoir in vivo si le degré d'immaturation des précurseurs ostéoblastiques utilisés en co-injection avec les cellules ostéosarcomateuses pouvait avoir une influence sur le développement tumoral. Nous avons utilisé des pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria comme dans cette étude préliminaire, mais également des CSM de rat issues de la moelle osseuse. Nous avons fait le choix d'analyser uniquement le volume tumoral. Nous avons donc réalisé cette expérimentation avec des pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria et des CSM de rat issues de la moelle osseuse, non modifiées pour exprimer la luciférase.

➔ DEUXIEME ETUDE : pré-ob+OSRGa et CSM+OSRGa

Nous avons utilisé 23 souris nudes, mâles, âgées de 6 semaines, réparties en 5 groupes. Nous avons injecté au niveau de leur coussinet plantaire des cellules OSRGa seules pour un groupe de 3 souris, des cellules OSRGa associées à des cellules pré-ob pour un groupe de 7 souris, des cellules OSRGa associées à des cellules CSM pour un groupe de 7 souris, des cellules CSM seules pour un groupe de 3 souris, et enfin des cellules pré-ob seules pour un groupe de 3 souris. L'expérimentation a duré 85 jours.

***ANALYSE DU VOLUME TUMORAL**

Dans cette expérience, les volumes tumoraux au site d'induction sont restés comparables dans tous les groupes. La co-injection de pré-ostéoblastes de rat issus de la calvaria ou de cellules souches mésenchymateuses de rat issues de la moelle osseuse associées

à des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa n'a absolument pas entraîné de changement de progression de la tumeur primitive. Les résultats obtenus dans l'étude préliminaire utilisant des pré-ob LucF n'ont donc pas été reproduits comme attendu.

***RECHERCHE DE METASTASES**

À l'autopsie des animaux, nous avons observé des métastases pulmonaires chez tous les animaux du groupe ayant reçu la co-injection de "CSM et OSRGa" (Figure 43), alors qu'aucune métastase n'a été identifiée dans les autres groupes "pré-ob et OSRGa" ou "OSRGa seules".

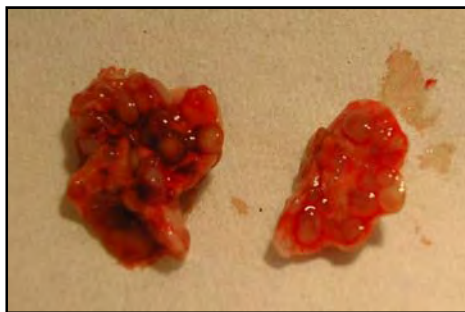


Figure 43 : Présence de métastases pulmonaires bilatérales systématiques dans le groupe de souris nudes ayant reçu la co-injection de cellules souches mésenchymateuses de rat issues de la moelle osseuse associées à des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa

Dans cette deuxième série chez la souris immunodéficiente, les précurseurs ostéoblastiques (pré-ob ou CSM) n'ont eu aucun effet pro-tumoral local sur les cellules ostéosarcomateuses. Par contre les CSM, au contraire des pré-ostéoblastes, ont eu des effets pro-métastatiques avec apparition systématique de localisations secondaires pulmonaires.

Cette observation était inattendue. En effet, alors que l'apparition de localisations secondaires est observée dans 70 à 80 % des cas dans nos modèles d'ostéosarcomes transplantés (ce qui représente une proportion comparable à l'histoire naturelle de la pathologie humaine), l'injection de cellules d'ostéosarcomes en sous-cutané n'est habituellement pas associée au développement de métastases.

III. Conclusion

La première partie de ce travail visait à utiliser les précurseurs ostéoblastiques pour produire stablement des protéines à activité anti-résorption ou anti-tumorale qui permettraient de bloquer le développement des tumeurs osseuses. De plus en tant que précurseurs des ostéoblastes, ces cellules pourraient participer à la synthèse de la matrice osseuse dont le renouvellement est souvent nécessaire à proximité du site tumoral.

Cependant l'effet pro ou anti-tumoral des précurseurs ostéoblastiques restait encore largement à étudier. Dans certains modèles de cancer, elles semblaient avoir un potentiel anti-tumoral, tandis que leur pouvoir immunosuppresseur pourrait leur conférer un potentiel pro-tumoral dans d'autres modèles. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons cherché à connaître les interactions entre précurseurs ostéoblastiques et cellules d'ostéosarcomes sur les modèles murins disponibles au laboratoire.

Nous avons pu valider l'obtention satisfaisante, à la fois en termes de quantité et de pureté, de CSM chez le **rat** à partir de moelle osseuse. L'analyse de ces cellules en cytométrie en flux a montré qu'elles exprimaient le marqueur membranaire de cellules peu différenciées CD90. Aucune contamination par des cellules d'origine hématopoïétique exprimant le marqueur CD45 n'a été identifiée. Enfin le potentiel ostéogénique de ces cellules a été testé *in vitro* en présence d'acide ascorbique et de dexaméthasone.

Des précurseurs ostéoblastiques ont également été obtenus à partir de calvaria de rats justes nés ; ces cellules sont peu différenciées (CD90+), mais déjà engagées dans la voie de différenciation ostéoblastique. Ces pré-ostéoblastes (pré-ob), qui conservent leur capacité à se diviser en continu en culture, ont été utilisés *in vitro* et *in vivo* en comparaison avec des CSM issues de moelle osseuse. Leur étude est importante puisque les pré-ob dérivent des CSM et se trouvent au contact de l'os et de la médullaire. Les pré-ob font partie du microenvironnement des tumeurs osseuses primaires et secondaires et ils pourraient participer au développement tumoral.

L'utilisation des CSM/pré-ob issues de rat nous a permis d'effectuer nos expériences *in vivo* chez la souris nude, en effectuant des greffes cellulaires xénogéniques.

Chez la **souris**, l'obtention de CSM s'est révélée insatisfaisante. L'alternative a consisté à utiliser une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris (ATCC N°CCL-226) qui expriment les marqueurs membranaires de cellules peu différenciées CD29 et CD105 et qui se différencient dans les lignages ostéoblastique, chondroblastique et adipocytaire.

L'utilisation des CCL226 issues de souris C3H/HeN nous a permis d'effectuer nos expériences *in vivo* chez la souris C3H/HeN, en effectuant des greffes cellulaires syngéniques.

La prolifération *in vitro* des cellules d'ostéosarcomes a été suivie en co-culture indirecte (culture en chambre sans contact cellulaire) avec des précurseurs ostéoblastiques d'origine variée (moelle osseuse, calvaria, fibroblastes embryonnaires). Par rapport à la prolifération des cellules d'ostéosarcomes cultivées seules, une augmentation de leur prolifération de 80% à 25% a été observée lors des co-cultures indirectes avec des CSM ou des pré-ostéoblastes respectivement. **Ces résultats indiquent la présence d'un ou plusieurs facteurs solubles produits par les précurseurs ostéoblastiques qui auraient un effet activateur sur la prolifération *in vitro* des cellules d'ostéosarcomes.**

Le développement d'ostéosarcomes a été induit chez des souris immunodéficientes ou immunocompétentes par injection dans le coussinet plantaire de cellules OSRGA ou POS-1 associées ou non à des précurseurs ostéoblastiques. **Des effets pro-tumoraux locaux sans effet pro-métastatique ont été observés** dans deux expériences sur trois.

Cependant dans une des séries, **aucun effet pro-tumoral local n'a été révélé, alors que des effets pro-métastatiques ont pu être observés.** Les CSM –à la différence des pré-ostéoblastes- ont induit des mécanismes métastatiques très puissants, impliquant sans doute le microenvironnement tumoral avec sa vascularisation et permettant aux cellules tumorales d'acquérir de nouvelles caractéristiques (motilité accrue, activité protéolytique...). L'analyse transcriptomique (par puces à Q-PCR) des tumeurs du groupe OSRGA associées aux pré-ostéoblastes, par rapport à celle des tumeurs du groupe OSRGA associées aux CSM, n'a pas permis de mettre en évidence de variations significatives de l'expression de gènes particuliers de la voie des chemokines et de leurs récepteurs et de la voie du TGF β et des BMP (Tumor Growth Factors ; Bone Morphogenic Proteins). Les taux d'expression de 80 gènes par puce se sont révélés identiques entre les tumeurs OSRGA+CSM et OSRGA+pré-ob (Figure 44a).

Par contre, nous avons observé, entre les CSM au passage 1 et au passage 8, une dispersion par rapport à la médiane, ce qui correspond à des différences de taux d'expression pour certains gènes (Figure 44b).

La variabilité des effets produits par les précurseurs ostéoblastiques sur la prolifération *in vitro* des cellules d'ostéosarcomes pourrait être reliée à des changements phénotypiques des cellules souches. Ces changements sont suggérés par des variations d'expression de certains marqueurs membranaires comme CD90 (Figure 29b) ou CD105, et ils ont été confirmés plus largement par la quantification de l'expression des marqueurs des cellules souches et des ostéoblastes (puces à Q-PCR) (Figure 44b).

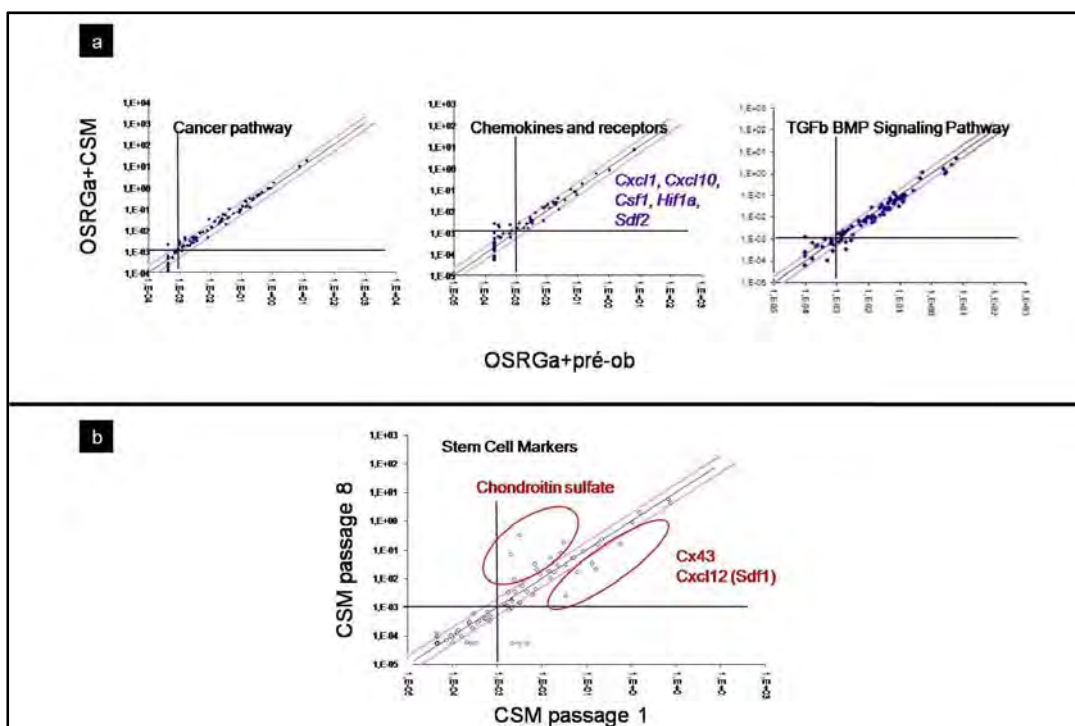


Figure 44 : Analyse *in vitro* par puces à Q-PCR

a. Comparaison des taux d'expression de 80 gènes répertoriés sur une puce à PCR « Cancer PCR Array, Rat Stem », une autre puce « Chemokines and receptors PCR Array » et une autre puce " TGFβ and BMP Pathway Array" (Références respectives 103PARN-033A-2, 103PARN-022A-2 et 103PARN-035A-2, Tébu-bio, Yvelines, France) pour des cellules OSRGa cultivées avec des pré-ob ou avec des CSM (sans contact cellulaire direct)

b Comparaison des taux d'expression de 80 gènes répertoriés sur la puce à PCR « Stem Cell PCR Array, Rat Stem » (Réf: 103PARN-405A-2, Tébu-bio, Yvelines, France) pour des CSM dérivées de moelle osseuse de rat au passage 1 et au passage 8 en culture.

Les valeurs exprimées de chaque gène (Gene of interest GOI) sont corrigées par rapport à la valeur moyenne de 3 gènes de références (House Keeping genes HKG) [$2^{-AVG \Delta Ct (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))}$]. Les valeurs en dessous de 10^{-3} correspondent à des transcrits trop faiblement ou pas exprimés pour être quantifiables. La médiane identifie des taux d'expression semblables dans les 2 extraits d'ARN testés.

Via la production d'un ou de plusieurs facteurs solubles, les cellules souches des ostéoblastes en culture ont montré un effet pro-prolifératif sur les cellules d'ostéosarcomes. L'effet pro-prolifératif des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules d'ostéosarcomes a été observé dans des souris immunocompétentes, mais également immunodéficientes, ce qui implique que l'effet pro-tumoral des précurseurs ostéoblastiques n'est pas restreint à l'activité immunomodulatrice de ces cellules sur les lymphocytes T mais peut impliquer d'autres mécanismes (cellules NK et dendritiques).

De nombreux auteurs décrivent un tropisme important des cellules souches mésenchymateuses pour les tumeurs. Ce phénomène dit de «homing» (Stagg, 2008) n'a pas pu être recherché dans ce travail.

En effet, nous avons envisagé d'étudier ce phénomène en réalisant différents sites d'injection (systémique, intrapéritonéal) de cellules souches mésenchymateuses modifiées pour exprimer la luciférase ou la Green Fluorescent Protein (GFP) à des animaux développant des ostéosarcomes. L'utilisation de la bioluminescence *in vivo* après injection de luciférine ou la réalisation d'analyses histologiques à la recherche de la GFP ne se sont pas révélées être des techniques satisfaisantes pour détecter un faible nombre de cellules.

Nous avons également envisagé d'analyser la migration métastatique à l'aide de la bioluminescence *in vivo*, pour savoir si les cellules souches mésenchymateuses participent à ce phénomène. Cette technique s'est avérée inadaptée à la détection de métastases pulmonaires. En effet, nous avons observé qu'après injection en intracardiaque de cellules d'ostéosarcomes exprimant la luciférase, aucun signal en bioluminescence n'était détectable sur les animaux anesthésiés, alors qu'après sacrifice des animaux, la détection de photons était possible dans les poumons explantés. La bioluminescence *in vivo* ne présente alors pas d'avantages par rapport à une analyse visuelle macroscopique, puisqu'elle nécessite le sacrifice de l'animal. La capture des photons dans les poumons s'avère donc limitée pour cet organe profond et mobile. Il s'agit là d'un enjeu actuel de l'imagerie animale.

En conclusion notre but principal était de connaître l'action des cellules souches mésenchymateuses ou des précurseurs ostéoblastiques sur les cellules ostéosarcomateuses à la fois *in vitro* et *in vivo*. **À l'issue de ces recherches, les données *in vitro* corroborent les résultats *in vivo*, les cellules souches mésenchymateuses ou les précurseurs ostéoblastiques sembleraient avoir une action pro-tumorale sur les cellules ostéosarcomateuses.**

La mise en évidence d'effets potentiellement pro-tumoraux des cellules souches mésenchymateuses ou des précurseurs ostéoblastiques dans l'ostéosarcome nous a donc conduit à :

- 1) différer l'utilisation des CSM/précurseurs ostéoblastiques dans des stratégies anti-tumorales de l'ostéosarcome
- 2) déterminer si les CSM/précurseurs ostéoblastiques peuvent être considérés comme une cible thérapeutique dans les cancers primitifs de l'os.

A la lumière de ces résultats, il apparaît également important de montrer si des interactions pro-tumorales existent aussi entre des cellules humaines d'ostéosarcomes et des cellules souches mésenchymateuses humaines. Ceci d'autant plus que les services de Chirurgie Orthopédique (Pr Gouin) et de Chirurgie Plastique (Pr Duteille) du CHU de Nantes ont été confrontés à un cas clinique rare : une **récidive locale d'un ostéosarcome après plus de 10 ans de rémission**. Cette récurrence inattendue est survenue quelques mois après la correction à visée esthétique par injection de graisse autologue d'une séquelle de type perte de galbe de l'épaule, liée à la prise en charge initiale de l'ostéosarcome. Nous devons nous interroger sur l'application de cette technique de **lipomodélage** (injection de graisse autologue) qui apporte de la graisse mais aussi des cellules souches mésenchymateuses dans des sites où pourraient persister des cellules tumorales quiescentes.

Partie 2 :
Tissu adipeux
et thérapie tissulaire dans l'ostéosarcome

I. Cas clinique

A. Histoire clinique

En août 1994, une patiente de 17 ans, présentant une tumeur osseuse métaphyso-épiphysaire proximale de l'humérus gauche, a été prise en charge dans le service d'orthopédie du CHU de Nantes (Pr Gouin). Une biopsie a permis de faire le diagnostic d'ostéosarcome télangiectasique (ostéosarcome de haut grade), concordant avec les données cliniques et radiologiques (Figure 45).

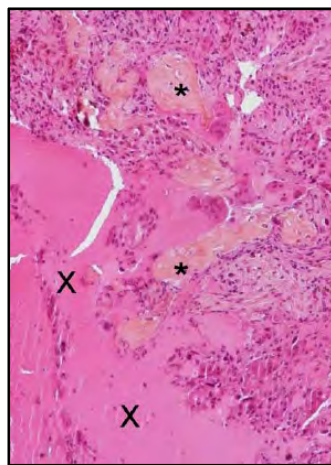


Figure 45 : Diagnostic d'ostéosarcome télangiectasique sur la biopsie initiale. Prolifération de cellules néoplasiques, formation focale d'os ostéoïde () et de lacs télangiectasiques remplis de sang (x) (coloration HES, microscopie optique, grossissement original x100)*

Relativement au protocole thérapeutique de l'époque, la patiente a reçu une chimiothérapie pré-opératoire (4 cures d'ifosfamide/cisplatine). L'exérèse chirurgicale consista en une résection carcinologique extra-articulaire de l'extrémité proximale de l'humérus. La reconstruction osseuse fit recours à un lambeau vascularisé de scapula et arthrodèse d'épaule. L'examen histo-anatomopathologique de la pièce opératoire conclut que les marges de l'exérèse étaient saines et que la tumeur répondait bien au protocole de chimiothérapie (0 % de cellules viables : grade 4 de la classification de Huvos). La patiente bénéficia alors de 2 nouvelles cures semblables de chimiothérapie adjuvante.

La patiente est suivie conjointement par l'oncologue et le chirurgien orthopédique tous les 6 mois pendant dix ans. Les examens annuels cliniques (volume du bras, apparition de douleurs) et paracliniques (radiologie conventionnelle) ne montrent aucun signe de récurrence.

Dix ans après l'intervention, en 2004, elle est en rémission complète.

En 2005, elle est adressée dans le service de chirurgie plastique et reconstructrice du CHU de Nantes (Pr Duteille) pour un défaut de galbe de l'épaule gauche et des adhérences cicatricielles douloureuses. La chirurgie d'exérèse ayant emporté une partie du muscle deltoïde et tout le tissu sous-cutané en regard de la tumeur, on note effectivement au cours de l'examen clinique un défaut tissulaire important, justifiant un geste d'amélioration esthétique (Figure 46).



Figure 46 : Défaut de galbe de l'épaule gauche post-chirurgicale en janvier 2005, 2 mois avant le premier temps de lipomodélage.

Nous projetons dans un premier temps de réaliser un lambeau musculaire pédiculé de grand dentelé. Malheureusement, en per-opératoire, le pédicule thoraco-dorsal ayant très probablement été lésé au cours de l'exérèse tumorale, n'est pas retrouvé, rendant le prélèvement du lambeau impossible.

Nous lui proposons alors dans un deuxième temps de réaliser des injections de graisse autologue selon la technique de Coleman. La patiente va alors bénéficier de trois temps de réinjection en 03/2005, 06/2005, 01/2006, avec une graisse prélevée au niveau de l'abdomen et de la région trochantérienne gauche.

Le résultat est satisfaisant tant sur le plan fonctionnel que cosmétique. En effet, l'épaule est regalbée et les douleurs liées à des adhérences fibreuses en regard de la cicatrice ont disparu.

En août 2007, soit 18 mois après la dernière réinjection de graisse, la patiente consulte son oncologue devant l'apparition récente d'une augmentation de volume du bras et de douleurs d'horaire mixte, inflammatoire et mécanique (Figure 47a). Les clichés de radiologie conventionnelle montrent un aspect suspect de l'extrémité supérieure de l'humérus gauche. L'IRM retrouve une volumineuse masse circonscrite de 10 cm de large et 12 cm de long, à composante kystique hétérogène, prenant le gadolinium après injection de produit de contraste, qui correspond à une tumeur extensive dans le tissu sous-cutané en regard de la zone du lipomodélage (Figure 47b). La biopsie chirurgicale met en évidence *"un processus tumoral malin correspondant à une récurrence de l'ostéosarcome connu chez cette patiente. La prolifération tumorale est faite de cellules de grande taille, présentant de volumineux noyaux irréguliers en taille et en forme, avec présence de nombreuses images de mitoses. Ces éléments s'organisent en nappes. Très focalement, on observe un peu de substance ostéoïde. Présence également de territoires hémorragiques, sans aspect télangiectasique franc dans la limite de cette biopsie"* (Figure 47c). Le bilan d'extension est négatif.

Le traitement consiste à nouveau en une polychimiothérapie néoadjuvante (4 cures du protocole français API-AI) que la patiente supporte beaucoup moins bien (asthénie majeure, insuffisance rénale aiguë nécessitant des séjours en réanimation et des séances de dialyse, mucite grade 3 limitant l'alimentation). Puis la prise en charge chirurgicale consiste en une désarticulation trans-scapulaire gauche (Figure 47d).

L'analyse histologique retrouve la *"persistance après chimiothérapie d'un très petit reliquat tumoral caractérisé par un petit nombre de cellules souvent de grande taille comportant un volumineux noyau quelquefois un peu monstrueux. Ces cellules siègent au sein d'importants remaniements caractérisés par quelques territoires présentant une trame ostéoïde, par de larges territoires de fibrose sur lesquels se détachent parfois des cellules tumorales totalement fantomatiques. Présence également de larges plages hémorragiques plus ou moins remaniées correspondant peut-être à une composante télangiectasique"*. L'analyse de la tumeur met en évidence à nouveau une bonne réponse de la tumeur à la chimiothérapie (grade 3 selon le score de Huvos). La chimiothérapie pré-opératoire ayant occasionné une insuffisance rénale sévère, il n'y a pas eu de chimiothérapie post-opératoire. Malgré l'importante nécrose tumorale, la présence des nombreuses zones hémorragiques à l'examen anatomopathologique permet de retenir le diagnostic d'ostéosarcome télangiectasique (Figure 47e). Il s'agit donc très probablement d'une tumeur du même type que la première lésion traitée 13 ans auparavant.

La récurrence locale d'ostéosarcome télangiectasique est confirmée.

A 2 ans de recul, la patiente ne présente pas de signes de récurrence locale ou à distance.

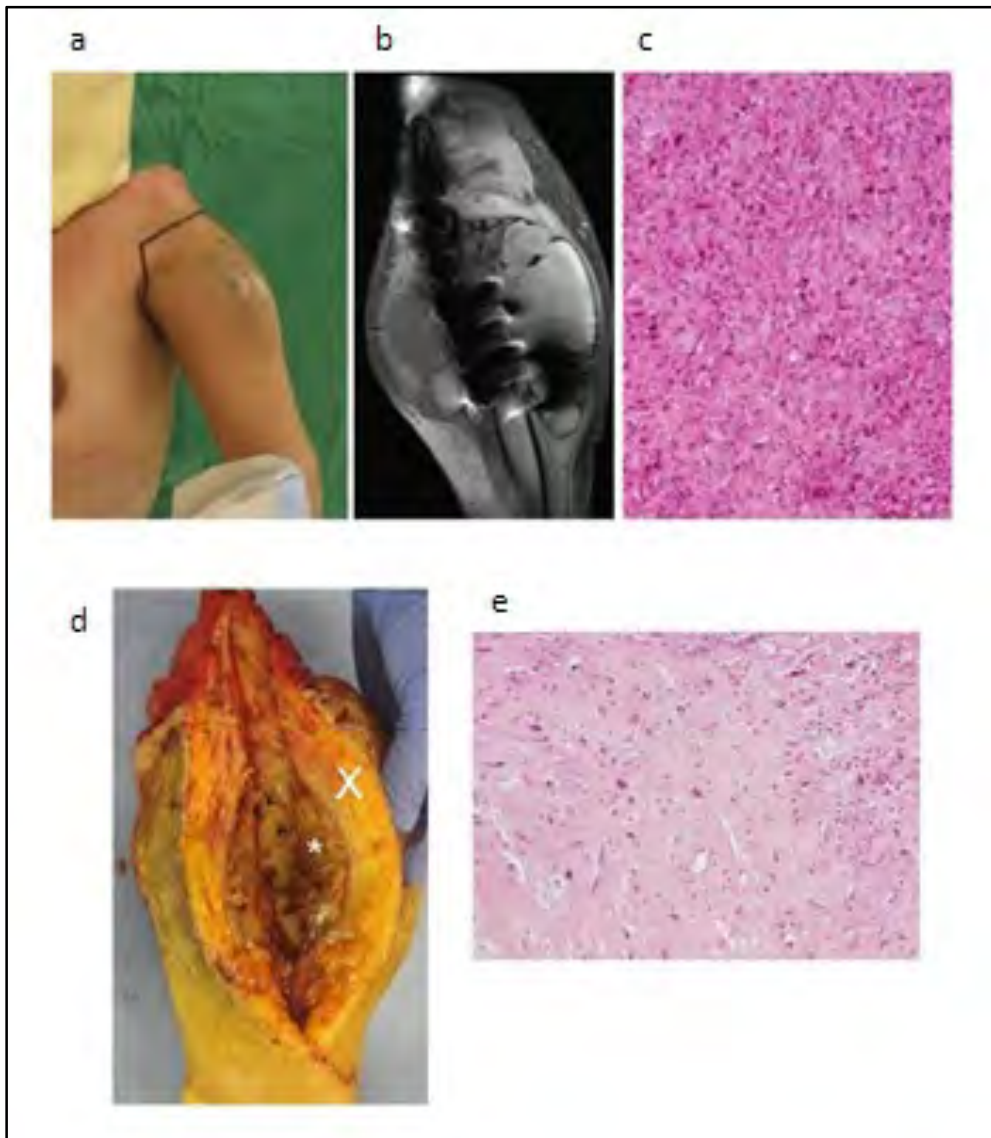


Figure 47 : Récidive locale tardive au niveau du site du lipomodélage.

- a. Augmentation de volume et aspect inflammatoire du bras gauche au niveau du site du lipomodélage après 4 cures de chimiothérapie néoadjuvante.*
- b. Tumeur extensive et circulaire des parties molles du bras gauche mesurée en imagerie par résonance magnétique à 12 cm x10 cm (séquence T2)*
- c. Analyse histologique de la biopsie de cette récurrence locale tardive : prolifération de cellules néoplasiques de haut grade et fine formation focale d'os ostéoïde (coloration HES, microscopie optique, grossissement original x100)*
- d. Pièce de résection chirurgicale ouverte en per-opératoire : masse tumorale autour de la diaphyse humérale gauche (*) et infiltration graisseuse périphérique (X)*
- e. Analyse histologique de la pièce de résection de cette récurrence locale tardive (coloration HES, microscopie optique, grossissement original x100)*

B. Hypothèses

Une récurrence locale d'ostéosarcome télangiectasique à 13 ans est tout à fait atypique. Nous n'avons pas retrouvé de cas similaire dans la littérature. Alors pourquoi et comment cette patiente a récidivé localement alors qu'elle était en rémission complète depuis plus de dix ans ?

L'injection de graisse autologue selon la technique de Coleman est-elle impliquée tout au moins en partie dans cette rechute ?

L'hypothèse la plus probable à la récurrence ostéosarcomateuse observée dans notre cas clinique est la persistance de cellules cancéreuses quiescentes qui se sont mises à proliférer de nouveau. Concernant le mécanisme de réactivation du phénomène de prolifération, plusieurs possibilités peuvent être avancées :

- 1) La récurrence est un événement indépendant du transfert de graisse : coïncidence
- 2) La récurrence est un événement dépendant du transfert de graisse : conséquence
- 3) La récurrence est un événement dépendant de la chirurgie: inflammation induite

D'autres hypothèses hautement moins probables doivent être mentionnées :

- *Il ne s'agit pas d'une récurrence mais d'une nouvelle tumeur
- *Il ne s'agit pas d'une récurrence locale mais d'une récurrence à distance dans le tissu adipeux prélevé qui a ensuite été transplanté

1) Coïncidence

Dans le contexte du cas clinique rapporté ici, la survenue tardive d'une récurrence locale d'un ostéosarcome de haut grade chez une patiente jeune ne présentant pas de facteurs prédictifs de récurrence semble être un événement trop rare pour que cette récurrence survienne par hasard quelques mois après un geste de greffe autologue de tissu adipeux.

Cette hypothèse est donc une hypothèse d'élimination, que nous ne retiendrons que si nous pouvons démontrer l'impertinence des autres hypothèses retenues.

2) *Conséquence du transfert de graisse*

La réalisation de 3 séances de lipomodélage quelques mois avant la récurrence locale tardive d'un ostéosarcome au lieu même du transfert de graisse doit nous interroger sur le rôle que peut avoir eu la greffe adipocytaire sur cette récurrence et par quels mécanismes.

La graisse est composée de divers éléments spécifiques (adipocytes, cellules souches mésenchymateuses adipocytaires) et non spécifiques (composants sanguins). Les différents composants spécifiques du tissu adipeux sont impliqués dans le métabolisme osseux par des actions directes et indirectes sur les cellules ostéoblastiques. Les cellules ostéosarcomateuses étant des ostéoblastes transformés, ces mêmes éléments peuvent donc être impliqués dans le développement d'un processus tumoral ostéosarcomateux.

A. INFLUENCE DU TISSU ADIPEUX

Il existe une corrélation entre la masse de tissu adipeux et l'incidence de certains cancers. Si l'obésité est un facteur de risque reconnu des pathologies cardiovasculaires et métaboliques (diabète de type 2), elle est aussi directement associée à l'incidence des pathologies cancéreuses. Ainsi, une augmentation de 5 kg/m² de l'Index de Masse Corporelle (calculé par le rapport entre le poids et la taille élevée au carré) entraîne de façon significative une incidence plus élevée de nombreux cancers (adénocarcinome œsophagien, cancers du colon, du rein, de la thyroïde, de l'endomètre...) (Renehan, 2008).

L'influence du tissu adipeux sur l'incidence de certains cancers s'explique par les modifications du métabolisme hormonal engendrées par l'augmentation de la masse grasse. L'insulino-résistance et l'hyper-insulinémie chronique résultante, l'inflammation localisée et l'augmentation de la biodisponibilité des hormones stéroïdes et sexuelles semblent être des éléments déterminants. Ces modifications entraînent un déséquilibre de la balance physiologique entre prolifération cellulaire, différenciation et apoptose (Bianchini, 2002 ; Calle, 2004).

Motrescu a décrit un cercle vicieux entre les adipocytes et les cellules cancéreuses : les cellules cancéreuses induisent la sécrétion par le tissu adipeux de Matrix Metalloproteinase 11, qui à son tour, favorise la survie des cellules cancéreuses, ce qui conduit à une progression tumorale liée aux modifications du microenvironnement (Motrescu, 2008).

D'autre part, la graisse peut favoriser l'angiogenèse, interférant ainsi avec la croissance tumorale. En effet, il a été démontré que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui est exprimé dans le tissu conjonctif interstitiel de la graisse, favorise la survie du greffon de graisse (Nishimura, 2000). Mais il pourrait alors également stimuler la croissance, l'invasion et la diffusion métastatique des tumeurs solides (Kaya, 2000 ; Vona-Davis, 2009).

B. INFLUENCE DES ADIPOCYTOKINES

Les adipocytes sécrètent des cytokines spécifiques. Si ces adipocytokines ont des implications métaboliques bien connues, elles semblent aussi avoir un rôle potentiel dans l'angiogenèse et le développement tumoral (Gimble, 2003 ; Housa, 2006).

La *leptine* semble favoriser la prolifération des cellules tumorales dans les cancers de prostate et de la vessie, du sein et de l'ovaire, de l'œsophage et de l'estomac. Dans le cas de l'ostéosarcome qui nous concerne ici, une publication de 2006 montre que la leptine favorise *in vitro* le développement de la lignée de cellules ostéosarcomateuses SaOS2 (Burguera, 2006).

A l'opposé, des concentrations plasmatiques élevées en *adiponectine* semblent diminuer les risques de cancer de l'endomètre et de cancer du sein chez la femme ménopausée. De même, les patients atteints de cancers gastriques présentent des concentrations plasmatiques en adiponectine basses. Concernant le tissu osseux, l'Adiponectine possède la capacité de stimuler le Receptor Activator de NF-κB Ligand (RANKL ou TNFSF11) et d'inhiber l'Ostéoprotégérine par les ostéoblastes (Luo, 2006). Par conséquent, le tissu adipeux peut réguler deux médiateurs de la résorption osseuse qui sont très impliqués dans le développement des tumeurs osseuses (Kingsley, 2007). En effet, le blocage de RANKL par RANK soluble (Lamoureux, 2008 ; Pearse, 2001 ; Zhang, 2003) ou par le récepteur leurre Ostéoprotégérine (Lamoureux, 2007 ; Croucher, 2001 ; Heath, 2007 ; Jones, 2006 ; Morony, 2001) a montré son efficacité *in vivo* dans plusieurs modèles de tumeurs osseuses, conduisant à la mise au point clinique d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre RANKL (Denosumab) (Schwarz, 2007). On ne retrouve aucune publication sur l'éventuelle influence de l'adiponectine sur la prolifération ostéosarcomateuse.

C. INFLUENCE DES AD-CSM

*Enfin, le rôle des Ad-CSM qui sont contenues dans le tissu adipeux doit également être considéré (Gimble, 2004). Notre étude a montré que la graisse prélevée selon la procédure de Coleman contient des cellules progénitrices qui possèdent les caractéristiques phénotypiques et les propriétés de différenciation définissant les CSM. Sur le plan phénotypique, elles expriment les marqueurs d'immaturité cellulaire CD90 et CD105 et sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD34. Elles sont capables d'autorenouvellement *in vitro* et n'entraînent pas de tumeurs lors des injections *in vivo*. Elles peuvent se différencier *in vitro* vers les lignées ostéoblastique, adipocytaire et myocytaire. Ces cellules sont proposées pour améliorer l'angiogenèse après une lésion ischémique (Carriere, 2009 ; Rehman, 2004) ou pour favoriser la prise des injections de graisse en chirurgie d'augmentation ou de reconstruction mammaires (Yoshimura, 2008). Par contre, elles pourraient favoriser la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Walter, 2009). De nombreuses publications ont fait référence à l'influence des CSM sur les pathologies tumorales. Dans la littérature, on retrouve des effets contradictoires pro ou anti-tumoraux en fonction de la pathologie cancéreuse (cf Introduction bibliographique). Concernant l'ostéosarcome, en dehors de la publication récente de notre équipe, seule une publication de Xu *et al.* en 2009 a montré *in vivo* un effet pro-tumoral local et pro-métastatique de la co-injection de CSM médullaires humaines et de cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 dans un modèle expérimental en coussinet chez la souris nude (Xu, 2009).

3) Implication de l'inflammation induite par la chirurgie

Le geste chirurgical induit des phénomènes de stress et d'inflammation susceptibles d'influencer le développement tumoral en provoquant la réactivation de cellules tumorales dormantes (Demicheli, 2007 ; Varani, 1981).

Le stress provoqué par la chirurgie augmente la sécrétion de catécholamines. Celles-ci peuvent activer le cycle cellulaire tumoral par l'activation des voies de signalisation cAMP-PKA, via les récepteurs β -adrénergiques. Ainsi, par l'augmentation de l'expression de VEGF, MMP2 et MMP9, le stress participe à l'angiogenèse et au développement tumoral (Thaker, 2006).

Le traumatisme chirurgical agit aussi indirectement sur la progression tumorale par une action immuno-régulatrice, en particulier par une diminution de l'activité des cellules Natural Killer. Le geste chirurgical provoque enfin une réaction inflammatoire locale mais aussi généralisée pouvant aller jusqu'au syndrome de réponse inflammatoire systémique. Cette inflammation génère la production de cytokines (IL-6, IL-10, C-reactive protein [CRP], TNF α ...) pouvant aussi être impliquées dans la progression tumorale (Miyaoka, 2005).

Cette hypothèse attribuerait un rôle mineur voire nul au transfert de graisse en lui-même, mais constitue tout de même un avertissement concernant toute procédure chirurgicale dans un environnement post-néoplasique.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de définir les interactions entre le tissu adipeux humain avec ses Ad-CSM et les cellules d'ostéosarcomes, et ainsi tenter de répondre à la question sur l'innocuité du lipomodélage dans le cadre d'une reconstruction secondaire aux séquelles du traitement initial d'un ostéosarcome.

Les premières données précliniques observées dans notre laboratoire ont été obtenues en utilisant les modèles murins disponibles au laboratoire : modèle POS-1 (ostéosarcome de souris en coussinet chez la souris C3H) et modèle OSRGa (ostéosarcome de rat en coussinet chez la souris nude). La co-injection de CSM murines ou de CSM de rat avec des cellules ostéosarcomateuses provoquait un démarrage plus précoce et plus synchrone des tumeurs (cf Partie 1).

Pour mettre en évidence une éventuelle implication de la greffe adipocytaire sur la récurrence d'un ostéosarcome, nous avons travaillé *in vivo* sur la mise au point de 2 modèles murins d'ostéosarcome humain par transplantation de tumeurs SaOS2 et HOS. Après avoir observé *in vivo* les effets de l'injection d'adipocytes ou d'Ad-CSM sur le développement des processus tumoraux dans ces nouveaux modèles murins, nous avons tenté de reproduire *in vitro* cette influence sur la prolifération de 3 lignées humaines de cellules ostéosarcomateuses (SaOS2, HOS et U2OS), afin de mieux comprendre les mécanismes des interactions entre tissu graisseux et cellules d'ostéosarcomes.

II. Matériel et méthodes

A. Milieux et solutions

- *Milieu α MEM (Minimum Essential Medium- α ; Invitrogen ; Cergy Pontoise ; France)
- *Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute ; Biowhittaker, Verviers, Belgique) contenant de la L-glutamine
- *Milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Biowhittaker) contenant 4,5 g/L de glucose et 2 mM de L-glutamine
- *Antibiotiques (ATB) (Pénicilline 100 U/mL et Streptomycine 100 mg/L ; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)
- *Sérum de Veau Foetal (SVF ; Dominique Dutscher, Brumath, France)
- *DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sans Ca ni Mg ; Biowhittaker)
- *Trypsine-EDTA : trypsine 0,5 g/L et EDTA 0,2 g/L (Biowhittaker)
- *Solution de bleu trypan (Bleu trypan 0,4 %, chlorure de sodium 0,81 %, phosphate de potassium 0,006 % ; Sigma, St Quentin Falavier, France)
- *Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières, France)
- *Luciférine 12 mg/mL (Interchim, France)
- *Collagénase
- *Paraformaldéhyde (PFA)
- *Fibroblast Growth Factor-Basic Human (β -FGF, Sigma)
- *Sel de Tétrazolium XTT (Roche) : Sodium 3'-(1-(phénylaminocarbonyl)-3,4-tétrazolium)-bis(4-méthoxy-6-nitro) benzen sulfonic acid hydrat
- *Supports plastiques stériles (Corning, New York, USA ; BD Falcon, Franklin Lakes, USA)
- *Chambres de co-cultures : cell culture insert, 3 μ m pore size, PET track-etched membrane 24 well format (BD Falcon, Franklin Lakes, USA)
- *Anesthésiants : tous les modèles murins bénéficie d'une induction avec du gaz isoflurane (Florène®, Abbot) / air (1,5 %-1 l/min). Protocole d'entretien pour les souris : 30 ml de PBS, 5mL d'Imalgène 500 (Bayer, Pharma, Puteaux, France) et 3mL de rampun 2 % (Merial, Lyon, France), injection intrapéritonéale de 100 μ L pour 100 gr
- *Acide ascorbique (L-Ascorbic Acid ; Sigma)
- *Dexaméthasone (Sigma)
- * β -glycérophosphate (β -glycérophosphate, Disodium Salt ; Sigma)
- *Isobutylmethylxanthine (IBMX, Sigma)

*Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1, Sigma)

*Anticorps monoclonaux spécifiques de SM- α actine (clone 1A4, Sigma), SM22- α (clone 10H12, Novocastra), SM- α actinine (clone 1E12, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) et la chaîne lourde de SM myosine (clone hsmv, Sigma)

B. Anticorps et protéines recombinantes humaines utilisés

*Anticorps de souris couplé FITC anti-humain CD34 dilué au 1/100ème (BioLegend, San Diego, USA)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain CD44 dilué au 1/100ème (BD Biosciences)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain CD45 dilué au 1/100ème (BioLegend, San Diego, USA)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain Integrin α V β 3 (CD51/61) 0.025mg/mL dilué au 1/100ème (R&D Systems, Deutschland)

*Anticorps de souris couplé FITC anti-humain CD90 0.2mg/mL dilué au 1/100ème (BD, Biosciences)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain CD105 dilué au 1/100ème (BioLegend, San Diego, USA)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain CD117 dilué au 1/100ème (BioLegend, San Diego, USA)

*Anticorps de souris couplé PE anti-humain Leptin-R 0.025mg/mL dilué au 1/100ème (R&D Systems, Deutschland)

*Anticorps monoclonal de hamster couplé FITC pour Integrin β 1 (= α -mouse CD29) 0.5 mg/mL dilué au 1/100ème (Abcam, Cambridge, UK)

*Anticorps isotype contrôle de souris couplé FITC IgG1 κ 50 μ g/mL dilué au 1/100ème (BD Biosciences)

*Anticorps isotype contrôle de souris couplé PE IgG1 κ 50 μ g/mL dilué au 1/100ème (BD Biosciences)

*Anticorps de chèvre anti-humain Adiponectin Receptor 1 pour Western Blot à 1 mg/mL (EnzoLifeSciences)

*Anticorps de chèvre anti-humain Adiponectin Receptor 2 pour Western Blot à 1 mg/mL (EnzoLifeSciences)

*Recombinant Human Leptin 1mg (R&D Systems, Deutschland)

*Recombinant Human Adiponectin/Acrp30 50 μ g dans 76,5 μ L (R&D Systems, Deutschland)

C. Lignées cellulaires

1) Obtention des Ad-CSM

Les prélèvements de graisse sont réalisés au cours d'interventions chirurgicales comprenant un temps de lipoaspiration. Le consentement oral du patient est sollicité avant l'intervention. Le site donneur est la paroi abdominale antérieure. La graisse est prélevée suivant la procédure de Coleman, à l'aide d'une seringue Luer-Lock de 10 mL reliée à une canule spécifique. Pendant tout le prélèvement, la même aspiration est maintenue grâce à un procédé de blocage du piston de la seringue. La graisse lipoaspirée n'est pas centrifugée au bloc opératoire.

Le prélèvement est alors dilué dans un volume équivalent de α MEM sans SVF mais supplémenté en Collagénase A à la concentration de 1mg/mL afin de réaliser une dissociation cellulaire chimique. L'ensemble est vortexé pour obtenir une bonne homogénéisation puis mis en incubation à 37° C pendant 45 minutes. Une centrifugation à 1 600 tours par minute pendant 10 minutes est alors effectuée. Le culot cellulaire est repris dans du α MEM supplémenté avec 10 % de SVF, 1 % d'ATB (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 mg/l) et 1 ng/mL de β -FGF et ensemencé dans une flasque de 25 cm².

Au bout de 24 heures, le tapis cellulaire est rincé trois fois avec du PBS afin d'éliminer les cellules sanguines non adhérentes. Les Ad-CSM sont ainsi isolées grâce à leur aptitude d'adhérence au plastique.

Le milieu est changé tous les 3 à 4 jours. Les cellules sont mises en culture jusqu'à 70-80 % de confluence (obtenue entre J7 et J14).

Les cellules sont alors décollées puis repiquées à 3 000 cellules par cm².

Au bout de 20 repiquages, les Ad-CSM gardent leur aptitude à proliférer, à condition de conserver la supplémentation en β -FGF dans le milieu.

2) *Présentation des lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains utilisées*

***SAOS2 (MODELE D'OSTEOSARCOME HUMAIN)**

SaOS2 est une lignée cellulaire humaine dérivée d'un ostéosarcome survenu en 1973 chez une jeune fille caucasienne de 11 ans (Fogh, 1977). Elle est cultivée dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % d'ATB (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 mg/l).

***HOS (MODELE D'OSTEOSARCOME HUMAIN)**

HOS est une lignée cellulaire humaine dérivée d'un ostéosarcome de l'extrémité distale du fémur survenu chez une jeune fille caucasienne de 13 ans. Les cellules HOS ont été transformées par un traitement au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine afin d'augmenter leur cancérogénicité. C'est l'une des premières lignées à avoir été caractérisée *in vitro* (McAllister, 1971). Elle est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % d'ATB (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 mg/l).

***U2OS (MODELE D'OSTEOSARCOME HUMAIN)**

U2OS est une lignée cellulaire humaine datant de 1964 et provenant d'un ostéosarcome du tibia modérément différencié chez une jeune fille de 15 ans (Pontén, 1967). Elle est cultivée dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % d'ATB (Pénicilline 100 U/ml et Streptomycine 100 mg/l).

Toutes ces cellules sont incubées dans une atmosphère humide à 37° C et 5 % de CO₂. Les manipulations s'effectuent sous hotte à flux laminaire vertical. Lorsque les cellules sont à confluence, le tapis cellulaire est lavé au DPBS, puis incubé 2 à 3 minutes à 37° C dans 40 µL/cm² de trypsine-EDTA, permettant de décoller les cellules du support et de les séparer entre elles. La trypsine est ensuite neutralisée par du milieu de culture supplémenté avec SVF 10 %.

D. Caractérisation des lignées cellulaires

1) Analyse par cytométrie en flux

Cent mille cellules par puits sont déposées dans une plaque 96 puits à fond en «V», rincées dans 200 µL de DPBS, puis saturées avec 200 µL de DPBS-BSA 4 %.

Les anticorps d'intérêt aux dilutions appropriées, sont ajoutés dans 50 µL.

Les cellules sont incubées avec les anticorps à 4° C, pendant 30 minutes.

Après deux autres rinçages (l'un au DPBS-BSA 4 %, l'autre au DPBS), les cellules sont fixées dans du PBS avec 1 % de paraformaldéhyde (PFA) et transférées dans un tube pour lecture au cytomètre FACSCalibur™ (BD Biosciences) ou au cytomètre Cytomics™ FC500 (Beckman Coulter). L'acquisition est réalisée, de façon respectives, par le logiciel Cellquest Pro ou le CXP™ Cytometer. L'analyse est effectuée, dans tous les cas, à l'aide du logiciel WinMDI.

Parmi les divers antigènes membranaires répertoriés pour décrire les CSM, nous nous sommes intéressés aux protéines de surface présentes sur les cellules souches les plus fréquemment décrites dans la littérature : l'antigène CD90 (Thy-1, antigène de différenciation en Thymocyte-1), CD105 (endoglin, présent à la surface des cellules endothéliales et sur les cellules souches), l'antigène CD34 (récepteur de L-sélectine) et l'antigène CD45 (tyrosine phosphatase, exprimé par les lymphocytes et les CSH). Les antigènes CD90 et CD105, utilisés comme des marqueurs d'immaturité cellulaire, sont exprimés à la surface des cellules souches qu'elles soient mésenchymateuses ou hématopoïétiques. Le CD34 et le CD45 sont quant à eux présents sur les CSH et non sur les CSM.

Des anticorps dirigés contre les antigènes CD90, CD105, CD34 et CD45 couplés au fluorochrome FITC ont été utilisés indépendamment les uns des autres. Nous avons ainsi obtenu de simples marquages pour ces antigènes. En contrôle, un anticorps avec le même isotype, marqué par le même fluorochrome FITC a été utilisé. Il correspond à l'intensité de fluorescence due à une fixation aspécifique des anticorps.

Les CSM sont caractérisées par le marquage suivant : CD90+ et CD105+, CD34- et CD45-.

2) Capacité de différenciation vers la lignée ostéoblastique, adipocytaire et myocytaire

Elle est vérifiée à l'aide de tests de différenciation. Les précurseurs ostéoblastiques sont ensemencés à 10 000 cellules/cm² en plaque 6 puits, puis cultivées dans leur milieu complétement avec 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques jusqu'à confluence (environ 7 jours). La première semaine, les cellules sont cultivées dans un milieu inducteur de la différenciation ostéoblastique, adipocytaire ou myocytaire, complétement avec 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques.

*Pour la différenciation vers la lignée ostéoblastique : le milieu contient 50 µg/ml d'acide ascorbique et 10⁻⁸ M de dexaméthasone et est changé tous les 2 jours. La deuxième semaine, 10 mM de β-glycérophosphate sont ajoutés au milieu de culture. Le milieu est alors changé tous les jours. Après deux semaines de culture, une coloration au Von Kossa et au rouge alizarine est utilisée pour détecter les nodules minéralisés formés *in vitro*.

*Pour la différenciation vers la lignée adipocytaire : le milieu contient 10⁻⁶ M de dexaméthasone et 0,5 mM d'isobutylmethylxanthine. Après deux semaines de culture, une coloration de Nil Red est utilisée pour détecter des gouttelettes lipidiques *in vitro*.

*Pour la différenciation vers la lignée myocytaire : le milieu contient 20 ng/ml de TGFβ1. Après deux semaines de culture, des anticorps monoclonaux spécifiques de la SM-α actine, la SM22-α, la SM-α actinine et la chaîne lourde de SM myosine sont utilisés.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec Frédéric Deschaseaux de l'EFS Centre-Atlantique à Tours, qui a réalisé les différenciations vers les voies adipocytaire et myocytaire.

3) Etude des transcrits : extraction des ARN totaux et RT-PCR

La RT-PCR consiste dans un premier temps en l'extraction des ARN totaux. Elle est réalisée par une méthode utilisant le Trizol® (Invitrogen), à partir de cellules cultivées en plaque 6 puits.

La Reverse Transcription (RT) sert à transcrire l'ARN messager en ADN complémentaire, amplifiable par PCR. Cette rétro-transcription se fait à partir d'une amorce oligo-dT qui s'hybride à la queue poly-adénylée des ARNm.

Dans un tube Eppendorf de 200 µL, le volume correspondant à 5µg d'ARN totaux extraits est ajouté à 1 µL d'amorces aléatoires à 500 µg/mL. Le volume de cette solution est ajusté à 30

μL avec de l'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Cette solution subit une dénaturation à 95°C pendant 5 min suivie d'une hybridation des oligo-dT aux queues polyadénylées à 65°C pendant 10 min. Après cette étape, $20\mu\text{L}$ du mélange réactionnel suivant sont ajoutés : $10\mu\text{L}$ de tampon 5X (Gibco BRL), $5\mu\text{L}$ de dithiothréitol (DTT) 100mM (Proméga), $2,5\mu\text{L}$ de désoxyribonucléotides tri-phosphates (dNTP) 10mM (Proméga), $0,5\mu\text{L}$ de RNasine (Proméga) : inhibiteur de la RNase et $2\mu\text{L}$ de MMLV-RT (Murine Moloney Leukemia Virus-Reverse Transcriptase $200\text{U}/\mu\text{L}$).

La reverse transcriptase agit à 37°C pendant une heure puis les complexes ARNm/ADNc sont dénaturés à 95°C pendant 5 min, cette phase inhibant également la reverse transcriptase. Les produits issus de la reverse transcription peuvent être conservés à -20°C .

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est ensuite utilisée pour réaliser une amplification spécifique d'un fragment d'ADN précis, même si celui-ci est présent en faible quantité dans le mélange initial. Cette technique utilise de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase : pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'un ADN matrice à partir d'un couple d'amorces spécifiques du gène recherché (primers). L'enzyme utilisée est la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante dont la température optimale d'action est de 72°C , mais qui est capable de résister à des passages successifs à 95°C (ce qui rend possible l'automatisation de la réaction). La Taq polymérase permet l'élongation de l'ADN à partir de deux amorces sens et antisens encadrant la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse des brins d'ADN complémentaires est réalisée avec les éléments de base que sont les dNTPs. Une PCR correspond à la succession de plusieurs cycles comportant chacun 3 étapes : la dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95°C , l'hybridation des amorces de 50°C à 65°C (selon les primers utilisés), l'élongation des brins complémentaires à 72°C par la Taq polymérase (Eurobio, France). Au fil des cycles, la quantité d'ADN doubles brins bornés par les amorces augmente de façon exponentielle, en théorie 2^n copies pour n cycles de PCR. La solution utilisée pour la PCR est constituée de $2\mu\text{L}$ de produits de RT obtenus précédemment et de $48\mu\text{L}$ de milieu réactionnel pour PCR qui diffère selon l'enzyme utilisée. Une fois la PCR terminée, les produits qui en sont issus peuvent être conservés à 4°C .

Afin de savoir si la séquence d'intérêt a été amplifiée, une migration sur gel d'agarose à 1% (Agarose Ultra pure TMI invitrogen) est réalisée. Cinq μL de bleu de chargement sont ajoutés à chaque échantillon de PCR, puis ce mélange est déposé dans le gel qui a préalablement été immergé dans du Tris-acétate-EDTA (TAE) 1X dans la cuve à électrophorèse. En référence, des marqueurs de taille (Invitrogen) sont déposés dans un puits

voisin. Après migration pendant 20 minutes à 100V, le gel est déposé dans du gel RED (Interchim) et la bande contenant l'ARNm rétrotranscrit et amplifié est visualisée 15 minutes plus tard grâce au gel RED, agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence visualisable sous Ultra Violet [Bain Gel Red 3X : Na Cl 5M (2mL), Eau (98mL), Gel Red Stock FluoProbes (30 μ L)].

Les séquences de primers suivantes ont été utilisées, à une température d'hybridation de 53°C.

Organisme	Amorce		Séquences	Taille amplicon
Humain	Adipo R1	sens	5'- ATG TCT TCC CAC AAA GGA TCT GTG GTG -3'	407
		anti-sens	5'- GCC AGT TTC TGT ATG AAT GCG GAA GAT -3'	
	Adipo R2	sens	5'- ATG AAC GAG CCA ACA GAA AAC CGA TTG -3'	451
		anti-sens	5'- GTC CAA ATG TTG CCT GTT TCT GTG TGT AT -3'	

4) Etude des protéines : Western Blot

Chaque lignée cellulaire est cultivée dans 4 puits sur des plaques 6 puits. 100 000 cellules sontensemencées dans chaque puits et cultivées dans leur milieu habituel. A environ 75% de confluence, le milieu de culture est ôté et remplacé par un milieu privé de SVF («Starving»). Au bout de 6 heures, le milieu sans SVF est supplémenté soit avec de l'Oncostatine M (OSM) pour obtenir une concentration finale de 100 ng/mL, soit avec une protéine recombinante humaine de la Leptine (rhLeptin) pour obtenir des concentrations finales de 100 et 200 ng/mL. Au bout de 15 minutes, les milieux sont ôtés et les cellules, après différentes conditions de traitement, sont lysées par incubation d'un tampon de lyse 30 min à 4°C.

Les lysats cellulaires sont ensuite collectés en tubes eppendorf puis centrifugés à 12x10³g pendant 10 min à 4°C. Les échantillons obtenus sont ensuite conservés à -20°C.

Le dosage protéique permet de déterminer la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon et est réalisé selon la technique BCA. Pour cela, dans une plaque 96 puits, 10 μ L de lysat cellulaire ou d'une gamme étalon de BSA sont mis en présence de 200 μ L de réactif BCA (sulfate de cuivre dilué au 1/50ème dans une solution d'acide bicinchoninique, Sigma). Après 30 min d'incubation, les densités optiques sont lues à 570 nm.

La technique de Western Blot permet de détecter la présence d'une protéine et d'évaluer son niveau d'expression. La migration électrophorétique s'effectue dans un gel composé de deux parties : le gel de séparation surmonté du gel de concentration. Les lysats cellulaires, dilués au demi dans le bleu de chargement et portés à ébullition pendant 5 min,

sont chargés dans les puits du gel dénaturant à 10% d'acrylamide ainsi que 5 μ L de marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant avec une intensité de 10 mA par gel pour le gel de concentration puis de 20 mA par gel pour le gel de séparation.

Les protéines, qui ont préalablement été séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire, sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyfluorure de Vinyldène). Pour cela, les gels d'électrophorèse au contact des membranes de PVDF sont placés dans une cuve de transfert contenant du tampon de transfert.

Le transfert se fait sur une période de 16 heures avec un courant de 40 mA. Une coloration au Rouge Ponceau est réalisée afin de vérifier si le transfert s'est réalisé correctement. La membrane est ensuite rincée sous agitation rapide dans le tampon de lavage. Puis, suite à une étape de saturation dans la solution de saturation 1, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine à mettre en évidence durant une nuit à 4°C. Après lavages, la membrane est soumise à une deuxième étape de saturation dans la solution de saturation 2 puis à l'incubation de 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

La révélation se fait en incubant la membrane 5 min dans une solution ECL (BM chemiluminescence blotting substrate, Roche) contenant le substrat de l'enzyme peroxydase, le luminol. Le résultat du blot est visualisé par autoradiographie. Pour chaque protéine, une exposition de quelques secondes à une heure est choisie de façon à obtenir un signal visible mais non saturé.

E. Étude *in vivo* des interactions entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes

Toutes les manipulations ont été effectuées sur des souris, au sein de l'unité de thérapeutique expérimentale (Plateau technique de l'IFR26, Université de médecine de Nantes) en accord avec les autorités compétentes et sous la direction de personnel agréé.

Nous avons utilisé la loge musculaire antéro-externe de jambe, espace dans lequel le volume tumoral tridimensionnel est mesurable.

Deux types d'expériences ont été réalisés *in vivo* chez des souris nudes femelles, chacune avec plusieurs groupes comparables entre eux.

1) Modèles d'ostéosarcomes humains SaOS2 et HOS chez des souris immunodéficientes

****INJECTION DE GRAISSE DANS UN MODELE D'OSTEOSARCOME TRANSPLANTE***

Le premier type d'expérimentation consiste en une injection de tissu graisseux humain sur un modèle de tumeur d'ostéosarcome transplantée.

A partir d'une tumeur, résultant d'une injection de cellules ostéosarcomateuses dans du PBS au niveau d'une loge musculaire de la patte, des petits fragments de tailles identiques sont prélevés et implantés chez les différentes souris du groupe 1 à J0. Une petite loge entre la face externe du tibia et la loge musculaire adjacente est préparée pour accueillir le fragment transplanté.

Dans le deuxième groupe (groupe 2), le modèle tumoral est induit de la même façon, par transplantation de la même tumeur initiale induite par injection de cellules ostéosarcomateuses. A J8, 100 µl de graisse humaine sont injectés dans la tumeur naissante à l'aide d'une aiguille de 18G. L'injection est précédée de plusieurs mouvements d'aller-retour avec l'aiguille afin de créer des tunnels pour implanter précisément le tissu adipeux. Le tissu graisseux injecté est préparé comme suit : un prélèvement de graisse est réalisé chez un patient au cours d'une intervention chirurgicale de lipoaspiration, selon la technique de Coleman ; au laboratoire, le tissu adipeux lipoaspiré est centrifugé à 3 000 tours pendant 3 minutes ; la couche adipeuse intermédiaire est ensuite séparée de la couche huileuse sus-jacente et des éléments sanguins et débris cellulaires situés dans la couche inférieure ; l'échantillon est alors prêt à être injecté.

Dans un troisième groupe (groupe 3), le modèle tumoral est induit de la même façon. Afin de simuler le geste chirurgical de l'injection de graisse, une injection de 100 µl de PBS est effectuée à J8 avec une aiguille identique après la réalisation de tunnels d'injection. Nous l'appelons groupe "canule".

Un dernier groupe (groupe 4) est utilisé comme contrôle négatif et reçoit juste l'injection de 100 µl de graisse à J8, sans transplantation tumorale.

Chaque groupe est constitué de 7 souris pour les modèles avec transplantation tumorale et de 3 souris pour le groupe contrôle négatif avec l'injection de graisse seule. Les deux lignées cellulaires d'ostéosarcomes utilisées pour cette expérimentation sont SaOS2 et HOS.

****MODELE DE CO-INJECTION DE CELLULES OSTEOSARCOMATEUSES ET AD-CSM***

La seconde expérimentation consiste en un modèle de co-injection de cellules ostéosarcomateuses et d'Ad-CSM sur des souris endormies par isoflurane et se déroule de la façon suivante.

Nous réalisons tout d'abord un modèle d'ostéosarcome dans la loge intra-musculaire antéro-externe de jambe chez la souris. Nous injectons un nombre déterminé de cellules ostéosarcomateuses en fonction de la lignée cellulaire dans 20 μL de PBS au niveau de la jambe gauche.

Ensuite, dans 2 autres groupes d'animaux, nous réalisons le même type d'injection avec 20 μL de PBS contenant le même nombre de cellules ostéosarcomateuses selon la lignée, associées à des Ad-CSM en proportion de 2 cellules ostéosarcomateuses pour une Ad-CSM et de 10 cellules ostéosarcomateuses pour une Ad-CSM.

Enfin, nous effectuons sur un groupe d'animaux plus restreint une injection de 20 μL de PBS avec uniquement des Ad-CSM, à la concentration maximale utilisée précédemment.

Chaque groupe est constitué de 8 souris pour les modèles avec injection de cellules ostéosarcomateuses et de 3 souris pour le groupe contrôle négatif avec l'injection seule de Ad-CSM. Les deux lignées cellulaires d'ostéosarcomes utilisées pour cette expérimentation sont SaOS2 et HOS.

2) Suivi expérimental

****VOLUME TUMORAL***

L'évolution du volume tumoral et du poids des souris est surveillée deux fois par semaine. Le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse, selon deux axes perpendiculaires, permettant d'obtenir le volume tumoral en cm^2 .

Après l'euthanasie (**décidée lorsque le volume tumoral dépasse 2 500 mm³ ou lorsque la nécrose tumorale entraîne des ulcérations cutanées**), les souris sont autopsiées. La présence de métastases pulmonaires macroscopiques est alors recherchée.

Les pattes avec les tumeurs entières sont aussi prélevées pour réaliser des examens radiologiques (radiographies et micro-scanner). Ces examens permettent de caractériser l'influence du développement tumoral des différents modèles d'ostéosarcome sur les os de la jambe (ostéolyse, ostéoformation aberrante...). Des examens histologiques sont aussi réalisés pour caractériser microscopiquement ces tumeurs, observer le devenir de la graisse et des Ad-CSM *in vivo* et voir leur influence sur l'angiogenèse tumorale.

3) *Analyses statistiques*

La comparaison de la prolifération *in vitro*, à partir de test XTT des cellules ostéosarcomateuses est faite par analyse de la variance (test non paramétrique de Kruskal-Wallis, avec un post test de Dunn). La comparaison de la prolifération *in vitro*, à partir des comptages au bleu trypan des cellules ostéosarcomateuses est faite par analyse des moyennes en réalisant des tests de Student. Les volumes moyens tumoraux ont été comparés par analyse de la variance (test paramétrique ANOVA, avec post test de Bonferonni). La significativité a été retenue pour un $p < 0,05$.

F. Étude *in vitro* des interactions entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes

1) *Co-culture indirecte avec graisse ou Ad-CSM*

Les co-cultures indirectes mettent en présence la graisse ou les Ad-CSM avec les différentes lignées cellulaires ostéosarcomateuses sans contact direct entre ces cellules. La réalisation des co-cultures fait appel à des chambres de co-cultures avec des pores de 3 µm. Ces chambres sont ensuite positionnées dans des puits de culture dans des plaques 24 puits.

Dans des plaques 24 puits à J0, 15 000 cellules ostéosarcomateuses sont disposées par puits dans leur milieu de culture avec 5 % de SVF. Dans des chambres de co-culture adaptées avec des pores de 3 μm , les Ad-CSM sont déposées et cultivées dans leur milieu de culture αMEM supplémenté avec 10 % de SVF et 1 ng/mL de $\beta\text{-FGF}$ à des concentrations de 15 000 et 1 500 cellules par chambre. Ces tests sont réalisés en triplicate.

À J1, les chambres de co-culture contenant les Ad-CSM sont assemblées aux plaques où sont ensemencées les cellules ostéosarcomateuses.

Entre J2 et J3, selon la confluence cellulaire, un comptage au bleu trypan et un dosage XTT sont réalisés. Le comptage au bleu trypan permet de déterminer le nombre de cellules vivantes et le nombre de cellules mortes. Les résultats des tests XTT sont exprimés en pourcentage d'activité métabolique par rapport au groupe contrôle (les cellules ostéosarcomateuses cultivées seules correspondent au groupe témoin).

La même expérience est réalisée en remplaçant les Ad-CSM par 100 μL de tissu adipeux dans les chambres de co-cultures.

2) Culture avec milieux conditionnés (MC) par des Ad-CSM

Les Ad-CSM sont cultivées dans des flasques de 75 cm^2 jusqu'à 80-90 % de confluence. Le milieu de culture ôté, les cellules sont rincées au PBS, puis entretenues dans du milieu αMEM sans SVF. Au bout de 24 heures, le milieu est récupéré et correspond au milieu conditionné (MC). Deux mille cellules ostéosarcomateuses par puits sont placées dans des plaques 96 puits, dans 20 μL de milieu αMEM sans SVF, avec 25, 50 ou 75 μL de MC, et complété avec du milieu de culture sans SVF pour obtenir 95 μL dans chaque puit. 5 μL ou 2,5 μL de SVF sont ajoutés pour obtenir des concentrations constantes à 5 % ou 2,5 % de SVF. Ces tests sont réalisés en triplicate. Les cellules ostéosarcomateuses dans du milieu αMEM avec 5 % ou 2,5 % de SVF sans MC constituent le groupe témoin. À 24 heures et 48 heures de culture, un test d'activité mitochondriale (test XTT) est réalisé en ajoutant 50 μL de mélange XTT (Roche) à chaque puits. Cette manipulation est effectuée dans des conditions de faible luminosité. Après 4 heures, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 490 nm au lecteur de plaque VICTOR (Perkin Elmer). Les données sont ensuite traitées au moyen du logiciel Microsoft Excel. Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération par rapport au contrôle.

3) Culture en milieux supplémentés en adipocytokines

La supplémentation des milieux de culture des lignées ostéosarcomateuses avec de la Leptine ou de l'Adiponectine permet de tester l'influence directe de ces adipokines sur la prolifération cellulaire ostéosarcomateuse.

Pour tester l'influence de la Leptine sur la prolifération cellulaire par comptage sur plaque de Malassez, nous ensemençons 50 000 cellules de chaque lignée dans des puits de 35 mm de diamètre. Après 48 heures de culture dans le milieu habituel complet, nous remplaçons ce milieu par du milieu sans SVF, supplémenté avec 100 ou 200 ng/mL de rhLeptin. Au bout de 48 heures, nous décollons ces cellules et les comptons.

Nous commençons à tester l'influence de la Leptine et de l'Adiponectine sur l'activité cellulaire ostéosarcomateuse par un test XTT sur des plaques 96 puits, en ensemençant dans chaque puits 2 000 cellules de chaque lignée dans 100 μ L du milieu complet propre à chaque lignée. Au bout de 24 heures, le milieu complet est remplacé par 100 μ L de milieu sans SVF que nous supplétons 12 heures plus tard avec une solution contenant de la rhLeptin (recombinant human Leptin) à la concentration de 10 μ g/mL ou une solution contenant de la rhAdiponectin (recombinant human Adiponectin), préparée à la concentration de 0,660 mg/mL. Nous ajoutons 1 et 2 μ L de la préparation de rhLeptin dans chaque puits pour obtenir des concentrations finales de 100 et 200 ng/mL ou 0,15 et 0,45 μ L de la préparation de rhAdiponectin pour obtenir des concentrations finales de 1 et 3 μ g/mL. Les modifications de l'activité métabolique sont observées 48 heures plus tard à l'aide d'un test XTT.

Nous testons ensuite l'influence de la Leptine sur des plaques 24 puits à des concentrations plus élevées. Quinze mille cellules provenant des différentes lignées ostéosarcomateuses sont ensemencées dans des plaques 24 puits avec 500 μ L de α MEM supplémenté avec 5 % de SVF et 0,5 % d'ATB. Au bout de 24 heures, le milieu complet est remplacé par du milieu sans SVF supplémenté pour chaque lignée cellulaire avec de la rhLeptin ou de la rhAdiponectin. Nous ajoutons 8 μ L ou 80 μ L de la préparation de rhLeptin pour obtenir des concentrations finales à 160 ng/mL (=10 nM) ou 1,6 μ g/mL (=100 nM). Nous ajoutons 0,75 μ L ou 7,5 μ L de la préparation de rhAdiponectin pour obtenir des concentrations finales à 1 μ g/mL et 10 μ g/mL. Nous gardons des puits non supplémentés comme contrôle. Au bout de 48 heures, un test d'activité mitochondriale (test XTT) est réalisé en ajoutant 250 μ L de mélange XTT (Roche) dans chaque puits.

Ces tests sont réalisés en triplicate.

III. Résultats

A. Caractérisation des Ad-CSM et des cellules d'ostéosarcomes

1) Ad-CSM humaines issues de la graisse (Ad-CSM)

*COMBINATOIRE D'EXPRESSION DE MARQUEURS CELLULAIRES

L'analyse par cytométrie des cellules isolées à partir de la graisse sont positives pour les marqueurs spécifiques de l'immaturation cellulaire retrouvés sur les CSM (CD90 et CD105). Elles sont par contre négatives pour les marqueurs spécifiques des CSH (CD34 et CD45) (Figure 48). Cette caractérisation phénotypique montre que nos cellules issues de la graisse Ad-CSM sont potentiellement des CSM. Ce phénotype, observé dès le deuxième repiquage, se maintient au cours des repiquages (phénotype identique au 17ème passage).

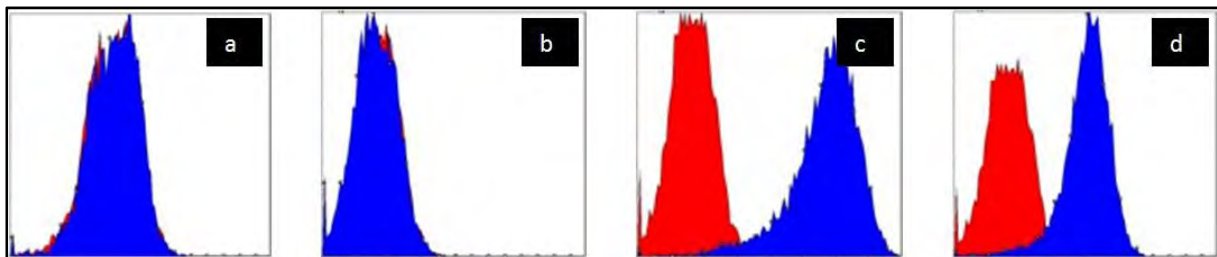


Figure 48 : Caractérisation des cellules adhérentes humaines issues de la graisse : analyse par cytométrie en flux en simple marquage au 3^{ème} repiquage.

L'intensité de marquage des cellules est indiquée sur l'axe des abscisses.

Le nombre de cellules est indiqué sur l'axe des ordonnées.

Courbe rouge : contrôle isotypique. Courbe bleue : fluorescence liée à la fixation des anticorps

a. anti-CD34 couplé au FITC (FL1)

b. anti-CD45 couplé au PE (FL2)

c. anti-CD90 couplé au PE (FL2)

d. anti-CD105 couplé au PE (FL2)

*CAPACITE DE DIFFERENCIATION VERS LE LIGNAGE OSTEOBLASTIQUE, ADIPOCYTAIRE ET MYOCYTAIRE

Le caractère multipotent de ces CSM potentielles (cellules adhérentes CD90+, CD105+, CD34- et CD45-) au 3ème passage a été testé en induisant leur différenciation :

- vers le lignage ostéoblastique : la formation de nodules de minéralisation a été confirmée par la présence de points noirs après coloration de von Kossa et de points rouges après coloration au rouge alizarine, après induction de la différenciation ostéoblastique (Figure 49a et b)

- vers le lignage adipocytaire : la présence d'adipocytes contenant des gouttelettes lipidiques positives à la coloration de Nil-Red a été observée après induction de la différenciation adipocytaire (Figure 49c et d)

- vers le lignage myocytaire : la culture sous induction de la différenciation myocytaire a généré des cellules allongées positives pour différents marqueurs des cellules musculaires lisses, comme SM- α actine, SM22- α , SM- α actinine et la chaîne lourde de SM myosine (Figure 49e et f).

Ce résultat permet d'affirmer que ces cellules au 3^{ème} repiquage étaient toujours capables de se différencier en ostéoblastes (Figure 49a et b), en adipocytes (Figure 49c et d) et en cellules musculaires lisses (Figure 49e et f) : elles constituent donc de véritables CSM.

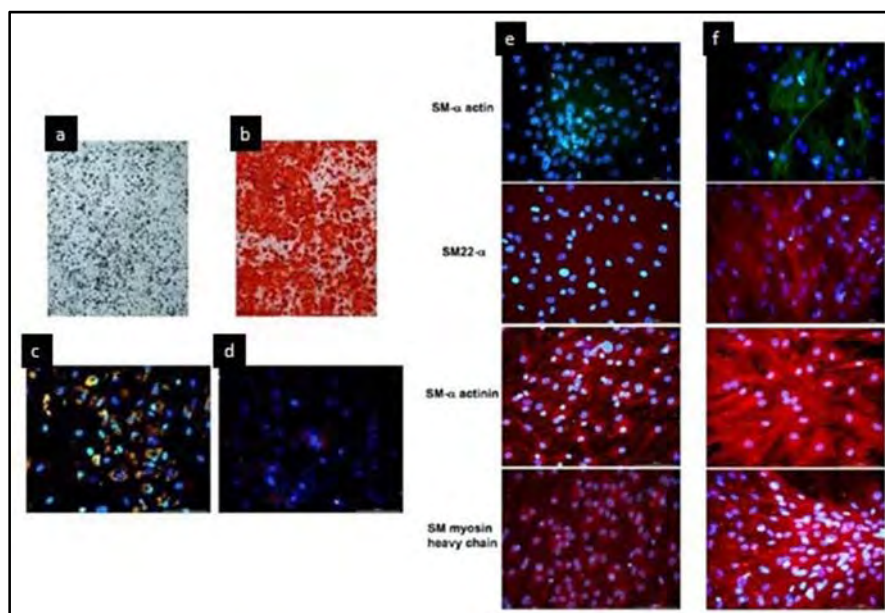


Figure 49 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines issues de la graisse (Ad-CSM) : analyse de leur capacité de différenciation au 3^{ème} repiquage.

**Vers la lignée ostéoblastique : présence de nodules de minéralisation après culture sous induction de la différenciation ostéoblastique, noirs au von Kossa (a) et rouges au rouge alizarine (b)*

**Vers la lignée adipocytaire : gouttelettes lipidiques positives à la coloration de Nil-Red présentes après induction adipocytaire (c) et absentes sans induction adipocytaire (d)*

**Vers la lignée myocytaire : au contraire de la culture sans induction myocytaire (e), la culture sous induction de la différenciation myocytaire (f) a généré des cellules allongées positives pour différents marqueurs des cellules musculaires lisses, comme SM- α actine, SM22- α , SM- α actinine et la chaîne lourde de SM myosine.*

2) Cellules ostéosarcomateuses humaines SaOS2, HOS, U2OS

*CARACTERISATION PHENOTYPIQUE

Parmi les divers antigènes membranaires, nous nous sommes intéressés aux antigènes CD44, CD51-61 et CD105.

L'antigène CD44 est une glycoprotéine membranaire impliquée dans les interactions entre les cellules et la migration cellulaire. Il est un récepteur pour l'acide hyaluronique. Il est aussi un marqueur de tumorigénicité. L'antigène CD51-61 (Intégrine $\alpha\beta 3$) est une intégrine qui facilite l'adhésion cellulaire. L'antigène CD105 (SH2, Endogline) est un marqueur membranaire d'immaturité cellulaire.

L'analyse par cytométrie en flux a montré que nos 3 lignées cellulaires étaient positives pour les marqueurs de tumorigénicité (CD44) et d'immaturité cellulaire (caractère indifférencié des cellules ostéosarcomateuses : CD105). Aucune population n'a été marquée positivement par l'anticorps dirigé contre l'antigène CD51-61. En l'absence de contrôle positif, nous n'avons pas pu exclure un problème de dégradation de l'anticorps. Nous ne pouvons donc pas affirmer que ces cellules étaient négatives pour le CD51-61 (Figure 50).

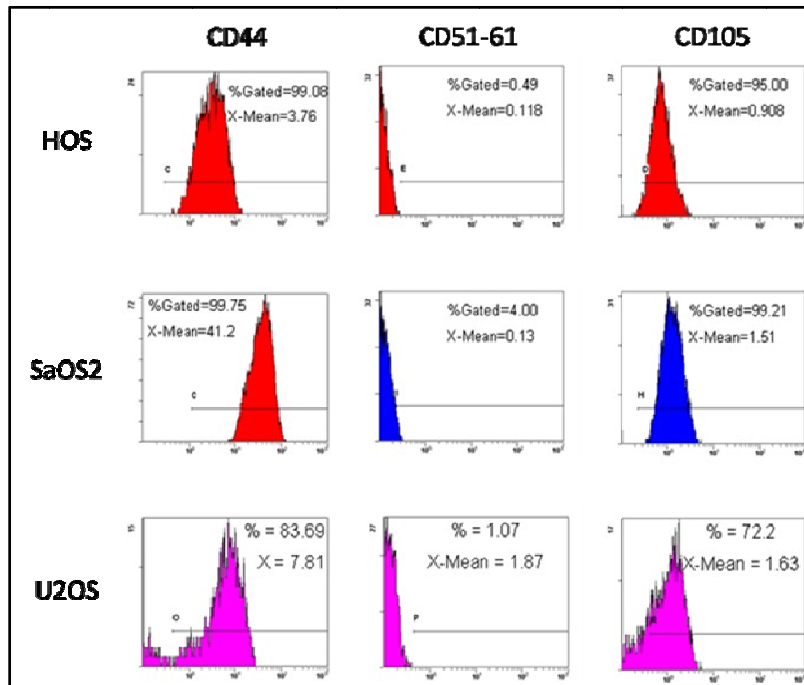


Figure 50 : Caractérisation des cellules d'ostéosarcomes humains SaOS2, HOS, U2OS : analyse par cytométrie en flux en simple marquage au 4^{ème} repiquage.

L'intensité de marquage des cellules est indiquée sur l'axe des abscisses.

Le nombre de cellules est indiqué sur l'axe des ordonnées.

Les courbes pleines colorées correspondent à la fluorescence liée à la fixation des anticorps anti-CD44 ou anti-CD51-61 ou anti-CD105, couplé au PE (FL2).

***PRESENCE DE RECEPTEURS AUX ADIPOCYTOKINES**

→ Leptine

La possible influence de la Leptine sur la prolifération cellulaire nécessite la présence des récepteurs membranaires pour cette adipokine sur les cellules ostéosarcomateuses.

Les récepteurs à la Leptine ont été mis en évidence par technique de cytométrie en flux, à l'aide d'un anticorps spécifique anti-human Leptin-R couplé PE (Figure 51).

Les Ad-CSM ont servi de contrôle positif, car la présence des récepteurs à la Leptine sur leur membrane y est connue. La cytométrie en flux a permis de mettre en évidence la présence de ces mêmes récepteurs à la surface des différentes lignées cellulaires ostéosarcomateuses humaines utilisées dans cette étude.

Le récepteur membranaire à la Leptine est présent à la surface des lignées cellulaires ostéosarcomateuses HOS, SaOS2 et U2OS.

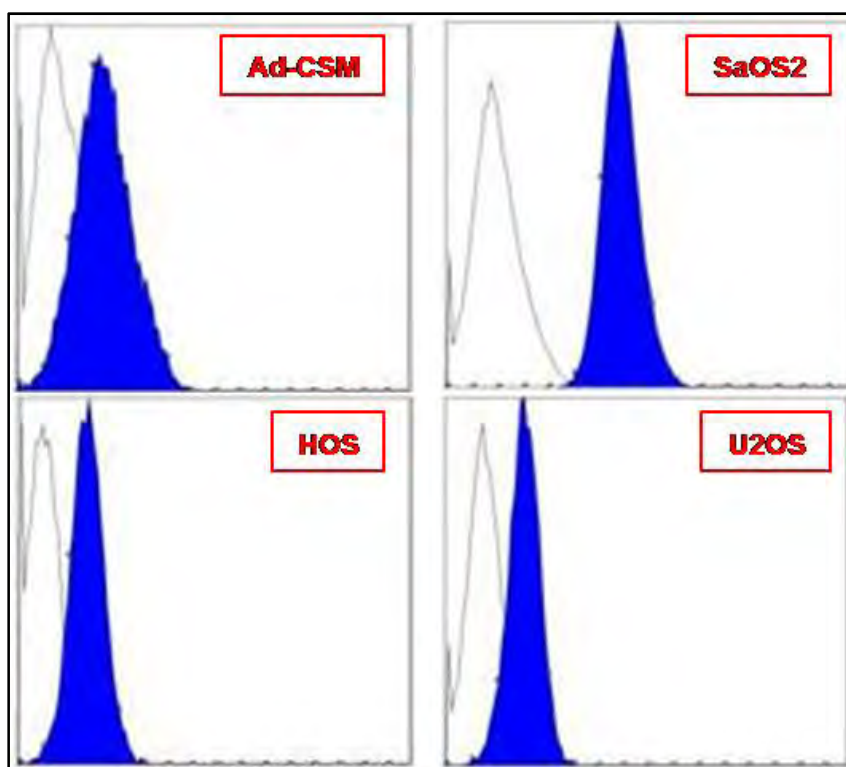


Figure 51 : Mise en évidence du récepteur membranaire à la leptine par cytométrie en flux en simple marquage au 4^{ème} repiquage des cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux humains (Ad-CSM) et des cellules d'ostéosarcomes humains SaOS2, HOS, U2OS.

L'intensité de marquage des cellules est indiquée sur l'axe des abscisses.

Le nombre de cellules est indiqué sur l'axe des ordonnées.

Les courbes pleines colorées correspondent à la fluorescence liée à la fixation des anticorps anti-récepteur à la leptine, couplé au PE (FL2).

→ Adiponectine

Il existe deux types de récepteurs membranaires à l'adiponectine : AdipoR1 et AdipoR2.

Nous avons dans un premier temps essayé de mettre en évidence les récepteurs membranaires à l'Adiponectine par Western Blot. Après plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à révéler la présence des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sur notre membrane de révélation de Western Blot (Figure 52a). La lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7 est utilisée ici en contrôle positif, car la présence des récepteurs à l'Adiponectine sur cette lignée a déjà été décrite dans la littérature (Dieudonne, 2006). L'échec répété de la mise en évidence des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 à la surface des cellules ostéosarcomateuses par Western Blot nous a fait remettre en question la validité des anticorps primaires utilisés.

Dans un second temps, nous avons recherché l'expression des récepteurs à l'Adiponectine AdipoR1 et AdipoR2 au niveau transcriptionnel dans les différentes lignées cellulaires étudiées par Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) et comparée au gène de référence 18S. Les résultats révèlent l'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 au niveau transcriptionnel sur ces différentes lignées (Figure 52b).

Les transcrits codant pour les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés par les lignées cellulaires ostéosarcomateuses SaOS2, HOS et U2OS.

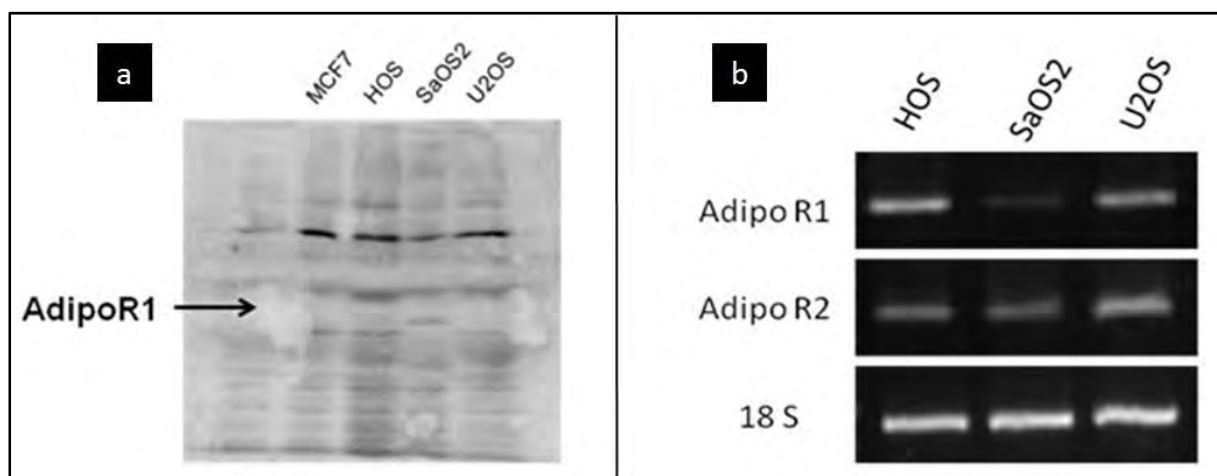


Figure 52 : Mise en évidence du récepteur membranaire à l'adiponectine (AdipoR1 et R2)

- a. en Western Blot : pas de révélation du récepteur AdipoR1 sur la membrane de Blot
 b. en RT-PCR : présence de l'expression des transcrits codant pour les récepteurs AdipoR1 et R2 dans les lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains SaOS2, HOS, U2OS

→ Activation de voies de signalisation intra-cellulaires par la Leptine

Les voies de signalisation intra-cellulaires activées par l'Adiponectine sont encore mal connues et n'ont donc pas fait l'objet d'expérimentations dans notre étude.

La Leptine induit une activation intra-cellulaire via son récepteur membranaire. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs dont les ligands sont des cytokines, principalement des interleukines de la famille de l'IL6.

La fixation d'une cytokine sur son récepteur va induire la phosphorylation rapide et transitoire de résidus tyrosine conservés dans le domaine intracellulaire à l'extrémité C-terminale des chaînes réceptrices. Pour initier leur signalisation, ces cytokines utilisent des tyrosine kinases constitutivement associées à leur récepteur : les JAKs. Ces kinases sont associées à la partie cytoplasmique des récepteurs. La liaison des cytokines à leur récepteur entraîne le rapprochement des sous-unités le constituant et donc des JAKs associées. Elles sont alors activées par phosphorylation, puis vont à leur tour phosphoryler d'autres résidus tyrosine.

La leptine induit préférentiellement l'activation de la kinase JAK2 (Figure 53).

L'activation intra-cellulaire de la leptine passe par les voies de signalisation JAK-STAT et ERK et entraîne la phosphorylation de STAT3, STAT5 et ERK (Figure 53) (Villanueva, 2008).

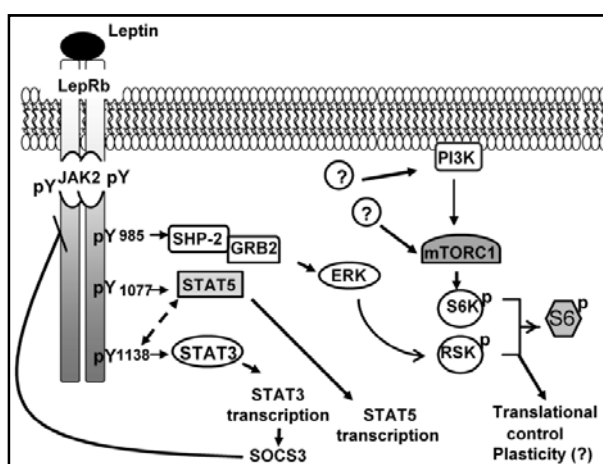


Figure 53 : Activation intra-cellulaire induite par l'activation du récepteur à la Leptine (Voies de signalisation intra-cellulaires JAK-STAT et MAPK). (Villanueva, 2008)

Après avoir mis en évidence la présence des récepteurs membranaires à la Leptine sur les cellules d'ostéosarcome, nous avons recherché l'activation des voies de signalisation JAK-STAT et ERK par technique de Western Blot. La protéine recombinante humaine (rhLeptin) ou l'Oncostatine M (OSM : cytokine de la famille de l'IL6) (Brounais, 2008b) ont été ajoutées au milieu de culture des cellules ostéosarcomateuses et des Ad-CSM. L'OSM activant les mêmes voies de signalisation intra-cellulaires que la Leptine via son récepteur transmembranaires (Glycoprotéine130), elle a servi de contrôle positif (Heinrich, 2003).

Pour les 4 lignées, une activation de la phosphorylation de STAT3 et ERK par l'OSM était clairement observable. Nous avons observé une activation de STAT5 par l'OSM sur les lignées Ad-CSM et HOS mais pas sur les lignées SaOS2 et U2OS. L'activation des voies de signalisation JAK/STAT et ERK par l'OSM permet de valider les conditions expérimentales de détection (transfert protéique, qualité des anticorps...).

Seule la lignée U2OS montrait une légère augmentation du signal de détection de la forme phosphorylée de STAT3 en présence de 100 ng/mL de Leptine, ainsi qu'une augmentation du signal de la forme phosphorylée de ERK. Cependant, ces signaux n'étaient pas retrouvés à une concentration de Leptine de 200 ng/mL.

Sur les lignées Ad-CSM et HOS, nous avons également observé une activation de STAT5 par l'OSM, mais pas par la Leptine à des concentrations similaires. De façon générale, il n'existait pas de différence entre les révélations obtenues sur le contrôle des cellules non mises en contact avec les cytokines OSM et Leptine, et celles obtenues à partir des cellules activées avec de la rhLeptin (100 et 200 ng/mL) (Figure 54).

La présence de récepteurs à la Leptine et la capacité d'activation des voies de signalisation par l'OSM nous a amené à mettre en doute l'intégrité de notre protéine recombinante rhLeptin et donc sa capacité à induire un signal intra-cellulaire.

Ce résultat négatif ne nous a pas permis de conclure sur la capacité de la rhLeptin à activer les voies JAK/STAT et ERK des cellules ostéosarcomateuses humaines.

La protéine recombinante rhLeptin utilisée n'a pas activé les voies de signalisation intra-cellulaires JAK-STAT et ERK, contrairement à l'OSM.

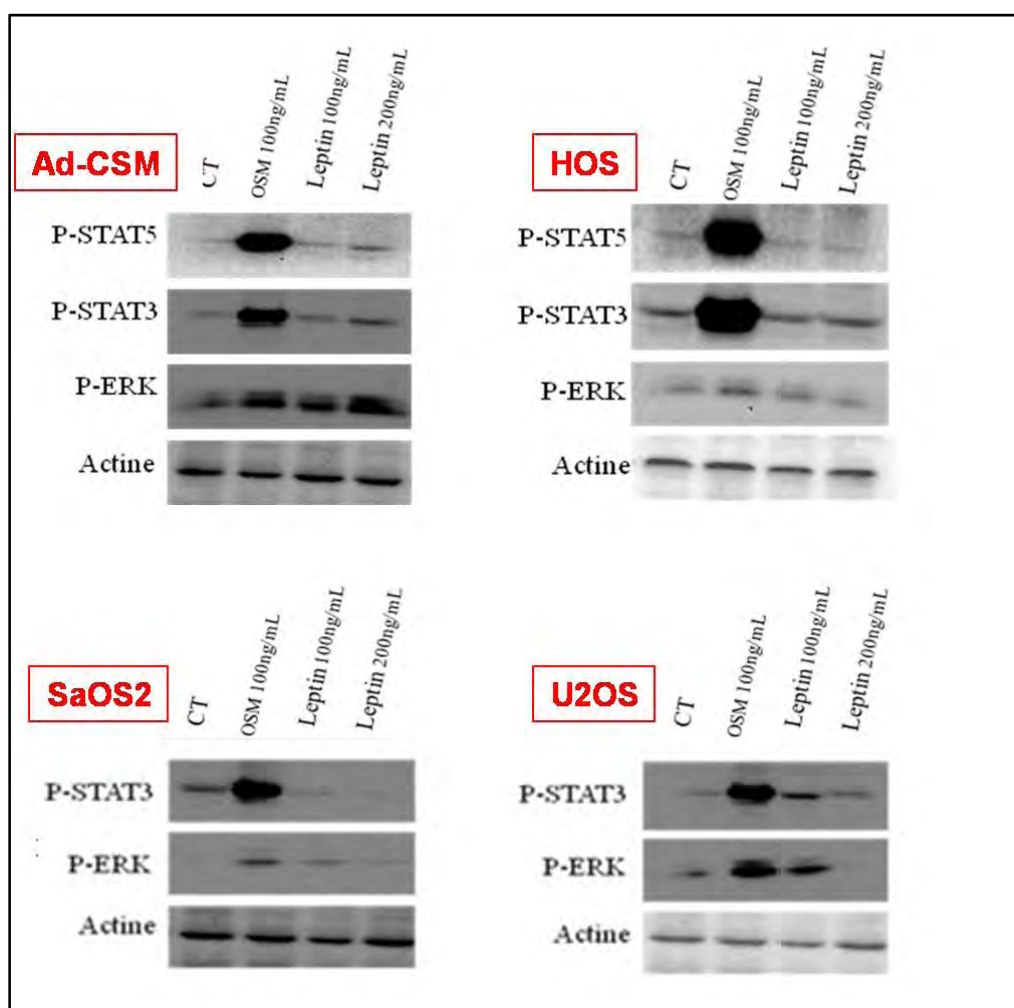


Figure 54 : Activation des voies de signalisation JAK-STAT et ERK. Identification de la phosphorylation de ERK, STAT3 et STAT5 par Western Blot sur les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux humains (Ad-CSM) et les cellules d'ostéosarcomes humains HOS, SaOS2 et U2OS, mises en contact pendant 15 min avec de l'OSM à une concentration de 100 ng/mL ou avec de la rhLeptin à une concentration de 100 ng/L ou 200 ng/mL. CT : extrait protéique des cellules non mises en contact avec une des 2 cytokines testées (OSM et Leptine).

B. La graisse et les Ad-CSM favoriseraient la croissance tumorale *in vivo*

1) *Progression tumorale en présence de graisse*

À la suite de ce cas clinique inattendu, nous nous sommes demandé si les injections de tissu adipeux selon la technique de Coleman pouvaient être la cause de la récurrence locale tardive de cet ostéosarcome. Pour tester cette hypothèse, deux modèles murins d'ostéosarcome humain ont été établis chez des souris immunodéficientes et une injection de graisse humaine selon la technique de Coleman a été réalisée lorsque les tumeurs devenaient détectables.

***MODELE SAOS2**

Tout d'abord, chez la souris nude, des cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 ont été injectées en intra-musculaire, ce qui conduit au développement d'une tumeur dans seulement 50 % des cas. Pour obtenir une plus grande incidence des développements tumoraux, des fragments de la tumeur primaire induite par injection ont été transplantés en para-tibial chez la souris nude.

Dans le groupe contrôle SaOS2, on observe un développement rapide de la tumeur pour atteindre un volume moyen de 1 393 mm³, à J23 après implantation tumorale (Figure 55a). La croissance tumorale a considérablement augmenté à J21 après l'induction des tumeurs chez le groupe SaOS2 + graisse (Figure 55b). Dans le groupe SaOS2 + canule (nous appelons groupe "canule" le fait de simuler le geste chirurgical de l'injection de graisse, en infiltrant 100 µl de PBS avec une aiguille après la réalisation de tunnels d'injection), aucune différence n'est mise en évidence par rapport au groupe SaOS2 seules (Figure 55c). Le groupe témoin graisse seule a permis de vérifier que l'augmentation de la taille tumorale observée dans le groupe SaOS2 + graisse n'était pas uniquement due au volume ajouté par l'injection de graisse (moins de 200 mm³) et que celle-ci n'avait pas de capacité proliférative propre *in vivo* (Figure 55d). En outre, nous avons pu observer que les animaux qui ont reçu une injection de graisse dans les tumeurs (SaOS2 + graisse) avaient une courbe de progression tumorale plus homogène, c'est-à-dire moins de variabilité inter-individus, par rapport aux groupes témoins (SaOS2 et SaOS2 + canule).

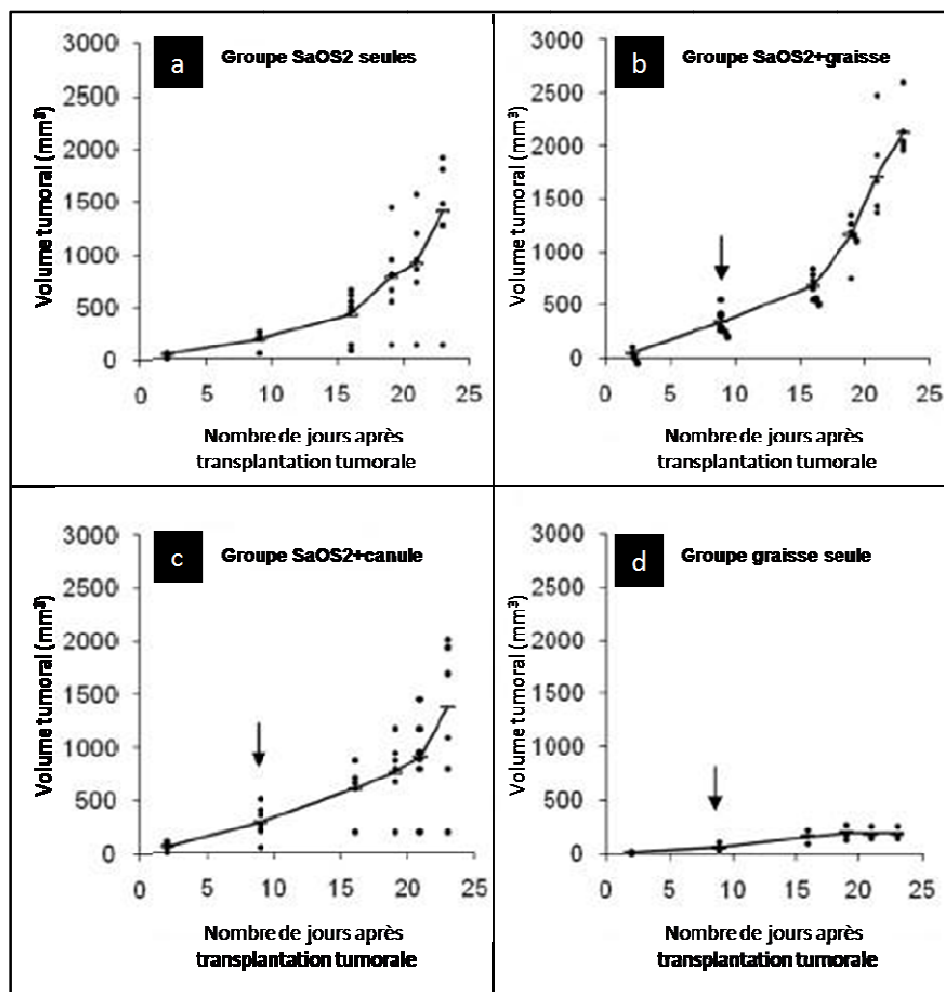


Figure 55 : Progression tumorale de l'ostéosarcome SaOS2 en transplantation chez la souris nude.

- a. groupe de souris ayant reçues des cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 seules*
- b. groupe de souris ayant reçues des cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 + injection de graisse humaine*
- c. groupe de souris ayant reçues des cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 + canule vide*
- d. groupe de souris ayant reçues des injection de graisse humaine seule*

Les flèches indiquent le moment de l'injection de la graisse ou de l'utilisation de la canule vide à J8 après la transplantation tumorale.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique ANOVA) à l'aide du logiciel GraphPad InStat v3.02. La valeur p est inférieure à 0,05 pour le groupe SaOS2 + graisse par rapport au groupe SaOS2 seules ou SaOS2 + canule à J21, mais n'est pas significative pour le groupe SaOS2 + canule par rapport au groupe SaOS2 seules.

L'analyse macroscopique du processus tumoral révélait dans les trois groupes une tumeur volumineuse, ferme, plurilobée, partiellement nécrotique, peu vascularisée et non hémorragique (Figure 56a). Au moment de l'euthanasie, la graisse humaine était encore visible au niveau du site d'injection (Figure 56b). Il n'était pas retrouvé de métastases pulmonaires.

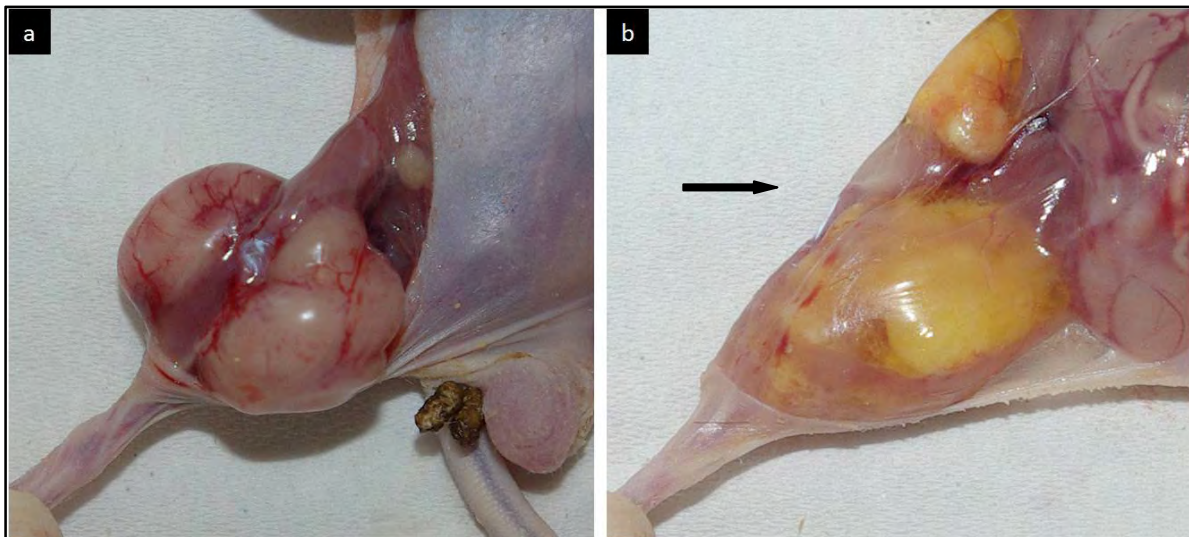


Figure 56 : Aspects macroscopiques du modèle d'ostéosarcome humain SaOS2 induit par transplantation

- a. Photographies au moment de l'euthanasie de la tumeur SaOS2 sans injection de graisse*
b. Photographies au moment de l'euthanasie de la tumeur SaOS2 avec injection de graisse
Flèches noires : graisse humaine injectée encore visible au moment de l'euthanasie

L'analyse histologique a révélé la présence de volumineux adipocytes localisés entre les cellules néoplasiques des échantillons de tumeur du groupe SaOS2 + graisse (Figure 57a), alors que seules des cellules avec des microgouttelettes lipidiques ont été identifiées dans les zones de fibrose et non pas entre les cellules néoplasiques dans les échantillons de tumeur du groupe SAOS2 + canule (Figure 57b) ou du groupe contrôle SaOS2 (données non présentées). La présence de ces adipocytes de grande taille témoigne sans doute de l'implantation des adipocytes humains, mais leur proportion semble trop faible pour expliquer l'augmentation de taille de la tumeur qui a été observée dans le groupe SAOS2 + graisse. Ainsi on peut émettre l'hypothèse que les injections de graisse ont stimulé la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

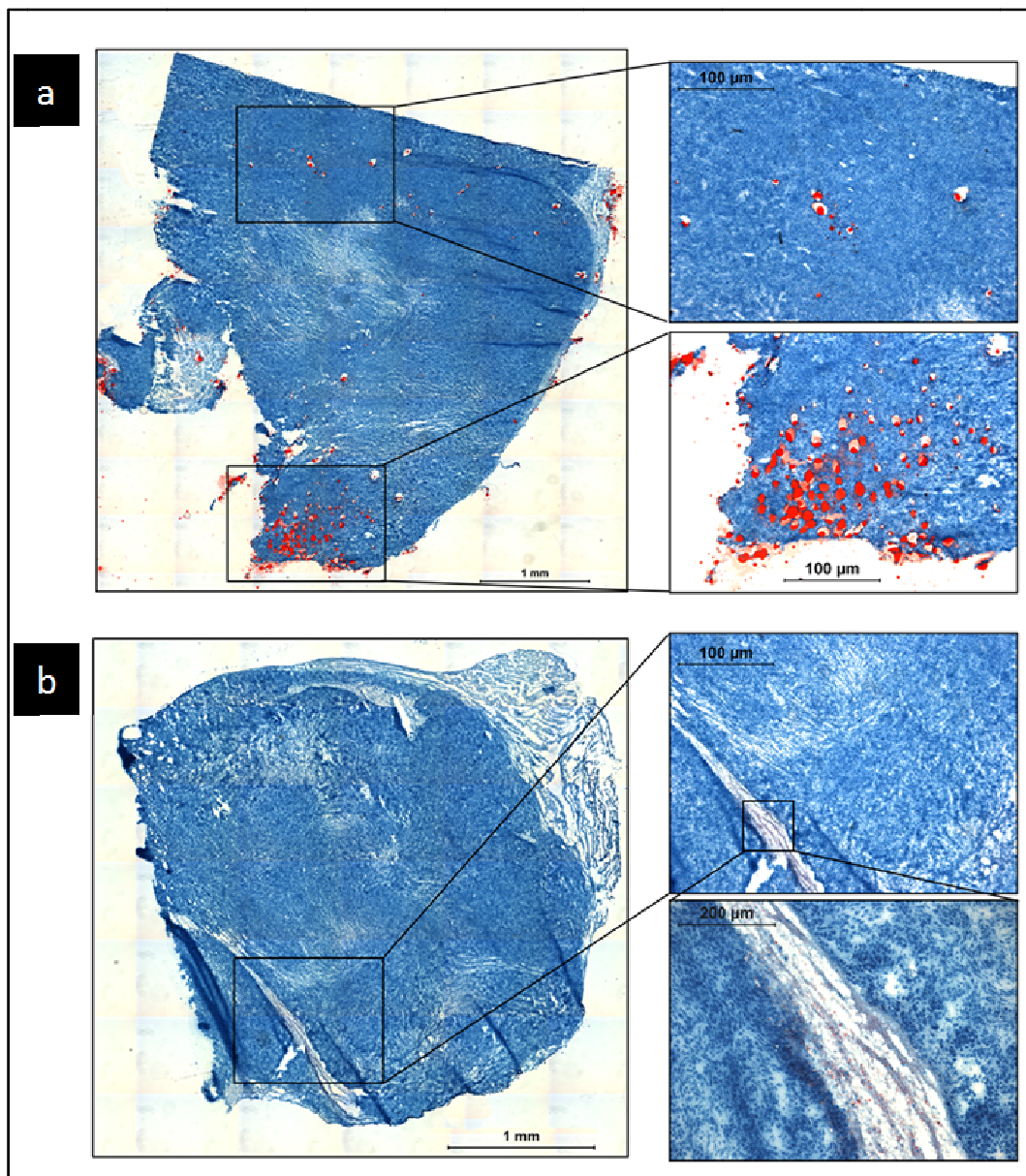


Figure 57 : Analyse histologique du modèle d'ostéosarcome humain SaOS2 induit par transplantation.

a. photomicrographie d'une coupe histologique d'un échantillon d'une tumeur du groupe SaOS2 + graisse, montrant de grosses gouttelettes de lipides en rouge.

b. photomicrographie d'une coupe histologique d'un échantillon d'une tumeur du groupe SaOS2 + canule, montrant de petites gouttelettes lipidiques en rouge

(Coloration Oil Red O, microscopie optique, grossissement original X2 à gauche et x20 à droite)

L'injection de graisse dans une tumeur SaOS2 induite par transplantation chez des souris immunodéprimées accélère la progression tumorale.

***MODELE HOS**

Nous avons réalisé le même protocole sur un autre modèle murin d'ostéosarcome humain. Nous avons choisi la lignée d'ostéosarcome humain HOS pour tester *in vivo* l'influence de la graisse et des Ad-CSM sur la progression tumorale ostéosarcomateuse chez des souris immunodéprimées nues. Cette lignée a démontré une excellente incidence des développements tumoraux dans les modèles par injection et par transplantation, alors que le modèle SaOS2 par injection n'était pas exploitable en raison d'une faible incidence des tumeurs.

Pour évaluer l'influence de l'injection de graisse sur la progression tumorale du modèle HOS, nous avons opté pour un modèle de transplantation tumorale, modèle utilisé dans l'étude précédente.

Les volumes tumoraux observés au sein des différents groupes étaient relativement homogènes. Si le volume tumoral semblait légèrement plus important dans le groupe de souris ayant reçues une injection de PBS au sein de la tumeur (groupe "HOS + PBS") que dans le groupe de souris où les tumeurs HOS induites n'ont pas été injectées (groupe "HOS seules"), il n'y avait pas de différence significative entre ces 2 groupes.

Le groupe de souris ayant reçues une injection de graisse au sein de la tumeur (groupe "HOS + graisse") présentait une progression tumorale plus importante que celle des groupes "HOS + PBS" et "HOS seules", et ceci de façon significative à partir de J30 post-implantation des fragments tumoraux (Figure 58a).

Dans le groupe de souris ayant reçues une injection de graisse mais sans transplantation préalable de fragments tumoraux (groupe "graisse seule"), la masse mesurée restait stable dans le temps avec une légère tendance à diminuer. La graisse seule n'a donc pas montré de capacité à développer une masse tissulaire particulière.

L'évolution du poids des souris était comparable dans les trois premiers groupes. La prise pondérale des souris du groupe "graisse seule" était supérieure à celle des trois groupes, sans être significativement différente (Figure 58b). Comme attendu, le développement tumoral induisait donc une légère perte de poids.

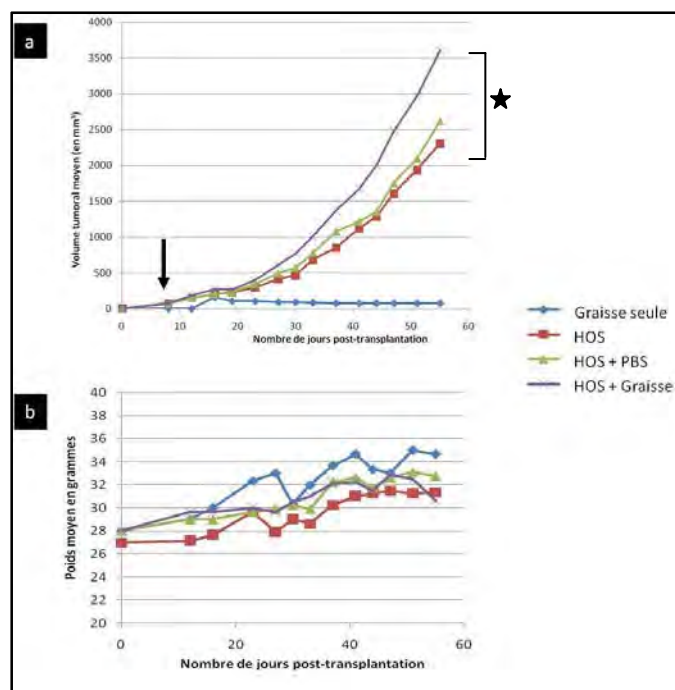


Figure 58 : Progression tumorale de l'ostéosarcome HOS en transplantation chez la souris nude.

a. Progression de la moyenne des volumes tumoraux en mm³ en fonction du temps

b. Evolution des moyennes pondérales en fonction du temps entre les groupes de souris ayant reçues :

- des fragments tumoraux d'ostéosarcome humain HOS seules,
- des fragments tumoraux d'ostéosarcome humain HOS et une injection de graisse humaine,
- des fragments tumoraux d'ostéosarcome humain HOS et une injection de PBS
- une injection de graisse humaine seule

La flèche indique le moment de l'injection de la graisse ou du PBS à l'aide d'une canule à J8 après la transplantation tumorale.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique ANOVA) à l'aide du logiciel GraphPad InStat v3.02. La valeur p est inférieure à 0,05 () pour le groupe "HOS + graisse" par rapport au groupe "HOS seules" à partir de J30*

L'analyse macroscopique de la tumeur révélait dans les trois groupes une tumeur volumineuse, ferme, plurilobée, partiellement nécrotique, peu vascularisée et non hémorragique (Figure 59a). Au moment de l'euthanasie, la graisse humaine était encore visible au niveau du site d'injection (Figure 59b). Lors de l'euthanasie, nous avons observé des métastases pulmonaires macroscopiques dans les trois groupes dans une proportion équivalente (3 animaux sur 8) (Figure 59c). La présence de métastases n'était pas liée au volume tumoral. Ainsi, les métastases pulmonaires n'étaient pas macroscopiquement plus visibles chez les souris ayant les plus gros volumes tumoraux.

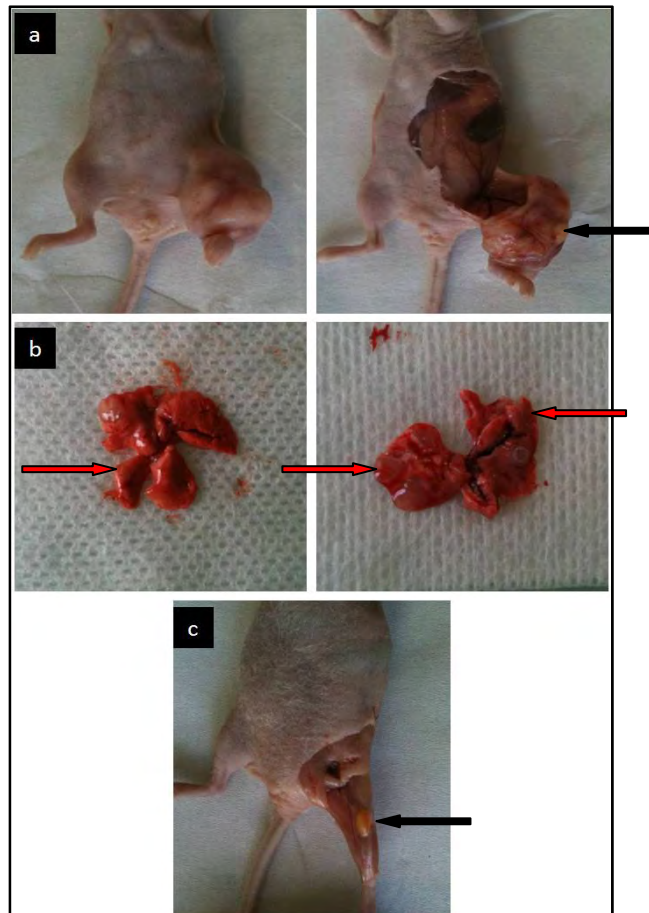


Figure 59 : Aspects macroscopiques du modèle d'ostéosarcome humain HOS induit par transplantation, avec injection de graisse.
a. Photographies des tumeurs au moment de l'euthanasie
b. Photographies des poumons au moment de l'euthanasie
c. Photographie d'une patte contrôle sans tumeur ayant reçu la greffe de graisse seule
Flèches noires : graisse humaine injectée encore visible au moment de l'euthanasie
Flèches rouges : métastases pulmonaires au moment de l'euthanasie

Sur l'analyse histologique, réalisée avec la collaboration du Pr De Pinieux (Service d'Anatomopathologie du CHU de Tours), les tumeurs HOS avaient un aspect de sarcome indifférencié avec de très nombreuses mitoses (Figures 60c et d). Les fibres musculaires étaient dissociées par la tumeur mais aussi repoussées en périphérie par la masse tumorale. Les tumeurs présentaient de nombreuses zones de nécrose en leur centre (Figures 60a et b). Nous n'observions pas de formation ostéoïde au sein de la matrice extra-cellulaire des tumeurs. Cependant, dans le modèle de transplantation sans injection de graisse, nous avons observé en périphérie de la tumeur des enboles vasculaires périphériques hétérogènes ayant un aspect de matrice ostéoïde (Figures 60a). En fonction de leur environnement, ces tumeurs d'aspect indifférencié semblaient donc pouvoir produire des calcifications.

Les tumeurs avaient le même aspect morphologique avec ou sans injection de graisse humaine sur des colorations Hématéine-Phloxine-Safran. Des coupes de morceaux de tumeur cryopréservés ont été analysées à l'aide d'une coloration Oil Red O. Cette coloration a mis en évidence la présence d'adipocytes et de nombreuses microvacuoles au sein des tumeurs injectées avec de la graisse (Figure 60f). Cette même coloration ne mettait rien en évidence dans les tumeurs injectées par du PBS (Figure 60e). Nous avons supposé que les éléments graisseux persistant à la fin de l'expérimentation provenaient de l'échantillon injecté. Cependant, l'injection de graisse pourrait aussi avoir conféré aux cellules HOS un potentiel adipogénique à l'origine des images visibles sur la figure 60f. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour explorer cette hypothèse.

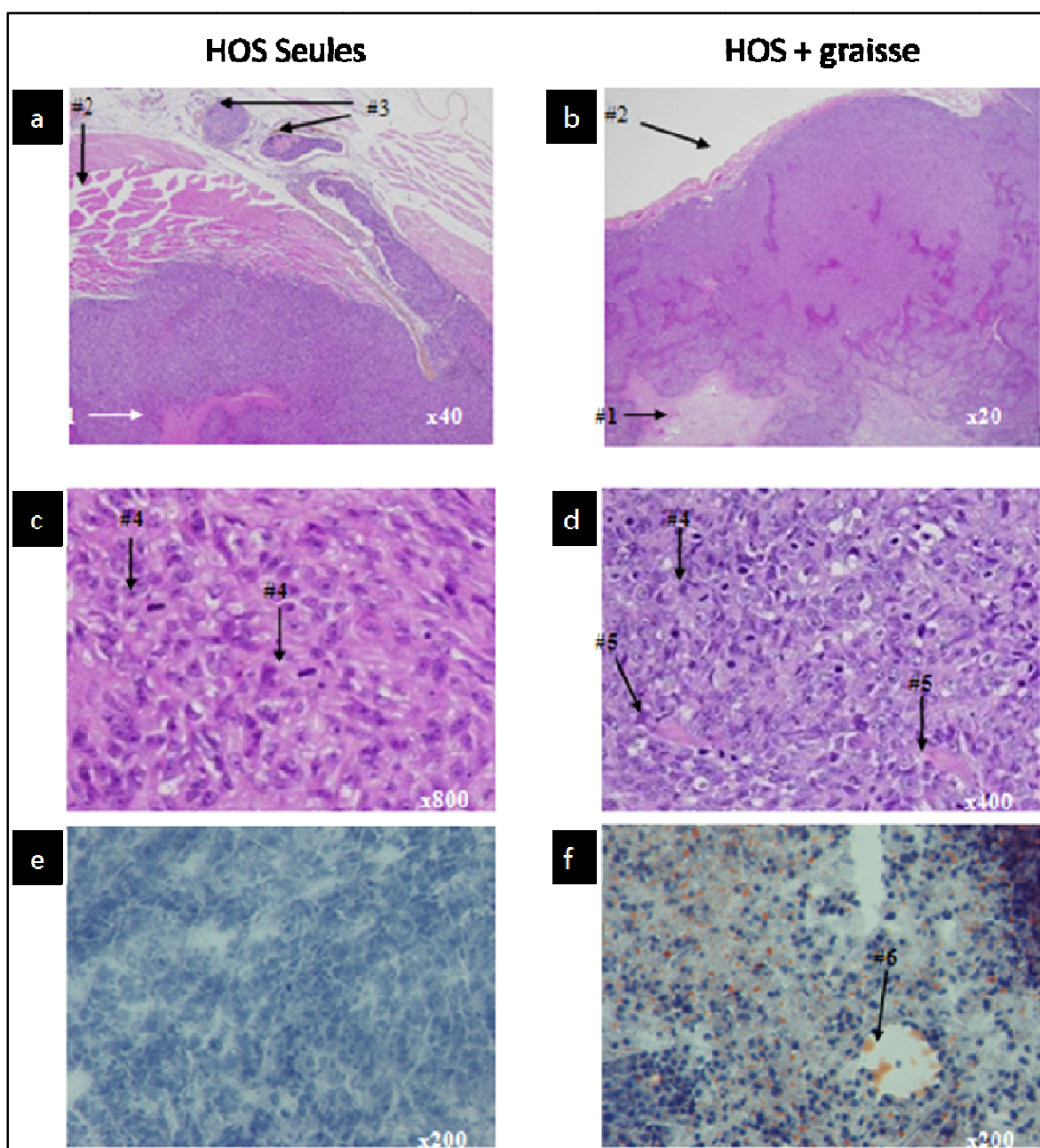


Figure 60 : Analyse histologique du modèle d'ostéosarcome humain HOS induit par transplantation, sans (a., c. et e.) ou avec (b., d. et f.) injection de graisse.

*Une coloration Hématéine-Phloxine-Safran a été utilisée pour obtenir les images a., b., c. et d.
Une coloration par Red Oil O a été utilisée pour obtenir les images e. et f.*

Des zones de nécrose et de fibrose sont indiquées par un #1. Les fibres musculaires (en rose) sont repoussées en périphérie par la tumeur (#2), mais aussi dissociées par la tumeur (#5). Dans les deux modèles, les images de mitoses sont nombreuses (#4). Une coupe a mis en évidence des embolus vasculaires périphériques ayant un aspect de matrice ostéoïde (#3). La figure f. met en évidence des adipocytes (#6) et de nombreuses microvacuoles lipidiques (en orange) absentes dans la figure e.

L'injection de graisse dans une tumeur HOS induite par transplantation chez des souris immunodéprimées accélère la progression tumorale. L'échantillon graisseux persistait sur le site d'injection en fin d'expérimentation.

2) *Progression tumorale en présence de Ad-CSM*

Pour déterminer si les cellules souches mésenchymateuses issues de la graisse (Ad-CSM) peuvent interagir avec les cellules d'ostéosarcome et ainsi modifier l'évolution de la tumeur, nous avons suivi le développement tumoral induit chez des souris par des injections de cellules d'ostéosarcome seules ou avec des Ad-CSM.

**LIGNEE SAOS2*

Les cellules d'ostéosarcome humain SaOS2 injectées en intra-musculaire dans la loge antéro-externe de jambe chez la souris nude conduisent à une faible incidence de développement tumoral (50 %). Il n'était donc pas possible d'obtenir de résultats interprétables sur des expériences de co-injection de cellules SaOS2 et de Ad-CSM, chez la souris nude.

**LIGNEE HOS*

Les cellules d'ostéosarcome humain HOS injectées en intra-musculaire dans la loge antéro-externe de jambe chez la souris nude conduisent à une incidence de 100 % de développement tumoral. Nous avons donc comparé le volume tumoral lors de co-injections de cellules HOS et de Ad-CSM à celui d'une injection de cellules HOS seules.

Les injections étant effectuées à J0 sur des souris immunodéficientes, nous avons observé un développement tumoral chez tous les modèles injectés, qui devenait macroscopiquement détectable entre J6 et J10.

L'induction tumorale par injection offre plus de précision qu'un modèle par transplantation car nous savons précisément le nombre de cellules injectées. Ceci a permis d'obtenir des développements tumoraux synchrones et homogènes au sein des groupes. Nous avons comparé l'évolution des volumes tumoraux entre les trois groupes de souris développant une tumeur. Au 35^e jour, nous avons pu observer une différence significative dans la progression tumorale entre chacun de ces trois groupes ($p < 0.05$) (Figure 61a). Dans le groupe de souris ne développant pas de tumeur mais ayant reçues des Ad-CSM seules, nous n'avons observé aucun développement d'une masse tissulaire.

L'évolution pondérale montrait une prise de poids moyenne supérieure dans le groupe de souris sans tumeur mais ayant reçues les Ad-CSM. La prise de poids dans le groupe de souris ayant reçues une injection de cellules HOS seules était supérieure au groupe de souris ayant reçues des cellules HOS et des Ad-CSM pour un ratio de 10/1 qui était également supérieure au groupe de souris ayant reçues des cellules HOS et des Ad-CSM pour un ratio de 2/1, sans que ces différences soient significatives. Ces différences de prise pondérale étaient en rapport avec la cinétique tumorale : plus la tumeur grossissait vite, moins les souris prenaient de poids (Figure 61b).

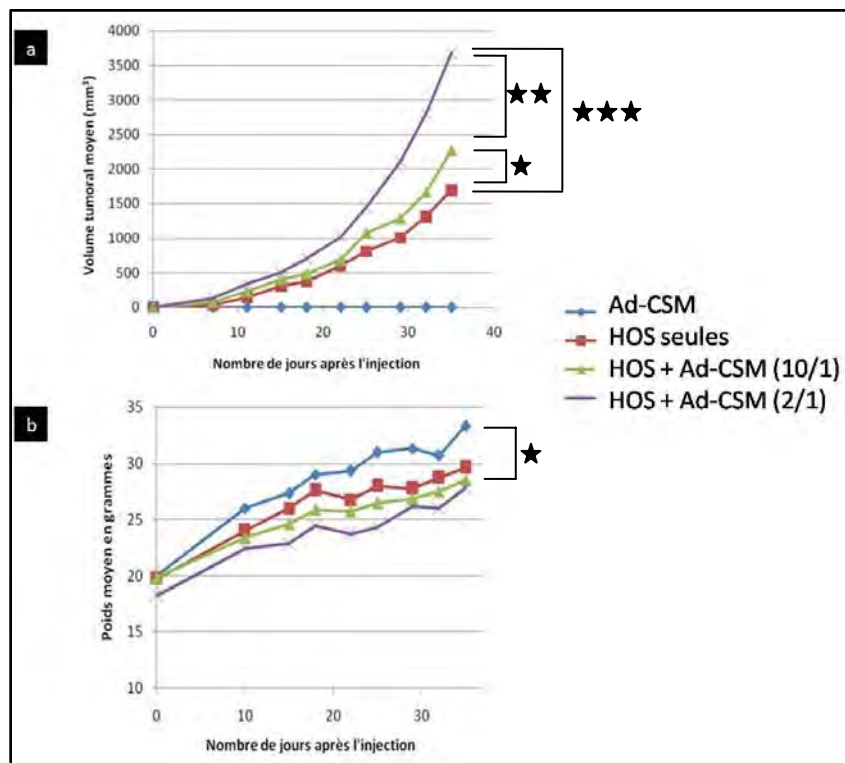


Figure 61 : Progression tumorale de l'ostéosarcome HOS en injection chez la souris nude.

a. Progression de la moyenne des volumes tumoraux en mm³ en fonction du temps

b. Evolution des moyennes pondérales en fonction du temps

entre les groupes de souris ayant reçues :

*des cellules d'ostéosarcome humain HOS seules,

*des cellules d'ostéosarcome humain HOS et des Ad-CSM avec un ratio de 10/1,

*des cellules d'ostéosarcome humain HOS et des Ad-CSM avec un ratio de 2/1,

*des Ad-CSM seules

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique ANOVA) à l'aide du logiciel GraphPad InStat v3.02.

Seuils de significativité : $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) à partir de J30

Sur des souris immunodéficientes, la co-injection de Ad-CSM avec des cellules ostéosarcomateuses HOS accélère la progression tumorale. Plus le ratio HOS/Ad-CSM augmente, plus la progression tumorale est rapide.

Dans les trois groupes avec tumeur induite par injection de cellules HOS, les processus tumoraux avaient le même aspect et étaient comparable aux tumeurs observées dans le modèle d'ostéosarcome HOS induit par transplantation : tumeur volumineuse, ferme, plurilobée, partiellement nécrotique, peu vascularisée et non hémorragique (Figure 62a).

Au moment de l'euthanasie, nous observions là encore des métastases pulmonaires macroscopiques dans les trois groupes dans une proportion d'environ 3 sur 8 (Figure 62b), ce qui correspond à l'histoire naturelle des tumeurs induites par les cellules d'ostéosarcome humain HOS. Les Ad-CSM n'ont donc pas activé de processus métastatiques, comme nous l'avions constaté dans le groupe de souris nues ayant reçu la co-injection de CSM de rat issues de la moelle osseuse associées à des cellules ostéosarcomateuses de rat OSRGa (cf Partie 1).

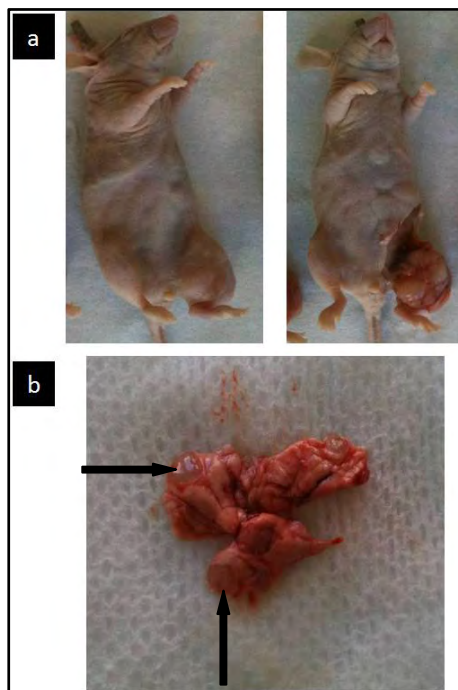


Figure 62 : Aspects macroscopiques des tumeurs induites par co-injection de cellules HOS et Ad-CSM
a. Photographies des tumeurs au moment de l'euthanasie
b. Photographies des poumons au moment de l'euthanasie
Flèches noires : métastases pulmonaires au moment de l'euthanasie

C. Interactions *in vitro* entre graisse ou Ad-CSM et cellules d'ostéosarcomes

Après avoir mis en évidence *in vivo* l'influence de la graisse et des Ad-CSM sur la progression tumorale de cellules dérivées d'ostéosarcomes humains, nous avons tenté d'observer *in vitro* ces effets afin de préciser les médiateurs de ces interactions. Pour étudier ces interactions *in vitro*, trois lignées de cellules ostéosarcomateuses humaines (SaOS2, HOS et U2OS) ont été utilisées.

1) Co-culture

***CULTURE DE CELLULES OSTEOSARCOMATEUSES EN PRESENCE DE GRAISSE**

Les différentes lignées ont étéensemencées à J0 dans des plaques 24 puits dans du α MEM avec 2,5 ou 5% de SVF. Les 200 μ L de graisse humaine placés dans des chambres de co-culture sont maintenues pendant 6 heures sur une autre plaque avec α MEM avec 10% de SVF avant d'être adaptées aux premières plaques. Le but de cette expérimentation est de reproduire l'effet pro-prolifératif de la graisse sur les cellules cancéreuses.

Le test XTT réalisé à J1 montrait une augmentation significative de la densité optique (DO) dans les puits avec chambres de co-culture remplies de graisse pour les lignées HOS (+47%) et SaOS2 (+33%) ($p < 0,001$). Pour la lignée U2OS, la différence observée (+16%) n'était pas significative (Figure 63a). Cependant, cette augmentation de la DO ne pouvait pas être attribuée uniquement à l'augmentation de l'activité métabolique des cellules cancéreuses puisqu'une différence s'observait aussi dans les puits contrôle où aucune lignée ostéosarcomateuse n'avait étéensemencée.

Dans les puits contrôle, nous avons observé la présence de nombreuses hématies. Ces cellules provenaient donc des échantillons de graisse. Bien que les hématies (7 μ m) soient plus grosses que la taille des pores des chambres (3 μ m), elles arrivaient à traverser ces pores. Même si celles-ci ne possèdent pas de mitochondries, l'augmentation de la DO de plus de 50% dans les puits contrôle était due la présence de ces hématies. La présence des hématies dans les puits nous a donc biaisé les mesures d'activité métabolique observées dans les puitsensemencés avec des cellules tumorales.

Au bout de 24 heures de co-culture, nous avons aussi observé un changement de l'aspect du tapis cellulaire sur toutes les lignées lié à une souffrance cellulaire (exemple sur la lignée HOS, comparaison des images 2 et 3 sur la Figure 63c). La souffrance cellulaire se traduisait par une moins bonne adhérence des cellules au plastique. Là aussi, nous observions la présence de très nombreuses hématies dans les puits de culture (exemple sur la lignée U2OS, Figure 63c1).

Au bout de 48 heures, la souffrance cellulaire observée à J1 s'était accentuée. Nous avons observé un décollement des tapis cellulaires (débutant d'abord sur la lignée HOS, puis la lignée SaOS2 et enfin la lignée U2OS). Le test XTT réalisé a montré des différences (non significatives à l'exception de la lignée HOS) en rapport avec la souffrance cellulaire des différentes lignées (diminution de la densité optique par rapport au contrôle plus importante sur la lignée HOS (-40%) que sur la lignée SaOS2 (-20%), alors que, sur la lignée U2OS où le tapis cellulaire était encore adhérent, la densité optique des puits avec les chambres de co-cultures restait supérieure au contrôle (+24%). L'augmentation significative de la densité optique des puits contrôle observée à J1 était maintenue. Le comptage sur plaque de Malassez des cellules formant le tapis cellulaire restant était aussi concordant avec l'aspect de souffrance cellulaire. Le nombre de cellules vivantes dans les puits de co-culture était diminué pour les lignées HOS et SaOS2. Par contre, pour la lignée U2OS, le nombre de cellules vivantes augmentait dans les puits de co-culture, malgré l'aspect de souffrance cellulaire observée au microscope optique. Les différences observées sur les plaques de Malassez n'étaient pas significatives (Figure 63b). Lors des comptages, les cellules cancéreuses se distinguaient des hématies par leur plus grande taille.

La présence des hématies dans les puits de co-culture modifiant la densité optique lors des tests XTT, nous ne pouvons pas conclure sur l'influence de la graisse sur l'activité métabolique des lignées ostéosarcomateuses. La co-culture indirecte avec de la graisse a induit une toxicité qui a provoqué une souffrance cellulaire sur toutes les lignées allant jusqu'au décollement des tapis cellulaires des lignées HOS et SaOS2. Pour la lignée U2OS, l'augmentation du nombre de cellules vivantes dans les puits de co-culture allait à l'encontre de l'aspect de souffrance cellulaire observé aussi dans cette lignée.

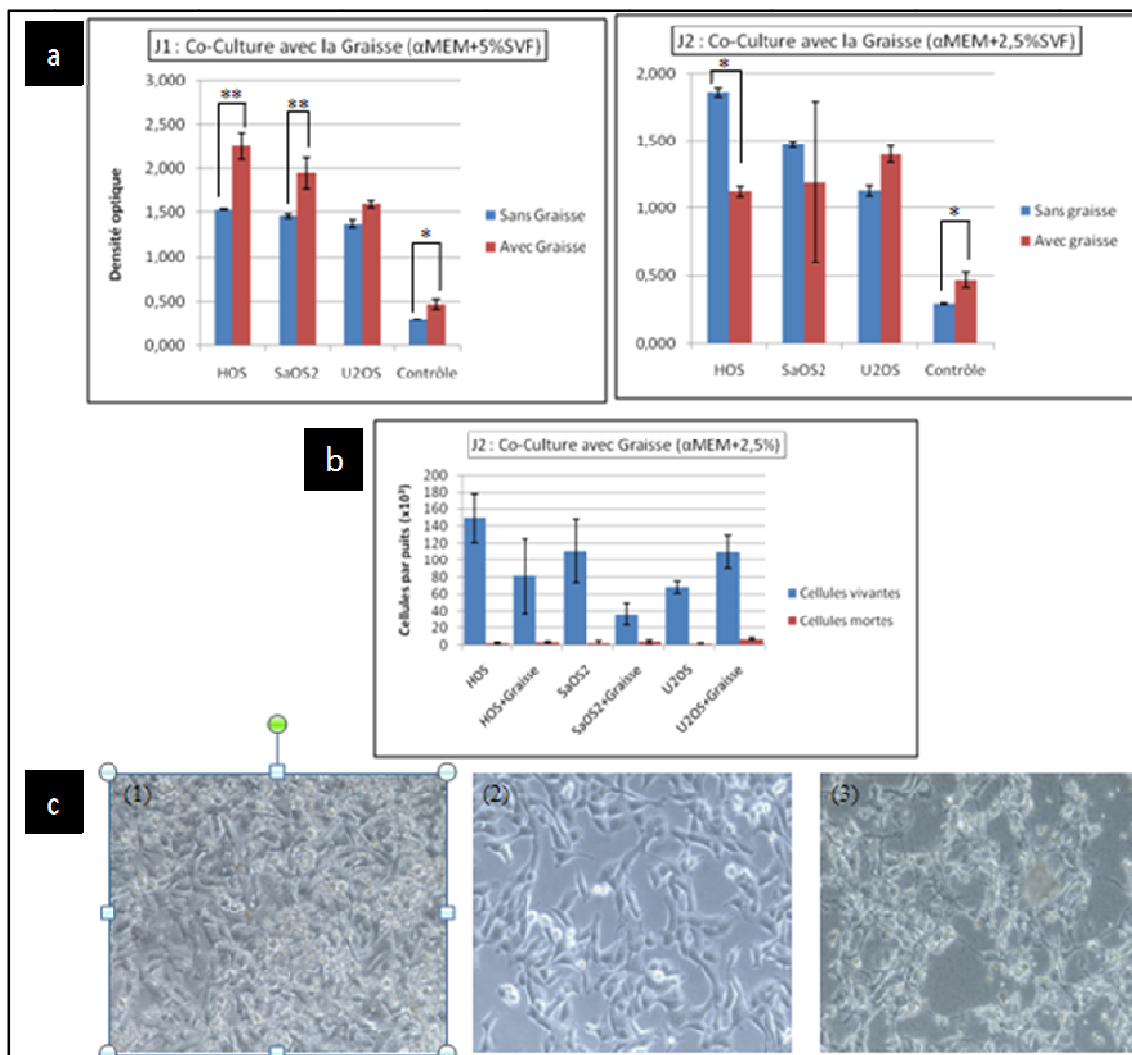


Figure 63 : Co-culture indirecte des lignées ostéosarcomateuses avec de la graisse.

Les figures a. 1 et 2 présentent les résultats des tests XTT réalisés respectivement à J1 et à J2.

Le contrôle correspond à la densité optique du milieu, c'est-à-dire sans activité métabolique cellulaire.

La figure b. présente le résultat du comptage sur plaque de Malassez réalisé à J2.

Les images présentées en c. sont des photographies de puits de culture en plaques 24 puits. En c.1, nous observons de nombreuses hématies issues de la graisse sur une culture de la lignée U2OS (éléments réfringents multiples). La comparaison des images provenant de puits en culture simple c.2 et des puits avec co-culture indirecte en présence de graisse c.3 met en évidence la souffrance cellulaire de la lignée HOS observable dès J1

(cellules moins bien étalées, moins adhérentes au plastique).

Seuils de significativité : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$;

Puits contrôle = Puits vides (sans ensemencement cellulaire)

*CULTURE DE CELLULES OSTEOSARCOMATEUSES EN PRESENCE DE AD-CSM

Les différentes lignées d'ostéosarcome ont été cultivées en présence indirecte de Ad-CSM à deux concentrations différentes (10 cellules ostéosarcomateuses pour 1 Ad-CSM et 1 cellule ostéosarcomateuse pour 1 Ad-CSM).

Des comptages sur lame de Malassez ont été réalisés pour évaluer l'influence des Ad-CSM sur le nombre de cellules ostéosarcomateuses vivantes (Figure 64a). Les différences observées sur la lignée HOS n'étaient pas significatives. Pour la lignée SaOS2, le nombre de cellules diminuait en présence de Ad-CSM, et ceci de façon significative pour un ratio de 1 pour 1 et pour un ratio de 10 pour 1. Pour la lignée U2OS, le nombre de cellules augmentait en présence de Ad-CSM ; cette augmentation était significative pour un ratio de 1 pour 1 et pour un ratio de 10 pour 1. En réalisant le comptage des cellules mortes, nous n'avons pas mis en évidence d'induction de mort cellulaire par les co-cultures. La co-culture indirecte avec des Ad-CSM avait donc des influences variables sur la prolifération cellulaire pour les différentes lignées. Des tests XTT ont été réalisés pour mesurer l'activité métabolique des cellules en présence d'Ad-CSM. Nous n'avons pas observé de différence entre les groupes, quelque soit la lignée utilisée (Figure 64b).

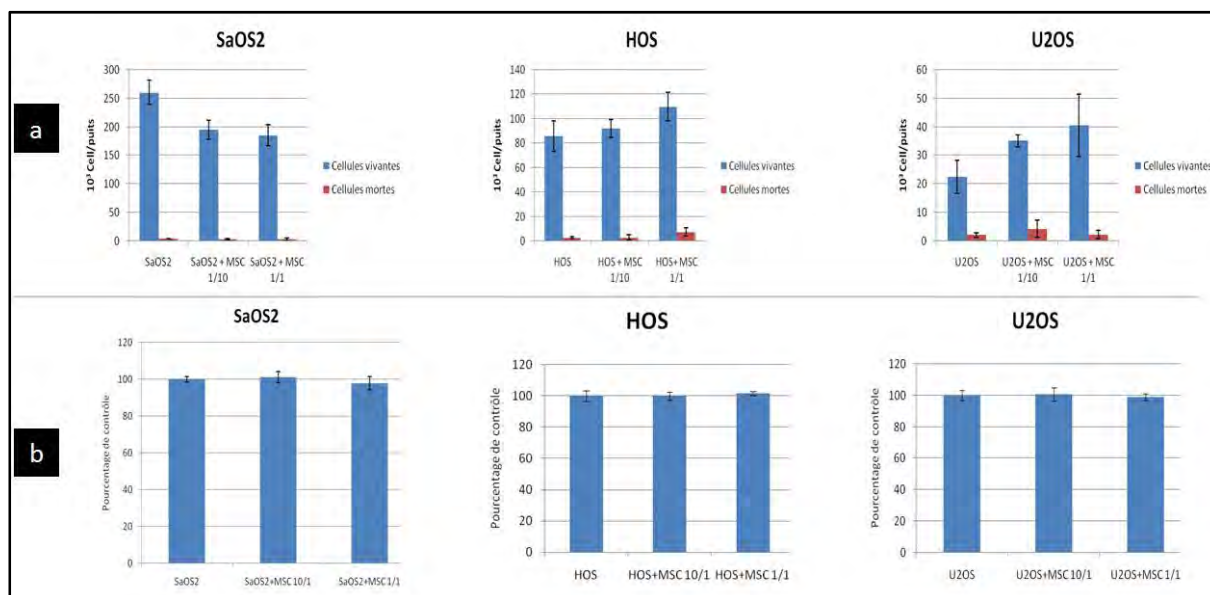


Figure 64 : Co-culture indirecte des lignées ostéosarcomateuses humaines SaOS2, HOS et U2OS avec des Ad-CSM issues de tissu adipeux humain.

a. Comptage des cellules vivantes et mortes sur lame de Malassez sur les 3 lignées cellulaires : moyenne et écart-type sur 3 puits.

b. Activité métabolique mesurée par test XTT et exprimée en pourcentage de l'activité des cellules cultivées seules : moyenne et écart-type sur 3 puits.

L'activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées seules est ramenée à 100%.

La co-culture indirecte avec des Ad-CSM retrouvait des résultats discordants lors des comptages des cellules ostéosarcomateuses vivantes et mortes, selon les lignées étudiées, et ne changeait pas l'activité métabolique des cellules ostéosarcomateuses, que le ratio entre cellules d'ostéosarcome et Ad-CSM soit de 10 pour 1 ou de 1 pour 1.

2) Milieux conditionnés

Les milieux étaient conditionnés pendant 24 heures par des Ad-CSM, sans SVF, et supplémentés secondairement pour obtenir des concentrations de 5 ou 2,5 % de SVF. Selon les puits, les milieux étaient composés de 0 %, 25 %, 50 % et 75 % de milieu conditionné (MC). Les tests XTT réalisés à 24 et 48 heures montraient des différences significatives entre les puits contrôle et les puits avec des milieux conditionnés pour les lignées SaOS2 et U2OS. La même tendance était observée pour la lignée HOS mais les différences n'étaient pas significatives (sauf pour le milieu conditionné à 75 % avec 5 % de SVF). Plus la concentration en milieu conditionné était importante, plus les densités optiques mesurées augmentaient (Figure 65). Nous avons observé ces résultats de façon identique entre les 3 lignées cellulaires ostéosarcomateuses, à 24 heures et 48 heures, avec 5 et 2,5 % de SVF. Au bout de 48 heures, seulement sur la lignée SaOS2, nous avons observé une chute de la densité optique, probablement due à une mort cellulaire induite par une trop forte confluence.

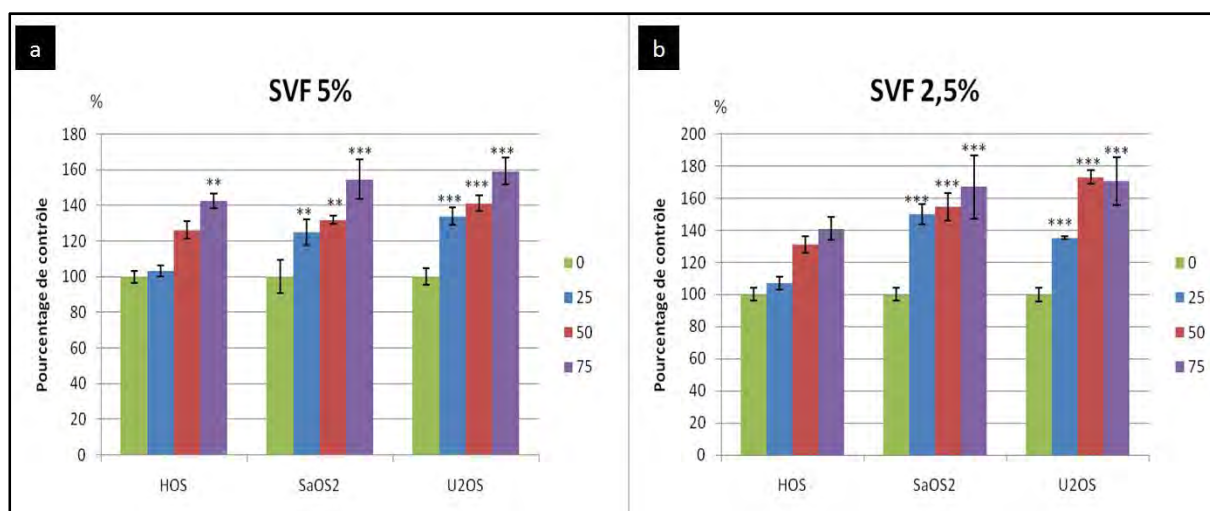


Figure 65 : *Activité métabolique des lignées ostéosarcomateuses humaines HOS, SaOS2 et U2OS cultivées dans des milieux conditionnés par des Ad-CSM issues de tissu adipeux humain.*

a. et b. Activité métabolique, présentée en pourcentage par rapport au "contrôle" (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans MC), au bout de 24 h, des lignées cellulaires ostéosarcomateuses en présence d'un milieu conditionné par les Ad-CSM et supplémenté secondairement en SVF pour des concentrations finales de 5 et 2,5 % : moyenne et écart-type sur 3 puits.

Les statistiques sont calculées par rapport au contrôle (cellules cultivées sans milieu conditionné = colonnes vertes).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Kruskal-Wallis (non paramétrique ANOVA) à l'aide du logiciel GraphPad InStat v3.02.

Seuils de significativité : $p < 0,05$ (); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)*

Les milieux conditionnés par des Ad-CSM augmentent donc l'activité métabolique des cellules ostéosarcomateuses, ce qui prouve qu'il existe des facteurs solubles à identifier.

3) Adipocytokines

Nous avons supplémenté les milieux de culture avec 2 adipocytokines (Leptine et Adiponectine) afin de déterminer l'influence directe éventuelle de ces cytokines sur la prolifération cellulaire.

***LEPTINE**

Afin de tester directement l'influence de la Leptine sur la prolifération cellulaire ostéosarcomateuse, nous avons supplémenté les milieux de culture avec de la rhLeptin et observé l'activité métabolique des différentes lignées de cellules d'ostéosarcome.

Le test XTT, réalisé sur les plaques 96 puits après 48 heures de culture cellulaire dans des milieux sans SVF, ne montrait pas de différence d'activité métabolique entre les puits contrôles et les puits supplémentés avec de la Leptine à 100 et 200 ng/mL. Ces résultats étaient comparables entre les lignées (Figure 66a).

N'ayant pas de résultats probants avec des concentrations de 100 et 200 ng/mL de rh Leptin, nous avons réalisé un nouveau test XTT cette fois-ci avec des concentrations de 10nM (160ng/mL) ou 100nM (1,6µg/mL). Les cellules étaient cette fois-ciensemencées dans des plaques 24 puits. Les derniers résultats ne montraient pas d'influence de la rhLeptin sur l'activité métabolique cellulaire des trois lignées (Figure 66b).

Nous n'avons pas mis en évidence d'influence directe de la rhLeptin sur la prolifération cellulaire ni sur l'activité métabolique cellulaire ostéosarcomateuse. Cependant, comme nous n'avons pas non plus mis en évidence de signaux de transduction sur les cellules ostéosarcomateuses présentant des récepteurs à la Leptine, nous n'avons aucun élément certifiant l'intégrité de la protéine recombinante utilisée.

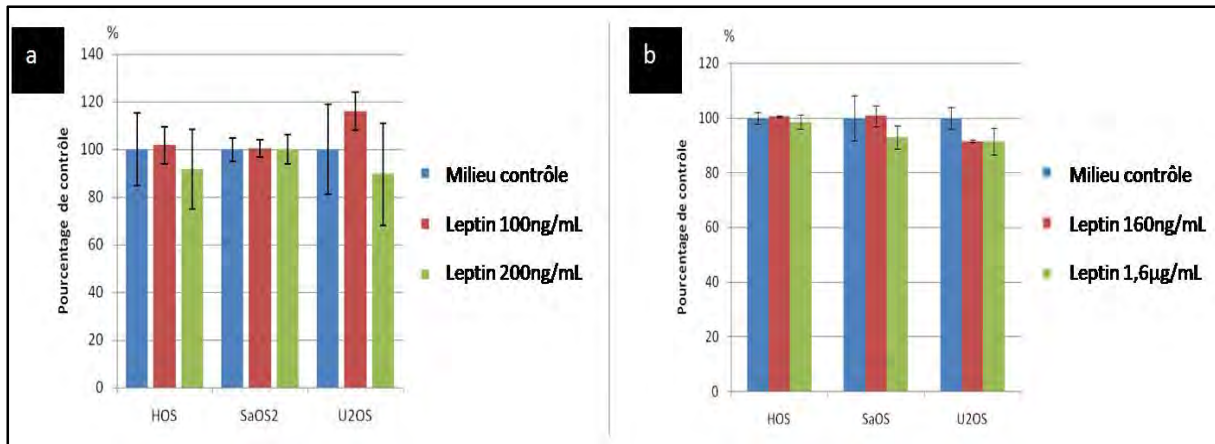


Figure 66 : *Activité métabolique cellulaire (XTT) en présence de Leptine*
 a. *Modifications de l'activité métabolique cellulaire (XTT), exprimée en pourcentage de "contrôle" (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans rhLeptin), des cellules ostéosarcomateuses dont le milieu habituel sans SVF a été supplémenté avec 100 et 200 ng/mL de rhLeptin*
 b. *Modifications de l'activité métabolique cellulaire (XTT), exprimée en pourcentage de "contrôle" (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans rhLeptin), des cellules ostéosarcomateuses dont le milieu appauvri en SVF (5 %) a été supplémenté avec 160 ng/mL et 1.6 µg/mL de rhLeptin.*

***ADIPONECTINE**

Nous avons réalisé des tests XTT pour rechercher l'influence directe de l'Adiponectine sur l'activité métabolique des cellules ostéosarcomateuses.

Le test XTT réalisé sur les plaques 96 puits après 48 heures de culture cellulaire dans des milieux sans SVF, ne montrait pas de différence d'activité métabolique entre les puits contrôles (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans rhAdiponectin) et les puits supplémentés avec de l'Adiponectine à 1 et 3 µg/mL, quelles que soient les lignées (Figure 67a).

Nous avons réalisé de nouveaux tests, cette fois-ci sur des plaques 24 puits, en augmentant la concentration finale maximale en Adiponectine à 10 µg/mL. Les différences d'activité métabolique observées pour les concentrations de 1 et 10 µg/mL n'étaient pas significatives pour les trois lignées (Figure 67b).

Nous n'avons pas mis en évidence d'influence directe de la rhAdiponectin sur l'activité métabolique cellulaire ostéosarcomateuse. Cependant, ici encore, nous aurions besoin d'un test pour s'assurer de l'intégrité de la protéine recombinante utilisée.

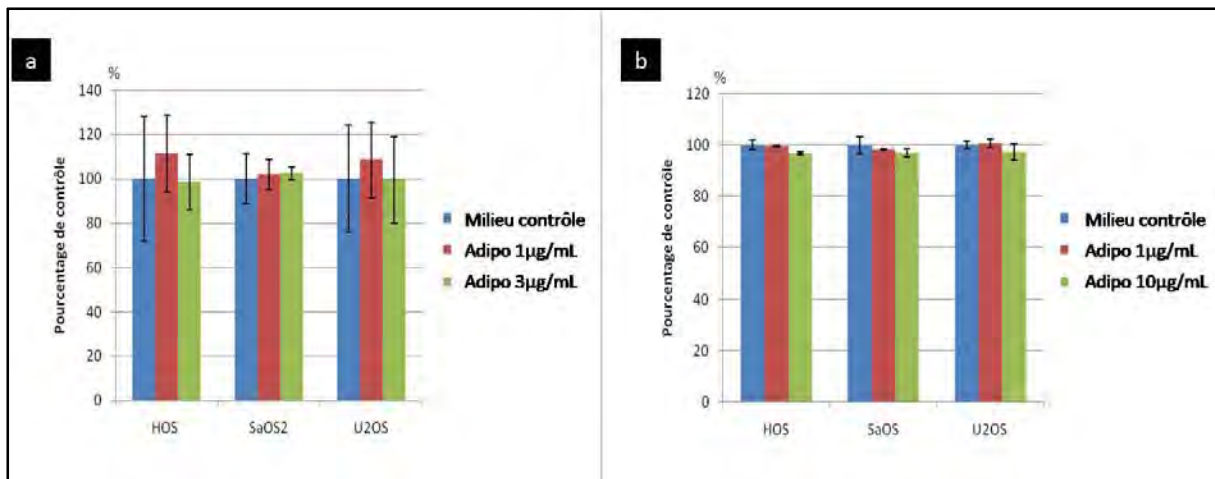


Figure 67 : *Activité métabolique cellulaire (XTT) en présence d'Adiponectine*

a. Modifications de l'activité métabolique cellulaire (test XTT), exprimée en pourcentage de "contrôle" (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans rhAdiponectin), des cellules ostéosarcomateuses dont le milieu habituel sans SVF a été supplémenté avec 1 et 3 µg/mL de rhAdiponectin

b. Modifications de l'activité métabolique cellulaire (test XTT), exprimée en pourcentage de "contrôle" (activité des cellules ostéosarcomateuses cultivées sans rhAdiponectin), des cellules ostéosarcomateuses dont le milieu appauvri en SVF (5%) a été supplémenté avec 1 et 10 µg/mL de rhAdiponectin.

IV. Conclusion

Le cas clinique de **récidive locale tardive d'un ostéosarcome**, dans les mois suivant la réalisation d'un **lipomodelage**, qui a été décrit au début de la partie 2, pose la question de l'innocuité de cette procédure chirurgicale dans un contexte post-tumoral. Les récurrences locales d'ostéosarcome survenant au-delà de 10 ans après la prise en charge initiale sont des événements exceptionnellement décrits dans la littérature (Bacci, 2000). De plus, dans le cas de notre patiente, il s'agissait d'un ostéosarcome de sous-type télangiectasique dont la résection extra-articulaire monobloc initiale avait été réalisée avec des marges de sécurité importantes, ces 2 notions constituant les principaux facteurs prédictifs du risque de récurrence (Bacci, 2000 ; Bielack, 2002).

La modification du microenvironnement jouant un rôle déterminant sur la progression d'un processus tumoral, l'implication de ce geste de chirurgie reconstructrice dans la résurgence tumorale devait donc faire l'objet de recherches complémentaires dans le cadre de l'ostéosarcome.

Aucune publication n'a pour le moment mis en évidence l'influence du lipomodelage sur la récurrence ou l'apparition d'une tumeur. Les seules données retrouvées dans la littérature rapportent des récurrences de cancers du sein survenues chez des patientes ayant bénéficié d'un lipomodelage, mais l'importance de la fréquence des récurrences dans cette pathologie fait qu'aucun lien n'a pu être établi entre la récurrence et le geste chirurgical (Chan 2008 ; Delay, 2008 ; Gosset, 2008 ; Mojallal, 2009).

Cependant, dans notre cas clinique (Perrot, 2010 : cf Annexes-Article 3), la chronologie des événements semble pointer la responsabilité du transfert de graisse dans cette récurrence locale tardive exceptionnelle de l'ostéosarcome.

La procédure chirurgicale pourrait activer la prolifération tumorale, soit via le transfert de graisse (tissu adipeux, adipocytokines, Ad-CSM), soit via l'inflammation induite par le geste chirurgical.

1) *La graisse étant composée de divers éléments spécifiques (adipocytes, cellules souches mésenchymateuses adipocytaires) et non spécifiques (composants sanguins), nous avons recherché in vivo les effets de ces éléments spécifiques sur la croissance cellulaire ostéosarcomateuse sur différents modèles animaux par transplantation et par injection.*

Nos modèles par transplantation de fragments de tumeurs SaOS2 ou HOS ont montré une incidence tumorale de 100 %.

Les modèles par transplantation SaOS2 et HOS nous ont permis *in vivo* de suivre les interactions entre la graisse injectée et les tumeurs ostéosarcomateuses.

Dans le modèle de transplantation SaOS2 avec injection de 100 μ L de graisse humaine préalablement centrifugée à l'aide d'une aiguille, le groupe "SaOS2 + graisse" présentait une croissance tumorale significativement supérieure au groupe "SaOS2 seules", mais aussi au groupe contrôle "SaOS2 + PBS", qui simulait le geste chirurgical par injection de PBS à l'aide d'une aiguille.

Dans le modèle de transplantation HOS avec injection de 100 μ L de graisse humaine préalablement centrifugée à l'aide d'une aiguille, le groupe "HOS + graisse" présentait une croissance tumorale significativement supérieure au groupe contrôle "HOS seules", mais aussi au groupe contrôle "HOS + PBS", qui simulait le geste chirurgical par injection de PBS à l'aide d'une aiguille.

Ces expérimentations sur les tumeurs SaOS2 et HOS montraient que l'injection de graisse humaine dans une tumeur ostéosarcomateuse accélère la croissance tumorale et que cet effet pro-tumoral est propre à la graisse et non lié à l'inflammation engendrée par le geste chirurgical.

Une hypothèse à cet effet pro-tumoral était la présence de cellules souches mésenchymateuses (Ad-CSM) dans la graisse injectée.

Les études préliminaires sur des cellules d'ostéosarcomes de souris montraient que les cellules souches mésenchymateuses de souris avaient un effet pro-tumoral. Nous avons donc suspecté les Ad-CSM d'avoir un rôle dans l'effet pro-tumoral de la graisse humaine sur la croissance ostéosarcomateuse.

Les modèles par injection SaOS2 et HOS nous ont permis *in vivo* de suivre les interactions entre les Ad-CSM et les cellules ostéosarcomateuses.

Les Ad-CSM ont pu être isolées de façon simple à partir d'échantillons de graisse humaine. Elles ont ensuite pu être cultivées et amplifiées. Leur nature de cellules souches mésenchymateuses a pu être déterminée grâce à leurs caractéristiques morphologiques, phénotypiques et leurs capacités de prolifération et de différenciation.

Nos modèles par injection de cellules n'ont conduit au développement d'une tumeur que dans 50 % des cas pour SaOS2 contre 100 % pour HOS. Il n'était donc pas possible d'obtenir de résultats interprétables sur des expériences de co-injection de cellules SaOS2 et de Ad-CSM, chez la souris nude.

L'effet pro-tumoral des Ad-CSM a été prouvé *in vivo* sur le modèle HOS par injection en co-injectant les cellules ostéosarcomateuses avec des Ad-CSM à des ratios différents (10 pour 1 et 2 pour 1). La co-injection d'Ad-CSM a provoqué une accélération de la progression tumorale. La croissance tumorale augmentait d'autant plus que le ratio HOS/Ad-CSM était élevé.

Cette expérimentation a montré que les Ad-CSM participaient à l'effet pro-tumoral de la graisse humaine.

La limite principale de notre travail *in vivo* est que nos modèles animaux ne correspondent pas précisément à la problématique de notre cas clinique.

En effet, dans le cas de notre patiente, elle a présenté un ostéosarcome traité par chimiothérapie et chirurgie. Treize ans plus tard, après 3 séances de lipomodélage, une récurrence locale tardive a été diagnostiquée.

Alors que dans nos modèles animaux, les conditions d'une récurrence ne sont pas recrées puisque :

- dans les modèles par transplantation : la graisse est injectée dans une tumeur évolutive, sans geste de chirurgie d'exérèse préalable
- dans les modèles par injection : les Ad-CSM sont co-injectées avec les cellules tumorales

2) *Après avoir mis en évidence in vivo l'influence de la graisse et des Ad-CSM sur la progression tumorale de tumeurs ostéosarcomateuses humaines, nous avons tenté d'observer in vitro ces effets afin de préciser les médiateurs de ces interactions. Pour étudier ces interactions in vitro, trois lignées de cellules ostéosarcomateuses humaines (SaOS2, HOS et U2OS) ont été utilisées.*

Nos expérimentations de co-cultures de cellules ostéosarcomateuses en présence de graisse n'ont pas été contributives, en raison des hématies présentes dans la graisse prélevée selon la technique de Coleman qui modifiaient la densité optique et rendaient nos résultats ininterprétables.

Les co-cultures de cellules ostéosarcomateuses en présence de Ad-CSM montraient des résultats discordants selon les lignées cellulaires d'ostéosarcome lors des comptages cellulaires et ne changeaient pas l'activité métabolique des différentes lignées cellulaires d'ostéosarcome lors des test XTT, quel que soit le ratio entre cellules d'ostéosarcome et Ad-CSM.

Par contre, dans nos expérimentations utilisant les milieux conditionnés par des Ad-CSM, on observe une augmentation de l'activité métabolique des cellules ostéosarcomateuses, ce qui prouve qu'il **existe des facteurs solubles à identifier**.

Nous avons alors essayé de déterminer l'influence directe éventuelle de 2 adipocytokines : la Leptine et l'Adiponectine. Mais nous mettons en doute l'intégrité des 2 protéines recombinantes utilisées dans notre travail.

La limite principale de notre travail *in vitro* est le choix de notre méthode d'identification des facteurs solubles potentiellement impliqués, produits par les Ad-CSM. Nous avons choisi "au hasard" de rechercher les interactions avec la Leptine et l'Adiponectine, mais il existe de multiples autres voies à envisager, comme par exemple le facteur de transcription Dkk1 (dickkopf 1, un inhibiteur de Wnt). De plus, ces interactions sont probablement multifactorielles et ne dépendent pas d'une seule voie de signalisation.

Nous envisageons désormais, afin d'identifier et de quantifier *in vitro* les facteurs solubles produits par les cellules souches mésenchymateuses, d'utiliser la technologie Luminex (Moalic, 2004) grâce à laquelle nous pourrions quantifier *in vitro* le niveau d'expression des cytokines produites par les Ad-CSM et suivre en parallèle leurs effets sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome.

De plus, nous pourrions également quantifier *in vivo* ces mêmes cytokines et suivre leurs effets sur la croissance tumorale : le dosage des cytokines et de leurs récepteurs est possible avec la technologie Luminex après extraction des protéines des tumeurs (Chavey, 2007). A l'aide de cette technique, nous envisageons de comparer des ostéosarcomes induits par injection de cellules ostéosarcomateuses seules ou co-injectées avec des Ad-CSM.

Conclusion et perspectives

Le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en multiples lignées cellulaires font d'elles une source inestimable pour la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Depuis un peu plus de 10 ans, elles représentent «**le rêve des cellules à tout faire**». L'immense potentiel clinique des cellules souches mésenchymateuses commence à émerger grâce à de multiples travaux menés en recherche fondamentale et clinique. Cependant, un travail énorme reste à faire pour, d'une part, mieux caractériser ces cellules et comprendre quels mécanismes peuvent expliquer leurs effets cliniques et, d'autre part, valider leurs réels bénéfices thérapeutiques par le biais d'études cliniques de grande envergure.

L'évolution d'un cancer comprend non seulement la croissance de la tumeur primaire mais aussi dans certains cas, la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme et l'apparition de métastases dans divers organes cibles.

Ce processus nécessite une étroite relation entre les cellules cancéreuses et l'ensemble des cellules et composants constituant le **microenvironnement tumoral**.

Le microenvironnement tumoral contient divers types cellulaires: cellules endothéliales, cellules du système immunitaire (lymphocytes B, lymphocytes T, neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques), cellules adipeuses, mais aussi cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

L'ensemble va ralentir ou accélérer la croissance tumorale en jouant sur la balance prolifération/mort cellulaire *via* la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et chimiokines, et de protéases. Ces mêmes facteurs vont également moduler la vascularisation de la tumeur (angiogenèse), lui permettant d'échapper au système immunitaire et favorisant la capacité des cellules tumorales à traverser la membrane basale pour, à terme, se disséminer.

Parmi toutes les cellules présentes dans le microenvironnement tumoral, les CSM pourraient jouer un rôle clé dans le développement tumoral. Un certain nombre de travaux a permis de confirmer la présence de CSM au niveau de la tumeur primaire mais également des métastases. Il est difficile de savoir si les CSM présentes dans les tumeurs sont des cellules stromales déjà présentes dans le tissu cible ou si elles ont été recrutées par les cellules tumorales elles-mêmes, *via* des facteurs sécrétés tels que les chimiokines. Les deux hypothèses sont certainement vraies.

Les CSM sont aussi capables dans certains cas de stimuler la croissance tumorale, sans doute *via* la production de facteurs proangiogéniques. Il a également été mis en évidence un pouvoir immunosuppresseur des CSM sur les lymphocytes B et T qui conduit à une stimulation de la croissance tumorale (Djouad, 2003). Une des questions les plus controversées concerne le pouvoir inhibiteur ou stimulateur des CSM sur la croissance tumorale. Selon l'origine des CSM utilisées, le site de la tumeur et le type de cellules tumorales employées, les résultats varient de l'inhibition de la croissance tumorale à sa stimulation, en passant par une absence d'effet. Les données les plus étonnantes sont celles qui rapportent une absence d'effet sur la croissance tumorale mais le développement de métastases (Karnoub, 2007).

Il n'en reste pas moins que de telles expériences doivent être reproduites avec des souris possédant un système immunitaire intact afin d'intégrer l'ensemble des composantes mises en jeu dans les interactions entre la tumeur et les CSM. Ce dialogue entre ces deux types de cellules est d'autant plus complexe que les cellules cancéreuses peuvent aussi altérer le comportement des CSM en sécrétant une autre chimiokine (CCL2 ; MCP-1) qui accroît alors le pouvoir invasif des CSM (Dwyer, 2007).

De plus, au niveau de l'os, un tissu majeur de colonisation et de développement de métastases dans le cas des cancers du sein et la prostate, les cellules tumorales peuvent stimuler la sécrétion par les CSM d'interleukine-6 (IL-6), un facteur essentiel de prolifération des précurseurs des ostéoclastes (OC), et bloquer la différenciation des CSM en ostéoblastes (OB) par l'expression du facteur de transcription Dkk1 (dickkopf 1, un inhibiteur de Wnt) (Gunn, 2006). La résultante du déséquilibre de l'homéostasie OB/OC favorise la dégradation des matrices osseuses.

À ce jour, il reste encore difficile de savoir si les CSM ont plutôt un rôle bénéfique ou néfaste sur l'évolution des cancers. Il n'en reste pas moins que la capacité des CSM à migrer vers les sites tumoraux pourrait être utilisée dans des stratégies de thérapie cellulaire basées sur l'apport au sein de la tumeur de facteurs anti-angiogéniques et/ou sur l'ingénierie tissulaire pour réparer les tissus détruits.

Les perspectives de ces travaux de thèse sont multiples :

1) Identifier les facteurs moléculaires pro-tumoraux impliqués dans les relations entre les cellules d'ostéosarcome et les adipocytes et/ou les Ad-CSM contenues dans la graisse, afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques du microenvironnement tumoral, en mettant en évidence les cytokines produites et leurs récepteurs qui favorisent le développement tumoral et métastatique.

2) Participer au développement de la thérapie cellulaire anti-cancéreuse en progressant dans la connaissance et l'utilisation des CSM : utilisation comme vecteur stable de molécules anti-tumorales. L'expression d'une substance anti-résorption osseuse (comme l'ostéoprotégérine OPG) ou anti-tumorale (comme le TNF Related Apoptosis-Induced Ligand TRAIL) associée à leur capacité de migration ("homing") vers les processus tumoraux peut conférer un effet anti-cancéreux de premier choix aux CSM.

Dans une étude préliminaire réalisée dans le cadre de ce travail, nous avons testé l'expression *in vivo* d'un agent bloquant la résorption osseuse, l'ostéoprotégérine (OPG), exprimé par des précurseurs ostéoblastiques modifiés *ex vivo* dans un modèle d'ostéosarcome transplanté en para-fémoral. Nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris CCL226 modifiés par des lentivirus pour permettre le transfert stable du transgène codant pour l'OPG. La production d'OPG a été validée par Elisa sur les surnageants. Les résultats ont montré un développement tumoral superposable entre les groupes "CCL226 modifiées pour exprimer l'OPG co-injectées avec les cellules d'ostéosarcome de souris POS-1" et "cellules d'ostéosarcome de souris POS-1 seules". Par contre, un développement tumoral plus important a été observé dans le groupe "CCL226 natives co-injectées avec les cellules d'ostéosarcome de souris POS-1" par rapport au groupe "CCL226 modifiées pour exprimer l'OPG co-injectées avec les cellules d'ostéosarcome de souris POS-1". Ainsi, l'effet pro-tumoral local induit par les CCL226 semblait contre-balancé par la production d'OPG.

3) Evaluer l'innocuité d'une pratique chirurgicale de reconstruction tissulaire (lipomodélage), en particulier dans un contexte post-tumoral. Si l'injection de graisse autologue selon la technique de Coleman est responsable de la récurrence de l'ostéosarcome du cas clinique que nous avons rapporté, il faudra revoir les indications du lipomodélage. Cette technique chirurgicale, dont les chirurgiens plasticiens sont convaincus de la parfaite innocuité en raison en particulier de son caractère autologue, pourrait alors être contre-indiquée dans un contexte post-tumoral.

Les cellules souches mésenchymateuses ont un potentiel thérapeutique réel lié à leur capacité à migrer vers des sites tumoraux, à leur disponibilité dans différents tissus (notamment la graisse) et leurs possibilités de modifications ex vivo pour produire une protéine anti-tumorale. S'il est prudent de s'interroger sur l'innocuité d'interventions qui apportent des cellules souches à proximité de lésions tumorales, nous ne devons pas renoncer à leur utilisation thérapeutique trop rapidement. Si de fait les cellules souches mésenchymateuses ont un rôle primordial dans le développement tumoral, elles représenteront elles-mêmes de nouvelles cibles thérapeutiques et pour cela il nous faut décrypter les processus moléculaires impliqués.

Références bibliographiques

1. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008 Jan;15(2):109-16.
2. Abkowitz JL, Golinelli D, Harrison DE, Guttorp P. In vivo kinetics of murine hemopoietic stem cells. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3399-405.
3. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
4. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol.* 2006 Aug;329(8):570-7; discussion 653-5.
5. Alapetite C, Blay J. Traitement non chirurgicaux des tumeurs des os: chimiothérapie et radiothérapie. *Encycl Méd Chir 7p: 14-702.* 2001.
6. Ando K, Mori K, Redini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol.* 2008 Sep;5(3):263-8.
7. 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 Jul;14(7):1126-34.
8. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, et al. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol.* 2000 Dec 15;18(24):4016-27.
9. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2764-7.
10. Baran CN, Celebioglu S, Sensoz O, Ulusoy G, Civelek B, Ortak T. The behavior of fat grafts in recipient areas with enhanced vascularity. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Apr 15;109(5):1646-51; 52.
11. Bartholomew A, Patil S, Mackay A, Nelson M, Buyaner D, Hardy W, et al. Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. *Hum Gene Ther.* 2001 Aug 10;12(12):1527-41.
12. Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med.* 2002 Jun;2(4):381-92.

13. Behre G, Theurich S, Weber T, Christopeit M. Reply to 'The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rates in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study' by Ning et al. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):178; author reply 9-80.
14. 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 Sep;138(9):3666-76.
15. Belt PJ, Dickinson IC, Theile DR. Vascularised free fibular flap in bone resection and reconstruction. *Br J Plast Surg*. 2005 Jun;58(4):425-30.
16. Bey E, Doucet C, Duhamel P, Brachet M, Prat M, Bargues L, et al. [Radiation burn "innovating therapeutic approach"]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2010 Oct;55(5):354-62.
17. Bey E, Duhamel P, Lataillade JJ, de Revel T, Carsin H, Gourmelon P. [Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases]. *Bull Acad Natl Med*. 2007 Jun;191(6):971-8; discussion 9.
18. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2214-9.
19. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*. 2002 Sep;3(9):565-74.
20. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):776-90.
21. Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007 Apr;16(2):213-22.
22. Blackwell A. Sarcome des tissus mous et ostéosarcomes. *Standard-Options-Recommandations*. 1995.
23. Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum SL. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol*. 1986 Apr;102(4):1164-72.
24. Blancas AA, Lauer NE, McCloskey KE. Endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2008 Sep;Chapter 1:Unit 1F 5.
25. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008 Apr;42(4):606-15.

26. Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct(355 Suppl):S274-82.
27. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Mar;101(3):567-74; discussion 75-6.
28. 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.* 2008b Sep 1;14(17):5400-9.
29. Brounais B, Ruiz C, Rousseau J, Lamoureux F, Blanchard F, Heymann D, et al. Novel anti-cancer strategy in bone tumors by targeting molecular and cellular modulators of bone resorption. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2008a Nov;3(3):178-86.
30. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):278-94.
31. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998a Jul;80(7):985-96.
32. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998b Mar;16(2):155-62.
33. Burguera B, Brunetto A, Garcia-Ocana A, Teijeiro R, Esplen J, Thomas T, et al. Leptin increases proliferation of human osteosarcoma cells through activation of PI(3)-K and MAPK pathways. *Med Sci Monit.* 2006 Nov;12(11):BR341-9.
34. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):579-91.
35. Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone.* 2001 Apr;28(4):351-61.
36. Capasso LL. Antiquity of cancer. *Int J Cancer.* 2005 Jan 1;113(1):2-13.
37. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641-50.
38. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2003;5(1):79-88.

39. Carriere A, Ebrahimian TG, Dehez S, Auge N, Joffre C, Andre M, et al. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jul;29(7):1093-9.
40. Casimiro S, Guise TA, Chirgwin J. The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Oct 30;310(1-2):71-81.
41. Chambers TJ. The regulation of osteoclastic development and function. *Ciba Found Symp.* 1988;136:92-107.
42. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci.* 1985 Jun;76:155-65.
43. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD. Autologous fat transfer--a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008 Dec;61(12):1438-48.
44. Charbord P. Le micro-environnement médullaire chez l'homme normal et pathologique. *Hématologie.* 1998;4(1):29-40.
45. 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 Aug 1;19(15):4111-22.
46. 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 Jun;22(2):77-88.
47. Chavassieux P. Histologie et cytologie de l'os normal. 2003.
48. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R15.
49. Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2000 Jul;184(1):58-69.
50. Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells.* 2004;22(6):1070-84.
51. Chudek J, Wiecek A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep.* 2006;58 Suppl:81-8.
52. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 Jul;73(1):9-15.

53. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg.* 1995 Sep-Oct;19(5):421-5.
54. Coleman SR. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg.* 1997 Apr;24(2):347-67.
55. Coles BL, Angenieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 2;101(44):15772-7.
56. Collin P, Guenther HL, Fleisch H. Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology.* 1992 Sep;131(3):1181-7.
57. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1995 Apr(313):8-18.
58. Connolly JF, Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J.* 1986 Apr;71(4):105-7.
59. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006 Jan 1;107(1):367-72.
60. Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 2002 Nov;175(2):405-15.
61. Cornish J, Costa J, Naot D. The Bone-fat mass relationship : laboratory studies. *IBMS Bone Key* 2009;6(9):311-22.
62. Corre J, Planat-Benard V, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L, Laharrague P. Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells. *Br J Haematol.* 2004 Nov;127(3):344-7.
63. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2009;4(7):e6278.
64. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 2001 Dec 15;98(13):3534-40.
65. Cummine J, Armstrong L, Nade S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. Studies of cellular behaviour using combined myelo-osseous grafts in the subscorbutic guinea pig. *Acta Orthop Scand.* 1983 Apr;54(2):235-41.

66. Cvitkovic E, DJ, Armand J.P. and Khoury S. "Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Scientific Communication International: 221-345. 1993.
67. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006 Nov;24(11):1392-401.
68. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 8;102(10):3766-71.
69. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000 Aug;28(8):875-84.
70. Delay E, Gosset J, Toussoun G, Delaporte T, Delbaere M. [Efficacy of lipomodelling for the management of sequelae of breast cancer conservative treatment]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2008 Apr;53(2):153-68.
71. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M. Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 Dec;4(12):699-710.
72. Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, et al. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2005 May 1;95(1):139-48.
73. Desandes E, Clavel J, Berger C, Bernard JL, Blouin P, de Lumley L, et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer.* 2004 Dec;43(7):749-57.
74. Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol.* 2000 Sep;184(3):319-25.
75. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 2004 Jun;113(12):1701-10.
76. Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 23;345(1):271-9.
77. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plece P, Jorgensen C, Noel D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2006 Oct 27;82(8):1060-6.

78. 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 Nov 15;102(10):3837-44.
79. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005 Nov;205(2):228-36.
80. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207.
81. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Differentiation of osteoblasts from mouse embryonic stem cells without generation of embryoid body. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007 Jan;43(1):21-4.
82. Duteille F, Waast D, Perrot P, Cronier P, Hubert L, Pannier M. [The serratus anterior free flap in limb reconstruction. About 30 cases]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2005 Feb;50(1):71-5.
83. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, et al. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(17):5020-7.
84. Eliopoulos N, Lejeune L, Martineau D, Galipeau J. Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Mol Ther*. 2004 Oct;10(4):741-8.
85. Entz-Werle N, Marcellin L, Gaub MP, Guerin E, Schneider A, Berard-Marec P, et al. Prognostic significance of allelic imbalance at the c-kit gene locus and c-kit overexpression by immunohistochemistry in pediatric osteosarcomas. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2248-55.
86. Entz-Werle 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 Nov 10;117(3):349-55.
87. Fierro FA, Sierralta WD, Epanan MJ, Minguell JJ. Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(4):313-9.
88. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1977 Jul;59(1):221-6.
89. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003 Feb;17(2):474-6.

90. Fouillard L, Chapel A, Bories D, Bouchet S, Costa JM, Rouard H, et al. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):568-70.
91. Francois S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P, Dudoignon N, et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol*. 2007 Jan;86(1):1-8.
92. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90.
93. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987 May;20(3):263-72.
94. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-74.
95. Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Apr(397):40-52.
96. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):66-76.
97. 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 May 3;20(20):2499-513.
98. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol*. 2007 Jul;212(1):207-14.
99. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Feb;20(1):29-41.
100. Gimble JM, Guilak F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol*. 2003;58:137-60.
101. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007 May 11;100(9):1249-60.
102. Gimble JM, Nuttall ME. Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine*. 2004 Mar-Apr;23(2-3):183-8.

103. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):27-35.
104. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 1991 Mar;45(3):292-302.
105. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
106. Gosset J, Flageul G, Toussoun G, Guerin N, Tourasse C, Delay E. [Lipomodelling for correction of breast conservative treatment sequelae. Medicolegal aspects. Expert opinion on five problematic clinical cases]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2008 Apr;53(2):190-8.
107. Gotzos B, Schöni-Affolter F, Celio M. Os compact et spongieux. 2007.
108. Gouin F, Ory B, Redini 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 Sep 1;119(5):980-4.
109. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood.* 1994 Dec 15;84(12):4164-73.
110. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
111. Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology.* 1999 Jul;30(1-3):211-26.
112. Guinebretière JM LCA, Le péchoux C, Missenard G, Bonvalot S, Terrier P and Vanel D. Ostéosarcome de forme commune. *Encycl Méd Chir* 13p: 14-704. 2001.
113. Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):986-91.
114. Hadjiargyrou M, Rightmire EP, Ando T, Lombardo FT. The E11 osteoblastic lineage marker is differentially expressed during fracture healing. *Bone.* 2001 Aug;29(2):149-54.
115. Hall PA. What are stem cells and how are they controlled? *J Pathol.* 1989 Aug;158(4):275-7.

116. Hauben EI, Arends J, Vandenbroucke JP, van Asperen CJ, Van Marck E, Hogendoorn PC. Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet.* 2003 Aug;11(8):611-8.
117. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem.* 1986 Sep 25;261(27):12665-74.
118. Heath C, Cross NC. Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):6666-73.
119. Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, Murali R, et al. An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res.* 2007 Jan 1;67(1):202-8.
120. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20.
121. Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res.* 2004 Sep;19(9):1379-94.
122. Hernigou P, Beaujean F. [Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1997;83(6):495-504.
123. Hertel R, Gerber A, Schlegel U, Cordey J, Ruegsegger P, Rahn BA. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report. *Injury.* 1994;25 Suppl 1:A59-70.
124. Heymann D, Delecrin J, Deschamps C, Gouin F, Padrines M, Passuti N. [In vitro assessment of combining osteogenic cells with macroporous calcium-phosphate ceramics]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 2001 Feb 1;87(1):8-17.
125. Heymann D, Lepreux S. *Histologie - Bases fondamentales*: OmniScience; 2008.
126. Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod.* 1998 May;25(2):101-7.
127. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar(324):55-65.
128. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):200-9.
129. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res.* 1987;5(1):114-21.

130. Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res.* 1977 Mar-Apr(123):177-96.
131. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
132. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
133. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):309-13.
134. 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 Nov;139(11):4743-6.
135. Housa D, Housova J, Vernerova Z, Haluzik M. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res.* 2006;55(3):233-44.
136. 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 U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3540-5.
137. Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res.* 1994 Jan;9(1):39-44.
138. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* 2005 Nov 1;11(21):7749-56.
139. 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 Jun;1(8):601-10.
140. Inoue K, Ohgushi H, Yoshikawa T, Okumura M, Sempuku T, Tamai S, et al. The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histological analysis. *J Bone Miner Res.* 1997 Jun;12(6):989-94.

141. 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 Dec;32(6):1370-6.
142. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312.
143. Jamal HH, Aubin JE. CD44 expression in fetal rat bone: in vivo and in vitro analysis. *Exp Cell Res*. 1996 Mar 15;223(2):467-77.
144. Jasmin C, Allouche M, Jude JG, Klein B, Thiery JP, Perdereau B, et al. [An experimental model of osteosarcomas in rats]. *Sem Hop*. 1982 Jul 8;58(28-29):1684-9.
145. Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells*. 2005 Apr;23(4):584-93.
146. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
147. Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, et al. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology*. 1996 Aug;137(8):2187-90.
148. Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res*. 1996 May;14(3):351-69.
149. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006 Mar 30;440(7084):692-6.
150. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997 Mar-Apr;6(2):125-34.
151. Kalifa C, Brugieres L, Le Deley MC. [Neoadjuvant treatment in osteosarcomas]. *Bull Cancer*. 2006 Nov 1;93(11):1115-20.
152. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557-63.

153. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000 Feb;6(2):572-7.
154. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2006 Nov;13(6):419-25.
155. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1235-47.
156. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5050-5.
157. Kingsley LA, Chirgwin JM, Guise TA. Breaking new ground to build bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26;104(26):10753-4.
158. Klein S, Wadden T, Sugerman HJ. AGA technical review on obesity. *Gastroenterology.* 2002 Sep;123(3):882-932.
159. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Jan;36(1):1-8.
160. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000 Jan;18(2):307-16.
161. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol.* 1999 Apr;156(2):333-44.
162. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb;15(1):49-60.
163. 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 Apr 17;93(2):165-76.
164. Lakkakorpi PT, Vaananen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb 1;33(2):171-81.
165. Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays.* 2007b Aug;29(8):758-71.

166. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, Charrier C, et al. Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther.* 2008 Oct;7(10):3389-98.
167. 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.* 2007a Aug 1;67(15):7308-18.
168. Land C, Rauch F, Munns CF, Sahebjam S, Glorieux FH. Vertebral morphometry in children and adolescents with osteogenesis imperfecta: effect of intravenous pamidronate treatment. *Bone.* 2006 Oct;39(4):901-6.
169. Lane JM, Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, et al. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Apr(361):216-27.
170. Larghero J, Vija L, Lecourt S, Michel L, Verrecchia F, Farge D. [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. *Rev Med Interne.* 2009 Mar;30(3):287-99.
171. Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, et al. New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med.* 2007 Sep;2(5):785-94.
172. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* 2005 Feb 10;433(7026):647-53.
173. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Oct;16(4):557-64.
174. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 May;11(5):389-98.
175. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008 May 10;371(9624):1579-86.

176. Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1607-14.
177. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439-41.
178. Lee OK, Coathup MJ, Goodship AE, Blunn GW. Use of mesenchymal stem cells to facilitate bone regeneration in normal and chemotherapy-treated rats. *Tissue Eng*. 2005 Nov-Dec;11(11-12):1727-35.
179. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669-75.
180. Levenberg S, Zoldan J, Basevitch Y, Langer R. Endothelial potential of human embryonic stem cells. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):806-14.
181. Lidagoster MI, Cinelli PB, Levee EM, Sian CS. Comparison of autologous fat transfer in fresh, refrigerated, and frozen specimens: an animal model. *Ann Plast Surg*. 2000 May;44(5):512-5.
182. Lin CY, Chang YH, Lin KJ, Yen TC, Tai CL, Chen CY, et al. The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010 Apr;31(12):3222-30.
183. 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 Jun 16;91(12):1051-8.
184. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*. 1986 Jun 19;314(25):1600-6.
185. Lobo Gajiwala A, Agarwal M, Puri A, D'Lima C, Duggal A. The use of irradiated allografts in reconstruction of tumor defects - the tata memorial hospital experience. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(2-4):125-32.
186. Lopez-Guerrero JA, Lopez-Gines C, Pellin 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 Jun;13(2):81-91.
187. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, Chen Y, Moore MA, Grant MB, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2007 Jun;4(6):501-9.

188. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res.* 2006 Oct;21(10):1648-56.
189. Lynch HT, Deters CA, Hogg D, Lynch JF, Kinarsky Y, Gatalica Z. Familial sarcoma: challenging pedigrees. *Cancer.* 2003 Nov 1;98(9):1947-57.
190. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(5):697-705.
191. Malaval L, Chenu C, Delmas PD. Protéine de l'os : maladies systémiques osseuses de l'adulte. . 1996.
192. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37.
193. Marie P. BMPs et réparation osseuse. Intérêt des facteurs de croissance dans la réparation osseuse. 3e réunion conjointe du comité d'interface INSERM-ORTHOPEDIE : 74e réunion annuelle de la SOFCOT. Novembre 1999.
194. Marie PJ. *Human Anatomy and Physiology*, 4TH edition edn. 1998.
195. Markey AC, Glogau RG. Autologous fat grafting: comparison of techniques. *Dermatol Surg.* 2000 Dec;26(12):1135-9.
196. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-8.
197. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000 Jun;45(3):346-53.
198. Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M. Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology.* 1999 Aug;140(8):3736-43.
199. McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing BH. Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer.* 1971 Feb;27(2):397-402.
200. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):129-31.
201. Meyer T, Begitt A, Lodige I, van Rossum M, Vinkemeier U. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 2002 Feb 1;21(3):344-54.

202. Micklem HS, Lennon JE, Ansell JD, Gray RA. Numbers and dispersion of repopulating hematopoietic cell clones in radiation chimeras as functions of injected cell dose. *Exp Hematol*. 1987 Mar;15(3):251-7.
203. Milne CD, Fleming HE, Zhang Y, Paige CJ. Mechanisms of selection mediated by interleukin-7, the preBCR, and hemokinin-1 during B-cell development. *Immunol Rev*. 2004 Feb;197:75-88.
204. Miyaoka K, Iwase M, Suzuki R, Kondo G, Watanabe H, Ito D, et al. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. *J Surg Res*. 2005 May 15;125(2):144-50.
205. Moalic V, Mercier B, Ferec C. Luminex technology : technical approach, applications and future prospects. *Immunoanalyse et biologie spécialisée*. 2004;19:181-7.
206. Mojallal A, Saint-Cyr M, Garrido I. Autologous fat transfer: controversies and current indications for breast surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009 May;62(5):708-10.
207. Moore DC, Chapman MW, Manske D. The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *J Orthop Res*. 1987;5(3):356-65.
208. Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche MC, Charbord P, Banchereau J, et al. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood*. 1993 Oct 15;82(8):2396-405.
209. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4432-6.
210. Mosende C, Gutierrez M, Caparros B, Rosen G. Combination chemotherapy with bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin for the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1977 Dec;40(6):2779-86.
211. Motrescu ER, Rio MC. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*. 2008 Aug 8.
212. Mourcin F, Grenier N, Mayol JF, Lataillade JJ, Sotto JJ, Herodin F, et al. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34(+) cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. *Radiat Res*. 2005 Jul;164(1):1-9.
213. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. 2009 Apr;30(4):589-97.

214. Murakami N, Saito N, Takahashi J, Ota H, Horiuchi H, Nawata M, et al. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2153-9.
215. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 18;253(2):395-400.
216. Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation*. 1998 Aug;63(4):193-200.
217. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3307-18.
218. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*. 2004 Jul;11(14):1155-64.
219. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008 Mar;22(3):593-9.
220. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope*. 2000 Aug;110(8):1333-8.
221. 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 Oct 15;59(20):5059-63.
222. Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*. 2008 Apr 15;314(7):1575-84.
223. Nury D, Neri T, Puceat M. Human embryonic stem cells and cardiac cell fate. *J Cell Physiol*. 2009 Mar;218(3):455-9.
224. O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Dec;18(6):853-75.
225. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*. 2004 May;84(5):607-17.

226. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res.* 1989;7(4):568-78.
227. Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S, Koerten HK, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res.* 1997 Oct;37(1):122-9.
228. Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 3;331(2):520-6.
229. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:63-76.
230. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42-60.
231. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 2007 Jan 29;176(3):329-41.
232. Pace JM, Wiese M, Drenguis AS, Kuznetsova N, Leikin S, Schwarze U, et al. Defective C-propeptides of the proalpha2(I) chain of type I procollagen impede molecular assembly and result in osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):16061-7.
233. Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology.* 1998 Jun;139(6):2659-61.
234. Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.* 1986;246(1):125-31.
235. Papachristou DJ, Batistatou A, Sykiotis GP, Varakis I, Papavassiliou AG. Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone.* 2003 Apr;32(4):364-71.
236. Payement G, Therin M, Dansard C, Delay E. [Osteogenic capacity of a vascularized periosteal flap tubulized around a coral implant. Experimental study on sheep]. *Ann Chir Plast Esthet.* 1996 Dec;41(6):651-9.
237. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liao DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11581-6.
238. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 30;105(52):20764-9.

239. Perrot P, Heymann D, Charrier C, Couillaud S, Redini F, Duteille F. Extrasosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat. *Ann Plast Surg.* 2007 Aug;59(2):201-6.
240. Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Redini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One.* 2010;5(6):e10999.
241. Petersen MM, Hovgaard D, Elberg JJ, Rechnitzer C, Daugaard S, Muhic A. Vascularized fibula grafts for reconstruction of bone defects after resection of bone sarcomas. *Sarcoma.* 2010;2010:524721.
242. Philip T BJ, Brunat-Mentigny M, Carrie C, Chauvot P, and Farsi F,. Standards, options, recommandations (SOR) pour le diagnostic, le traitement et la surveillance de l'ostéosarcome. *Bull Cancer* 86: 159-176. 2000.
243. 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 Apr 15;16(8):2363-74.
244. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
245. Ponten J, Saksela E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer.* 1967 Sep 15;2(5):434-47.
246. Por YC, Barcelo CR, Salyer KE, Genecov DG, Troxel K, Gendler E, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008 Mar;19(2):383-92.
247. Prat-Vidal C, Roura S, Farre J, Galvez C, Llach A, Molina CE, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2434-7.
248. Puceat M, Ballis A. Embryonic stem cells: from bench to bedside. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Sep;82(3):337-9.
249. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* 2008 Apr;18(4):500-7.
250. Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* 2008 Sep 28;269(1):67-77.

251. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.
252. Quarto R, Thomas D, Liang CT. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int*. 1995 Feb;56(2):123-9.
253. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2006 Jul 15;312(12):2169-79.
254. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 2004 Apr 24;363(9418):1377-85.
255. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292-8.
256. Reid IR. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int*. 2008 May;19(5):595-606.
257. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008 Feb 16;371(9612):569-78.
258. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*. 1973 Dec;33(12):3231-8.
259. Rieck B, Schlaak S. Measurement in vivo of the survival rate in autologous adipocyte transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Jun;111(7):2315-23.
260. Rieck B, Schlaak S. In vivo tracking of rat preadipocytes after autologous transplantation. *Ann Plast Surg*. 2003 Sep;51(3):294-300.
261. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006 May 27;81(10):1390-7.
262. Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005 Oct-Dec;5(4):325-7.
263. Rizzo R, Campioni D, Lanza F, Baricordi OR. Cotransplantation of mesenchymal cells and a higher relapse rate: a role for HLA-G molecules? *Leukemia*. 2008 Dec;22(12):2273.

264. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(4):349-51.
265. Romana MC, Masquelet AC. Vascularized periosteum associated with cancellous bone graft: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Apr;85(4):587-92.
266. Rousseau J, Escriou V, Perrot P, Picarda G, Charrier C, Scherman D, et al. Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models. *Cancer Gene Ther.* 2010 Jun;17(6):387-97.
267. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone.* 2002 Apr;30(4):533-40.
268. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med.* 2006 Nov;12(11):1259-68.
269. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3035-9.
270. Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, et al. Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res.* 2000 Aug;15(8):1440-50.
271. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87(1):1-5.
272. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep;17(9):2443-56.
273. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000 Aug;164(2):247-56.
274. 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 Aug;145(1):1-30.
275. Schajowicz F. "Histological typing of bone tumor" Springer-Verlag(2nd ed):10-13 1993.
276. Schulze E, Witt M, Kasper M, Lowik CW, Funk RH. Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8. *Histochem Cell Biol.* 1999 Jan;111(1):61-9.

277. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002 May;109(10):1291-302.
278. Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S7.
279. Sell H, Deshaies Y, Richard D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Nov;36(11):2098-104.
280. Sengenès C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumie A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005 Oct;205(1):114-22.
281. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, et al. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006 Sep 1;99(1):196-208.
282. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Oct;19(5):444-51.
283. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441:1060.
284. Smith GJ, Bell WN, Grisham JW. Clonal analysis of the expression of multiple transformation phenotypes and tumorigenicity by morphologically transformed 10T1/2 cells. *Cancer Res*. 1993 Feb 1;53(3):500-8.
285. Stagg J. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev*. 2008 Summer;4(2):119-24.
286. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther*. 2004 Jun;15(6):597-608.
287. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2570-7.
288. Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest*. 1997 May;76(5):717-28.
289. Steindler DA, Pincus DW. Stem cells and neurogenesis in the adult human brain. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1047-54.
290. 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 Mar;7(3):329-30.

291. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002 Jul 1;62(13):3603-8.
292. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev.* 1992 Feb;13(1):66-80.
293. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):345-57.
294. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone.* 1995 Aug;17(2 Suppl):87S-91S.
295. Sun T, Sun BC, Ni CS, Zhao XL, Wang XH, Qie S, et al. Pilot study on the interaction between B16 melanoma cell-line and bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 2008 May 8;263(1):35-43.
296. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, et al. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone.* 2004 Oct;35(4):828-35.
297. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta.* 2001 Nov;313(1-2):95-105.
298. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology.* 1988 Nov;123(5):2600-2.
299. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002 Nov 1;111(3):305-17.
300. Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res.* 1998 Oct;13(10):1555-68.
301. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.* 2006 Aug;12(8):939-44.
302. 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 Nov 6;282(5391):1145-7.

303. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*. 1995 Dec;18(12):1153-8.
304. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007 Feb;25(2):371-9.
305. Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Méd Vét* 2004;148:1-13.
306. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, et al. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2001 Nov;16(11):2017-26.
307. Trippel SB. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct(355 Suppl):S301-13.
308. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 2000 Mar 17;287(5460):2032-6.
309. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci*. 1998;3(6):346-55.
310. Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett*. 2000 Jul 31;155(2):169-72.
311. Unni K. *Dahlin's bone tumors*. ed t, editor: Philadelphia : Lippincott-Raven; 1996.
312. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003 Oct;9(10):1269-74.
313. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Jun;16(3):319-27.
314. Varani J, Lovett EJ, 3rd, Lundy J. A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery. *J Surg Oncol*. 1981;17(1):9-14.
315. Vickaryous MK, Hall BK. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2006 Aug;81(3):425-55.
316. Villanueva EC, Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S8-12.

317. Vogelin MDE, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jan;109(1):190-8.
318. Vona-Davis L, Rose DP. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Jun;20(3):193-201.
319. Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y, et al. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):3042-8.
320. Walkup MH, Gerber DA. Hepatic stem cells: in search of. *Stem Cells*. 2006 Aug;24(8):1833-40.
321. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009 Jul 30;28(30):2745-55.
322. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70.
323. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, et al. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*. 2000 Oct;15(10):1879-88.
324. Westerlund U, Moe MC, Varghese M, Berg-Johnsen J, Ohlsson M, Langmoen IA, et al. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp Cell Res*. 2003 Oct 1;289(2):378-83.
325. Williams GA, Wang Y, Callon KE, Watson M, Lin JM, Lam JB, et al. In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3603-10.
326. Wittrant Y, Theoleyre 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 Sep 20;1704(2):49-57.
327. Wolff D, Goldberg VM, Stevenson S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res*. 1994 May;12(3):439-46.
328. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Jan(346):26-37.
329. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5545-55.

330. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 2009 Aug 18;281(1):32-41.
331. Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Martinez Argueta JG, Saito T, Hanazawa S, et al. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Feb;49(1):28-34.
332. Yamamoto M, Cui L, Johkura K, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, et al. Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Jan;290(1):F52-60.
333. Yamasaki T, Yasunaga Y, Ishikawa M, Hamaki T, Ochi M. Bone-marrow-derived mononuclear cells with a porous hydroxyapatite scaffold for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a preliminary study. *J Bone Joint Surg Br.* 2010 Mar;92(3):337-41.
334. Yan MN, Dai KR, Tang TT, Zhu ZA, Lou JR. Reconstruction of peri-implant bone defects using impacted bone allograft and BMP-2 gene-modified bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Apr;93(1):304-13.
335. 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 U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3597-602.
336. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1195-201.
337. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2714-22.
338. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 1996 Nov;32(3):481-92.
339. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008 Jan;32(1):48-55; discussion 6-7.
340. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.* 2008 Jan;42(1):172-9.
341. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 2008 Jun;17(3):463-73.

342. Zeng R, Aoki Y, Yoshida M, Arai K, Watanabe S. Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4567-75.
343. Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7883-90.
344. Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, et al. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol.* 2006 Jun;26(12):4539-52.
345. Zhang X, Blenis J, Li HC, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science.* 1995 Mar 31;267(5206):1990-4.
346. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
347. Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res.* 2002 Nov;17(11):2068-79.
348. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia.* 2009 May;23(5):925-33.

Annexes

Article 1

Perrot P, Heymann D, Charrier C, Couillaud S, Rédini F, Duteille F.

Extraosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat.

Ann Plast Surg. 2007 Aug;59(2):201-6.

Extrasosseous Bone Formation Obtained by Association of Mesenchymal Stem Cells With a Periosteal Flap in the Rat

Pierre Perrot, MD,*†‡, Dominique Heymann, PhD,*†, Céline Charrier,*†, Séverine Couillaud,*†, Françoise Rédini, PhD,*† and Franck Duteille, MD*†‡

Background: Local bone cell therapy consists in grafting a large number of osteocompetent cells in the bone defect. Mesenchymal stem cells (MSC) have been demonstrated as an attractive cell source for tissue-engineering applications because of their ability to be easily isolated and expanded from adult bone marrow and their versatility for pluripotent differentiation into mesenchymal tissues.

Methods: The purpose of our work was to evaluate in vitro the osteogenic potential (proliferation and differentiation) of rat MSC cultured in monolayer conditions and encapsulated in alginate beads and in vivo the osteogenic potential of encapsulated MSC implanted at an extrasosseous site associated with a periosteal flap to obtain the equivalent of a vascularized bone autograft.

Results: In vitro, the encapsulation of MSC in alginate beads maintains their degree of differentiation towards the osteoblastic lineage. In vivo, standard radiographs revealed “calcifications” adjacent to the area where alginate beads had been implanted in both groups (in the presence or the absence of MSC). In the group “beads alone,” histologic analysis showed that calcifications reflected only a peripheral calcification with no bone formation. On the contrary, in the group “beads + MSC,” a large mineralization process took place characterized by lamellar mature bone with osteocytes after 10 weeks.

Key Words: bone reconstruction, mesenchymal stem cells, periosteal flap

(*Ann Plast Surg* 2007;59: 201–206)

The filling of bone defects resulting from trauma and surgical resections of tumors requires bone grafts or bone substitutes. The surgical techniques currently available for bone grafts are 1) nonvascularized autografts (spongy bone, cortical bone) or vascularized autografts (Masquelet technique,¹ free flap associated with osseous components^{2,3}); and

2) allografts obtained from the heads of femurs of operated patients or massive allografts⁴ in the form of whole bones (pelvis, femur, tibia) obtained from multiorgan donors.

Autogenous bone grafts are ideal in terms of tolerance, mechanical properties, and quality of new bone forming, but their use is limited by the morbidity at the donor site and the small volume available. Allogeneous grafts are still used for massive bone defects, but they can expose patients to viral contaminations and complications, such as infections or fractures. In this context, new clinical techniques associating osteoprogenitors (osteogenic source), extracellular calcified or noncalcified matrix (osteoconductive support) and osteoinductors (growth factors, vascularized flap) appear to be suitable alternatives to bone grafts. Bone marrow contains various cellular populations involved in both bone homeostasis and renewal of peripheral mature blood cells. Thus, in addition to osteoprogenitors, bone marrow contains various mesenchymal cells, including fibroblasts, lipocytes, endothelial cells, smooth muscle cells, or reticular cells. Bone marrow mesenchymal stem cells (MSC),⁵ through their great capacity to proliferate and to differentiate into bone competent cells, are particularly suitable but need to be associated with a scaffold material to constitute a substitute for bone autograft.

The purpose of our work was to evaluate in vitro the osteogenic potential (proliferation and differentiation) of rat MSC cultured in monolayer conditions and encapsulated in alginate beads and in vivo the osteogenic potential of encapsulated MSC implanted at an extrasosseous site associated with a periosteal flap to obtain the equivalent of a vascularized bone autograft.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Culture of MSC

MSC were isolated from the bone marrow of 6-week-old male consanguineous Lewis rats (LEW/Orl@Rj strain, Janvier, Le Genest Saint Isle, France). After anesthetization and cervical dislocation, femurs and tibias were dissected aseptically and cleaned of soft tissues. Bone marrow cells were then flushed out with a syringe fitted with a 22-gauge needle containing Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Biowhittaker, Verviers, Belgium) with 1% antibiotic mixture (penicillin 100 U/mL and Streptomycin 100 mg/L; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). A single cell suspension was prepared with a 5-mL pipette, centrifuged for 5 minutes at 400g at room temperature, then resuspended in

Received June 28, 2006, and accepted for publication, after revision, October 17, 2006.

From the *INSERM, Nantes, France; †Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes, France; and the ‡Hospital, Department of Plastic Surgery, Burn Center, Hôpital Jean Monnet, Nantes, France.

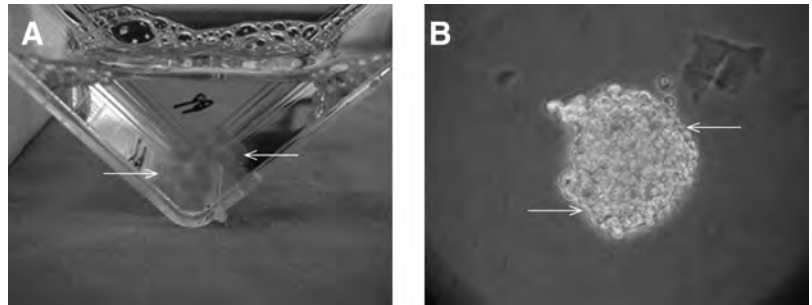
Reprints: Pierre Perrot, MD, INSERM ERI 7, Nantes, F-44035 France. E-mail: pierre.perrot@chu-nantes.fr.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0148-7043/07/5902-0201

DOI: 10.1097/SAP.0b013e31802c1ff2

FIGURE 1. Mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. After 2 weeks of culture in monolayer conditions, MSC were encapsulated in isotonic 1.2% (wt/vol) alginate microspheres prepared in NaCl solution and polymerized in contact with CaCl₂ solution. A, Macroscopic view at day 10 (alginate microspheres: white arrows); B, phase-contrast light microscopic view at day 17, original magnification $\times 25$, MSC: white arrows.



10 mL of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone Perbio, Logan, UT) and 1% antibiotic mixture, and seeded in 2 25-cm² flasks. After 24 hours of culture, the supernatant containing the nonadherent hematopoietic cells was removed, and the adherent MSC were maintained in culture at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Encapsulation of MSC in Alginate Beads

After 2 weeks of culture in monolayer conditions, MSC were cultured in tridimensional conditions and were then encapsulated in alginate microspheres. An isotonic 1.2% (wt/vol) alginate solution was prepared by dissolving powdered alginate in physiologic saline (0.85% NaCl, Hespes 20 mM), a solution that aids in the creation of homogeneous gel beads. MSC cells were harvested from monolayer cultures using 0.05% trypsin–0.02% EDTA (Sigma, St. Louis, MO) and suspended in the sodium alginate solution at a density of 5×10^6 cells/mL alginate. Viable cell counts prior to encapsulation were performed using the trypan blue (Sigma) exclusion method and were found to be >95% viable. The drops (cells resuspended in alginate) were obtained using a 1.000- μ L pipette over a CaCl₂ solution (1.5% in Hespes, 13 mM from a 100-mM CaCl₂ solution) cross-linking the alginate (Fig. 1A, B). The volume of each bead was 25 μ L. After 20 minutes of polymerization at 37°C, successive washes

were performed, first with CaCl₂, twice with Earle's balanced salt solution (EBSS; Sigma), and second with DMEM containing 1% antibiotic mixture. The beads containing the rat MSC were cultured in DMEM complemented with 10% FCS and 1% antibiotics and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Beads used for the in vivo experiments were extemporaneously prepared before their implantation.

RNA Extraction and Semiquantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

To characterize the differentiation state of MSC, the expression of several osteoblastic markers, including bone alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), bone sialoprotein (BSP), and bone formation regulators (osteoprotegerin, OPG; and receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL), was analyzed by RT-PCR. Total RNA was extracted from frozen monolayer MSC and MSC encapsulated in alginate using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by measuring OD₂₆₀, and integrity was checked by 1% agarose/formaldehyde gel electrophoresis. RNA samples were then treated with DNase I (0.1 U/ μ g) before the reverse-transcription step to exclude the possibility of interference with contaminating genomic

TABLE 1. Rat Oligonucleotide Primers Used for RT-PCR

Molecule	Primers	Strand	Size (bp)	Conditions: (T _m ; Cycle Number)
18 S	TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG	+	462 pb	62°C 25 Cycles
	TTATTGCTCAATCTCGGGTGGCTG	–		
OC	CATGAGGACCCTCTCTCTGC	+	302 pb	60°C 40 Cycles
	CCTAAACGGTGGTGCCATAG	–		
BSP	ATGGAGATGGCGATAGTTTCG	+	439 pb	60°C 40 Cycles
	GTTCTTCTGCACCTGCTTC	–		
PAL	CCTTTGTGGCTCTCTCCAAG	+	451 pb	60°C 40 Cycles
	CTGGCCTTCTCATCCAGTTC	–		
RANKL	ACAGCGCTTCTCAGGAGTTC	+	465 pb	60°C 40 Cycles
	TGGACGCTAATTCCTCACC	–		
OPG	TGAGACGTCATCGAAAGCAC	+	476 pb	60°C 40 Cycles
	CGTCTGGGCTGATCTTCTTC	–		

Primers are presented in a 5' to 3' orientation, with that for the coding strand (+) and the non-coding strand (–). T_m and cycle number corresponding to the linear part of the amplification curve used to quantify the messages versus the 18S signal determined in the same way.

OC indicates osteocalcin; BSP, bone sialoprotein; PAL, phosphatase alkaline; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B ligand; OPG, osteoprotegerin.

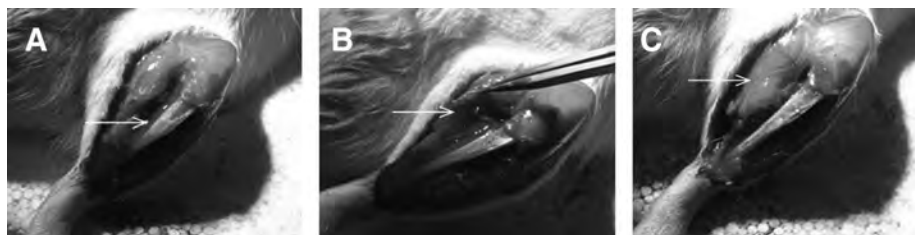


FIGURE 2. Experimental rat periosteal flap model. Experimental periosteal flap model was performed in 6-week-old male consanguineous Lewis rats. The rats were placed in dorsal decubitus under isoflurane anesthesia. After the left hind leg was shaved and local antiseptic applied, the protocol included 3 steps: A, incision above the tibial crest (white arrows); B, dissection between bone and periosteum, (musculoperiosteal flap: white arrows); C, suture of the musculoperiosteal flap (white arrows).

DNA. First, 5 μ g RNA was reverse-transcribed using 400 U murine Moloney leukemia virus-reverse transcriptase (Invitrogen). To determine the expression of ALP, OC, BSP, OPG, RANKL, and 18S, 2 μ L of the RT reaction mixture was subjected to PCR using upstream and downstream primers (30 pmol each; Table 1) and 0.25 μ L of 5 U/ μ L *Taq* polymerase (Eurobio, Les Ulis, France). The cycle values corresponding to the linear part of the amplification curve were determined by increasing the number of PCR cycles. PCR products were then analyzed in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and photographed.

Mineralization Assay

After 1 week of culture in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% antibiotics, 50 μ g/mL ascorbic acid, and 10^{-8} M dexamethasone, adherent or encapsulated MSC were then cultured in the presence of 10 mM β -glycerophosphate for 2 weeks. Alizarin red staining was then used to detect the mineralized nodules formed *in vitro*⁶: the MSC were washed in Dulbecco phosphate-buffered saline and fixed with a cold 70% ethanol solution for 1 hour. The ethanol was then removed, and the fixed cells were washed with distilled water and incubated with alizarin red (40 mM, pH 7.4) for 10 minutes at room temperature. After extensive washing, cells were observed under light microscopy.

Rat Periosteal Flap Model

Six-week-old male consanguineous Lewis rats (LEW/Orl@Rj strain) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Medicine Faculty of Nantes, France) in accordance to the institutional guidelines of the French Ethical Committee. For the encapsulated MSC implantation, the rats were placed in dorsal decubitus under isoflurane anesthesia (Forène; Abbott)/air (1.5%, 1 L/min). After the left hind leg was shaved and local antiseptic applied, the protocol included 3 steps: 1) incision above the tibial crest down to the bone plane (Fig. 2A); 2) dissection between bone and periosteum to obtain a musculoperiosteal flap vascularized by the great saphenous pedicle (Fig. 2B); and 3) insertion of 5 alginate beads (with and without MSC) and suture of the flap to enclose them next to the vascularized periosteum (Fig. 2C).

Two series of 10 rats received implants composed of alginate beads alone or alginate beads + MSC, respectively. Animals were killed at week 10 for radiographic and histologic studies.

RESULTS

The encapsulation of MSC in alginate beads maintains their degree of differentiation towards the osteoblastic lineage.

Semi-quantitative RT-PCR studies of osteoblastic differentiation markers were performed to determine the differentiation state of the MSC cultured in monolayer conditions and encapsulated in alginate beads. In monolayer conditions, no significant variations of MSC phenotype were observed between D0 and D5. After D5, the intensity of expression of OC (early marker of osteoblastic differentiation) and BSP (late marker of osteoblastic differentiation) increased until day 10 and then gradually decreased until day 17 (Fig. 3). Similar results were obtained for OPG and RANKL, which appeared to be good markers of MSC differentiation towards the osteoblastic lineage. In contrast to OC, BSP, RANKL, and OPG, the expression of ALP was not modulated during the culture period. Thus, the differentiation level of adherent monolayer MSC increased from days 5 to 10 and then gradually decreased up to day 17 (Fig. 3). Similar analyses were performed in MSC encapsulated in alginate beads (Fig. 3). In these conditions, the differentiation level was main-

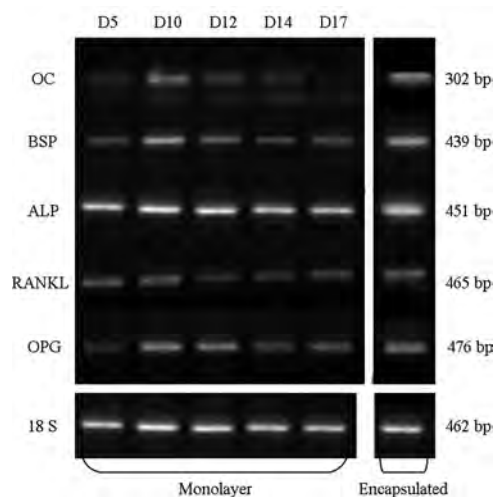


FIGURE 3. Follow-up by semiquantitative RT-PCR of the differentiation state of MSC in monolayer culture (at days 5, 10, 12, 14, and 17) or encapsulated in alginate beads (at day 17). The relative mRNA levels were determined according to the PCR conditions presented in Table 1.

FIGURE 4. Mineralization nodules visualized by alizarin red staining at day 21. MSC were cultured in monolayer condition or encapsulated alginate beads according the procedure described in the Materials and Methods. After 2 weeks of culture with β -glycerophosphate, alizarin red staining was used to detect the mineralized nodules (white arrow) formed in vitro. A, Adherent MSC in a monolayer (original magnification $\times 50$); B, MSC encapsulated in alginate beads (original magnification $\times 25$).

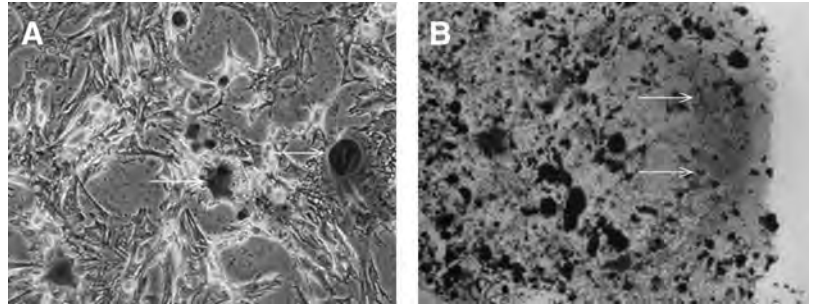
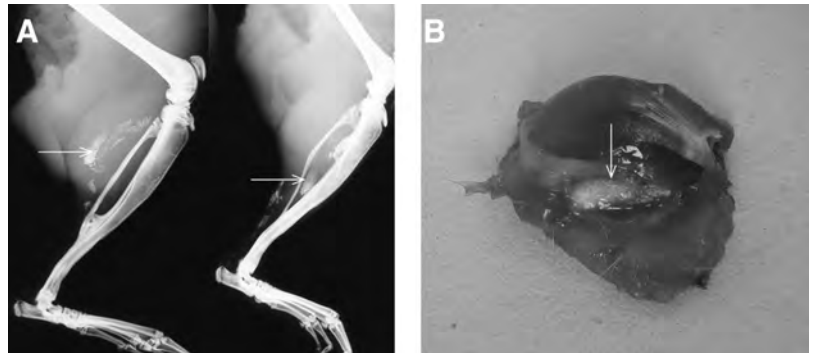


FIGURE 5. Calcifications adjacent to the bead implantation area (white arrows). Alginate beads with or without encapsulated MSC were extemporaneously prepared and implanted for 10 weeks in a musculoperiosteal flap (10 rats per series). A, Representative radiographs performed after 10 weeks of implantation; B, macroscopic view of alginate beads associated with MSC.



tained from day 10 to 17 (Fig. 3), and no dedifferentiation of cultured MSC in beads was observed after day 10. Thus, the 3-dimensional environment within beads keeps the MSC differentiation level towards the osteoblastic lineage. To strengthen these data, osteoblastic differentiation was followed by the capacity of MSC to form mineralized nodules, which were visualized by alizarin red staining. In both conditions studied, monolayers (Fig. 4A) or encapsulated (Fig. 4B) MSC were able to induce the formation of mineralized nodules, thereby confirming their osteoblastic phenotype. The experiments demonstrated that MSC encapsulated in alginate beads conserve their capacity to mineralize.

Standard radiographs reveal “calcifications” within the periosteal flap in both groups: “beads alone” and “beads + MSC,” and histologic analyses demonstrate differences between the 2 groups.

In both groups (in the presence or the absence of MSC), standard radiographs revealed “calcifications” adjacent to the area where alginate beads have been implanted (Fig. 5A). Samples for histologic analysis were obtained from these calcifications (Fig. 5B). In the group “beads alone,” histologic analyses showed that calcifications reflected only a peripheral calcification (Fig. 6A), with no bone formation (Fig. 7A). On the contrary, in the group “beads + MSC,” a large mineralization process took place (Fig. 6B), characterized by lamellar mature bone with osteocytes (Fig. 7B).

DISCUSSION

The cell sources usable in bone reconstructions are essentially nonfractionated or fractionated fresh bone marrow, MSCs, and osteoblasts. Friedenstein et al⁵ provided the first evidence for the existence of bone tissue progenitor cells

in marrow since it differentiated to form ossicle in association with active hematopoietic tissue when grafted under the kidney capsule. In vivo, human and animal MSC have differentiated into osteogenic cells, giving bonelike tissues. Nonfractionated fresh bone marrow was therefore the first cell source exploited in this research area.⁷⁻⁹ Subsequently, some authors used different procedures to fraction fresh bone marrow,^{10,11} but the clinical practice procedures include intraoperative centrifugation of the marrow samples. A trocar is used to obtain a sample (around 300 cm³) from both iliac crests. Centrifugation then allows concentration of only nucleated cells, but not to select a population of osteoprogenitor cells, which are locally reinjected. Despite the success of this procedure,^{12,13} the main limitation of this technique is the low amount of bone marrow harvested, and thus whether one will obtain enough osteoprogenitor cells to increase local new bone formation. Indeed, bone marrow contains only 0.001% to 0.01% of cells (MSC) able to differentiate into the osteoblastic lineage.¹⁴

For the last 10 years, several teams have considered the possibility of using MSC from bone marrow as a source of competent cells for bone reconstruction. These MSC possess a high proliferation rate and then can be easily amplified in vitro. Depending on culture conditions, they can differentiate into osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, or myoblasts.^{15,16} In fact, the bone marrow MSC must be considered as pluripotent stem cells as demonstrated by Pittenger et al.¹⁷ It has also been shown that adult stem cells derived from other tissues (epithelial,¹⁸ adipose,^{19,20} muscle,²¹ hematopoietic²²) are able to transdifferentiate into osteoblastic lineage, although these data remain controversial.²³⁻²⁵ Techniques have also been developed to strongly amplify MSC in vitro with

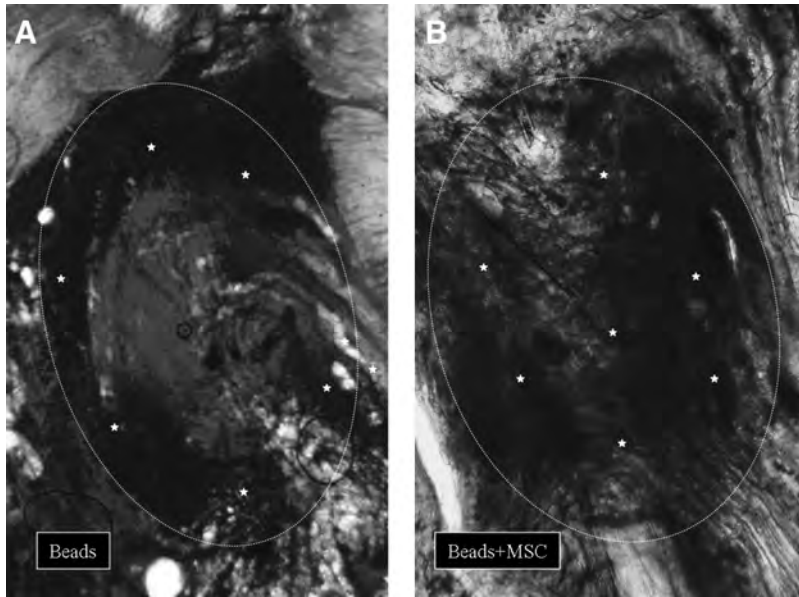


FIGURE 6. Mineralization of the periosteal flap observed after Von Kossa staining. Alginate beads with or without encapsulated MSC were extemporaneously prepared and implanted for 10 weeks in a musculoperiosteal flap (10 rats per series). A, Peripheral calcification (white stars) observed in the “beads” group; B, large calcification area (white stars) observed in the “beads + MSC” group. Original magnification $\times 25$.

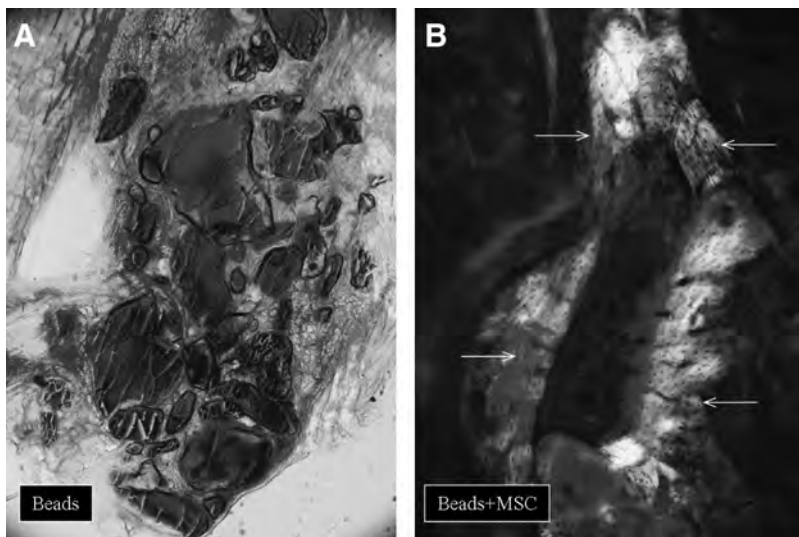


FIGURE 7. Osteoformation in the periosteal flap after Solochrome cyanin staining and observation by polarization microscopy. Alginate beads with or without encapsulated MSC were extemporaneously prepared and implanted for 10 weeks in a musculoperiosteal flap (10 rats per series). A, No bone in the group “beads”; B, lamellar mature bone (white arrows) in the group “beads + MSC.” Original magnification $\times 50$.

the maintain of their phenotype and also their multipotentiality.^{17,26–28} Thus, a very great number of MSC can be obtained from a limited volume of bone marrow.

However, MSC need to be associated with a support material to stabilize the cells in the bone defect foci and then to allow an adapted bone reconstruction. This association must also facilitate the implantation of MSC. The bone formation induced at an orthotopic site by association with a supporting material and MSC has been evaluated in several studies in rat,²⁹ dog,³⁰ and man.³¹ The results indicate that MSC are capable of filling a bone defect of critical size and that the newly formed bone possesses mechanical qualities close to those of native bone, but the respective responsibility of cells or biomaterials in these reconstructions is not demonstrated. Thus, in this context, all therapeutic approaches using MSC are particularly encouraged. However, in this case the differentiation of MSC towards the osteoblastic line occurs after implantation in vivo.

The association of dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate in the culture medium induces the differentiation of MSC towards the osteoblastic lineage.¹⁴ To speed up and increase the formation of new bone, some authors used osteoblasts differentiated in vitro before implantation. In fact, 3 studies have shown that the use of osteoblasts speeds up the bone repair process as compared with that of MSC.^{32–34} As osteoblasts are difficult to isolate and possess limited proliferation capacity, the only available solution is to obtain mature osteoblasts from amplified MSC.

The originality of our work relates to the evaluation in a heterotopic site of a bone reconstruction technique combining biologic (local bone cell therapy) and surgical (vascularized periosteal flap) approaches. MSC were obtained by culturing total bone marrow and conserving only the fraction adherent to plastic, according to the technique of Friedenstein et al.⁵ These cells were then amplified and encapsulated in

alginate beads at day 15. In our conditions, the differentiation of MSC towards the osteoblastic lineage, cultured in an adherent monolayer, increased until day 10. Subsequently, the expression of osteoblastic markers (particularly OC and BSP) gradually decreased, corresponding to the dedifferentiation of MSC during successive cell divisions. However, the expression of osteoblastic markers remained constant when MSC were encapsulated at day 10 into alginate beads, which implies that MSC conserved their degree of differentiation. Okumura et al³³ suggested that hydroxyapatite could facilitate the osteogenic differentiation of MSC. However, it is unclear whether the supporting material or the 3-dimensional structure was responsible for this differentiation. The culture of MSC in a 3-dimensional configuration is probably closer to the in vivo situation than cultured in a monolayer.³⁵

Although studies conducted at an orthotopic site are certainly closer to the clinical situation, a major drawback is the release of chemoattractant and angiogenic signals when the bone defect is created, which may influence the bone repair phenomenon. Studies conducted at an extrasosseous site seem to allow more precise evaluation of the real contribution of the different bone reconstruction techniques envisaged, which is why our work was directed toward this approach.

CONCLUSION

In in vivo conditions, the implantation of alginate beads alone within a vascularized periosteal flap did not generate bone formation but only peripheral calcification. However, the use of MSCs encapsulated in alginate beads within a periosteal flap led to the formation of new lamellar bone in the rat after 10 weeks of implantation. The vascularized flap probably increased the neovascularization of the implanted cells and the degradation of the support material. Moreover, its periosteal nature could also contribute to the local recruitment of osteoprogenitor cells. The knowledge of bone consolidation has progressed considerably during the last 25 years. The process allowing bone repair has proved to be highly complex, and many uncertainties remain at cellular and molecular levels. An understanding of all of these fundamental mechanisms will constitute an essential advance and certainly provide a basis for new therapeutic strategies in bone reconstruction.

REFERENCES

- Masquelet AC, et al. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2000;45:346–53.
- Belt PJ, Dickinson IC, Theile DR. Vascularised free fibular flap in bone resection and reconstruction. *Br J Plast Surg.* 2005;58:425–430.
- Duteille F, et al. [The serratus anterior free flap in limb reconstruction: about 30 cases]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2005;50:71–75.
- Lobo Gajiwala A, et al. The use of irradiated allografts in reconstruction of tumor defects: the Tata Memorial Hospital experience. *Cell Tissue Bank.* 2003;4:125–132.
- Friedenstein AJ, et al. Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230–247.
- Chipoy 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;19:1850–1861.
- Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;313:8–18.

- Connolly JF, Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J.* 1986;71:105–107.
- Wernitz JR, et al. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res.* 1996;14:85–93.
- Hernigou P, Beaujean F. [Pseudarthrosis treated by percutaneous autologous bone marrow graft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1997;83:495–504.
- Hernigou P, Beaujean F. [Bone marrow in patients with pseudarthrosis: a study of progenitor cells by in vitro cloning]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1997;83:33–40.
- Cummine J, Armstrong L, Nade S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation: studies of cellular behaviour using combined myelo-osseous grafts in the subscorbutic guinea pig. *Acta Orthop Scand.* 1983;54:235–241.
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res.* 1989;7:568–578.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64:278–294.
- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105:1663–1668.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71–74.
- Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143–147.
- Piek E, et al. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci.* 1999;112(pt 24):4557–4568.
- Dragoo JL, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85:740–747.
- Lee JA, et al. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2003;50:610–617.
- Rauch C, et al. C2C12 myoblast/osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:C235–243.
- Olmsted-Davis EA, et al. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15877–15882.
- Terada N, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002;416:542–545.
- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502–508.
- Ying QL, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002;416:545–548.
- Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone: cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367(suppl):S68–83.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69–80.
- Nakahara H, et al. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;259:223–232.
- Kadiyala S, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997;6:125–134.
- Bruder SP, et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80:985–996.
- Bruder SP, et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998;16:155–162.
- Breitbart AS, et al. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101:567–574; discussion 575–576.
- Okumura M, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:122–129.
- Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res.* 1996;32:481–492.
- Heng BC, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1379–1394.

Article 2

Rousseau J, Escriou V, **Perrot P**, Picarda G, Charrier C, Scherman D, Heymann D, Rédini F, Trichet V.

Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models.

Cancer Gene Ther. 2010 Jun;17(6):387-97.

ORIGINAL ARTICLE

Advantages of bioluminescence imaging to follow siRNA or chemotherapeutic treatments in osteosarcoma preclinical models

J Rousseau^{1,2}, V Escriou³, P Perrot^{1,2,4}, G Picarda^{1,2}, C Charrier^{1,2}, D Scherman³,
D Heymann^{1,2}, F Rédini^{1,2} and V Trichet^{1,2}

¹INSERM, U957, Nantes, France; ²Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Nantes, France; ³INSERM, U 640, CNRS, UMR8151, Université Paris Descartes, and École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris, France and ⁴CHU de Nantes, Hôtel-Dieu, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, France

Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumor for which pertinent preclinical models are still needed to develop new therapeutic strategies. As osteosarcoma growth is strongly supported by bone resorption, previous studies have inhibited the cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand using antibodies or recombinant proteins. However, its expression has not yet been inhibited using genetic approaches using small interfering RNA. To optimize the delivery of small interfering RNA to its cellular target and demonstrate their efficiency *in vivo*, two new osteosarcoma models expressing the firefly luciferase enzyme were developed. These luciferase-expressing osteosarcomas showed conserved osteolytic and osteogenic activities in mice and were detectable by *in vivo* bioluminescence imaging. In comparison with measurement of tumor volume, bioluminescence analysis enabled earlier tumor detection and revealed extensive cell death in response to ifosfamide treatment. Finally, by targeting the luciferase expression into osteosarcoma, we established a protocol for *in vivo* administration of small interfering RNA combined with cationic liposome.

Cancer Gene Therapy (2010) 17, 387–397; doi:10.1038/cgt.2009.89; published online 15 January 2010

Keywords: osteosarcoma; RNA interference; bioluminescence imaging; efficient delivery

Introduction

Osteosarcoma, defined as a rare malignant disease, is the most common primary bone tumor in both children and young adults, with a median age of 18 years at diagnosis.¹ Its development is characterized by the formation of immature bone or osteoid tissue by tumor cells, and is frequently associated with para-tumoral osteolysis causing painful bone fragility, frequently resulting in bone fractures. After initial diagnosis made by anatomopathology on open biopsy, treatment consists of tumor resection by surgery combined with pre- and post-operative chemotherapy (high-dose methotrexate, cisplatin and doxorubicin with ifosfamide in the post-operative phase). Over past several decades, the survival rate has improved, currently reaching approximately 70% at 5 years, but only 25% when lung metastases are detected at diagnosis.² Moreover, osteosarcoma patients who

poorly respond to chemotherapy have a high risk of relapse.³ Therefore, a need for new therapeutic options still exists.⁴

The development of primary bone tumors and bone metastases within the bone microenvironment is associated with a vicious cycle between tumor proliferation and bone resorption.⁵ This osteolysis is largely due to the activation and differentiation of osteoclasts through the interaction of the cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL or tumor necrosis factor superfamily member 11) with its receptor RANK. Several studies have demonstrated in various bone metastases models that blockade of RANKL using soluble decoy receptors resulted in an inhibition of osteolysis and slowdown of tumor progression (by soluble RANK^{6–8} or by the decoy receptor osteoprotegerin^{9–12}). The reduction in tumor incidence and growth by RANKL inhibition has also been demonstrated in osteosarcoma models.^{13,14} As blocking RANKL was proven to be effective in several *in vivo* models, a fully humanized monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab) has been developed for clinical use, and is currently being evaluated in several clinical trials for the treatment of patients with lytic bone lesions secondary to multiple myeloma, prostate or breast cancer.¹⁵

Currently, RNA interference (RNAi) is being explored as a potential treatment for cancer.^{16,17} So far, only few

Correspondence: Dr V Trichet, INSERM U957, Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France.

E-mail: valerie.trichet@univ-nantes.fr

Received 21 June 2009; revised 20 September 2009; accepted 1 December 2009; published online 15 January 2010

preclinical studies have tested the affect of injection of RNAi molecules on bone tumor models. Moreover, these studies have predominantly decreased the expression of genes associated with cell cycle.^{18–21} In osteosarcomas, one way to evaluate the therapeutic potential of small interfering RNA (siRNA) would be to target expression of RANKL in comparison with its blockage by antibody. However, the main challenge for the successful use of siRNA *in vivo* is to achieve an efficient delivery of these molecules to the target tissue without off-target effects.^{22–24} This is the purpose of this study. Osteosarcoma models that have been established in our laboratory,^{13,25} were modified to stably express the firefly luciferase using lentiviral gene transfer, then the luciferase expression was targeted with siRNA combined with the cationic liposome RPR209120 2-{3-[Bis-(3-amino-propyl)-amino]-propylamino}-N-ditetradecyl carbamoyl methyl-acetamide and DOPE (dioleoyl phosphatidyl ethanolamine; Avanti Polar Lipids)^{26,27} to determine the optimal delivery method for siRNA in osteosarcoma models.

Materials and methods

Osteosarcoma cell culture

Cells (OSRGA) derived from a rat transplantable osteosarcoma model originally induced by radiation²⁸ were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Perbio, Bezons, France). The POS-1 cells, originally isolated from a spontaneous osteosarcoma developed in a C3H/HeN mouse, were a kind gift from Dr A Kamijo.²⁹ They were cultured in RPMI (Lonza) with 10% fetal bovine serum.

Firefly luciferase gene cloning into lentiviral vector

The pGL3-CT plasmid (Promega, Charbonnières, France) that contains the complementary DNA encoding firefly luciferase (LucF) was modified by oligonucleotide insertion to replace the *Hind*III and *Xba*I sites by *Bam*HI and *Mlu*I restriction sites, respectively. Oligonucleotides 5'-AGCTACGTGGATCCAGATCTCAGT-3' and 5'-AGCTACTGAGATCTGGATCCACGT-3' containing a *Bam*HI site and the oligonucleotides 5'-CTAGTACTGTCGACACGCGTTAGA-3' and 5'-CTAGTCTAACGCGTGTGACAGTA-3' containing a *Mlu*I site were annealed and cloned into the pGL3-CT plasmid. The modified pGL3-CT plasmid was used to excise the *LucF* gene using *Bam*HI and *Mlu*I enzymes. The excised *LucF* gene was cloned into the pLNT/Sffv-MCS plasmid³⁰ between the *Bam*HI and *Mlu*I sites. The resulting plasmid was designated pLNT-LucF and used to produce lentiviral particles.

Lentiviral production and osteosarcoma cell transduction

Lentivirus was produced using the ViraPower Lentiviral Expression System according to the manufacturer's guidelines (Invitrogen Life Technologies, Cergy-pontoise, France). Briefly, 6×10^6 HEK293FT cells (human embryonic

kidney cells optimized for viral production) were seeded and transfected 24 h later with 3 μ g of the optimized packaging mix, 9 μ g of pLNT-LucF and 0.9 μ g of pFG12³¹ that encodes the enhanced green fluorescent protein (EGFP). Virus-containing supernatants were collected 48 h post-transfection and concentrated 60-fold by ultrafiltration. For titration, serial dilutions of virus-containing supernatants were tested on HEK293FT cells that were analyzed for EGFP expression 4 days post-infection by flow cytometry (FACSCalibur Flow cytometer, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Two million EGFP-viral units per ml were typically obtained.

To generate stably modified osteosarcoma cells, 10^3 POS-1 or OSRGA cells were seeded in wells of a 96-well plate in 100 μ l medium and infected with 10 or 50 EGFP-viral units per cell. After 2 weeks, EGFP expression level was quantified by flow cytometry. In addition, luciferase activity was measured for varying numbers of cells in a 96-well optical bottom plate (NUNC, Dominique Dutscher, Issy les Moulineaux, France) with 50 μ l of lysis substrate buffer from the 'Steady-Glo Luciferase Assay System' (Promega) in each well. Light measurements were carried out in duplicate by spectrophotometry (VICTOR plate reader, Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) for 10 s and results were corrected for background luminescence from parental cells.

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from LucF-POS-1 and parental POS-1 cells using TRIzol reagent (Invitrogen). First strand complementary DNA was synthesized at 37 °C for 1 h from 5 μ g of total RNA in a 50 μ l mix containing RT buffer, 0.5 μ g of random primers, 0.5 mM dNTP mix, 20 U RNaseOUT and 400 U murine moloney leukemia virus-reverse transcriptase (all from Invitrogen). The real-time PCR contained 10 ng reverse-transcribed total RNA, 300 nM forward and reverse primers and 5 μ l 2 \times SYBR green buffer (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) in a final volume of 10 μ l. Polymerase chain reactions were carried out in triplicate from several RNA extractions, in 96-well plates using the Chromo4 System (Bio-Rad). Oligonucleotides 5'-CCACAAGGACAGAGTCAGAT TACA-3' and 5'-TGGCTCAGATAGGAGGGGTA-3' were used to amplify mouse core-binding factor alpha (Cbfa-1). *Mus musculus* hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt 1, 5'-TCCTCCTCAGACCG CTTT-3' and 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3') and cyclophilin B (cycloB, 5'-ACAGGAGGAAAGAG CATCTA-3' and 5'-TCTTGACTGTAGTTATGAAGA ACT-3') were used as invariant controls. Analyses were performed using the Vandesompele method.³²

Alkaline phosphatase activity

Total protein was extracted from LucF-OSRGA and OSRGA cells using lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, Nonidet P-40 1%, sodium deoxycholate 0.25%, NaF 1 mM, leupeptine 10 mg/ml, aprotinin 10 mg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.5 mM and glycerol 10%). Total protein concentrations were determined using a

bicinchoninic acid-based (Sigma, St Quentin-Fallavier, France) method. Alkaline phosphatase activity was assayed using *p*-nitrophenyl phosphate (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) as a substrate, and the production of *p*-nitrophenol per minute was determined by measuring absorbance at 405 nm. The ALP activity measurements were carried out in triplicate from multiple extractions.

Experimental osteosarcoma models

All animals for *in vivo* experimentations were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethics Committee and under the supervision of authorized investigators. The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane–air mixture (2%, 0.21 per min per mouse) before any surgical procedure. Male C3H/HeN mice (4-week old; Elevages Janvier, Le Genest Saint Isle, France) or 4-week-old male nude NMRI mice (Charles River, St Germain de L'Arbresle, France) were used for LucF-POS-1 or LucF-OSRGA tumor induction, respectively. For tumor induction, mice were subcutaneously injected with 5×10^6 LucF-POS-1 or 2×10^6 LucF-OSRGA cells in 50 μ l phosphate buffered saline into the footpad. From developed tumors, $2 \times 2 \times 2$ -mm³ fragments were excised and transplanted into naive mice.¹³ For fragment insertion, a 5-mm section was made to open the muscle along the tibia, then muscular and subcutaneous wounds were sutured. The tumor volume was quantified by measuring two perpendicular diameters with a vernier calliper and calculated using the formula: $(l^2 \times L)/2$, where *l* is the smallest and *L* the largest diameter).

Bioluminescence imaging

The bioluminescence was measured several times a week after luciferase substrate injection into anesthetized mice. On the basis of 25 g weight, mice were intraperitoneally injected with 250 μ l of a Rompun–Ketalar solution (8 and 13%, respectively, in phosphate buffered saline) before intraperitoneal injection of 3 mg D-luciferin (Interchim, Montluçon, France) dissolved in 250 μ l of water. A Photon Imager (Biospace, Paris, France) was used to measure and visualize the photons released during substrate degradation by the luciferase. The BLI is expressed as counts per minute (c.p.m.) after background subtraction.

Ifosfamide treatment

At 6 days after LucF-POS-1 osteosarcoma transplantation, mice (*n*=5) were treated every week for 3 consecutive days with 60 mg per kg ifosfamide (ASTA Medica laboratories, Mérignac, France) or vehicle only, administered by intraperitoneal injection. Tumor volume was measured twice a week and BLI was measured once.

Radiological and microscanner analyses

Radiographs of tumor-bearing legs were obtained post-mortem with a mammography PLANMED Sophie apparatus (SN RAH 40710, Helsinki, Finland). In addition, bone architecture was analyzed for tumor

bearing tibia using the high-resolution SkyScan-1072 X-ray micro-computed tomography system for small animal imaging (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium).

Histology

Tumor tissues were fixed in 10% buffered formaldehyde, and after embedding in paraffin, 5- μ m-thick sections were mounted on glass slides. Sections were stained with Masson trichrom. Analysis of necrotic and fibrotic areas was performed on each section using a DMRXA microscope (Leica, Nussloch, Germany).

siRNA experiments

Small interfering RNAs were purchased from Eurogentec, Angers, France. The LucF siRNA was designed to target the luciferase gene sequence 5'-CUUACGUGAGUACUUCGA-3'. The control (CT) siRNA (sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUUU-3') did not show significant homology to any mouse messenger RNA sequence according to BLAST database searches. Small interfering RNAs were combined with carrier DNA (a plasmid containing no eucaryotic expression cassette) and the cationic liposome RPR209120/DOPE as described with the same amount of plasmid DNA pre-mixed with siRNA before addition of the cationic liposome at the appropriate concentration.²⁶ As this liposome has three positive groups, a ratio of 6 nmol cationic liposome per μ g of nucleic acid corresponds to a charge ratio of 6. To determine the best nucleic acid / liposome charge ratio for *in vivo* transfection, we tested in triplicate a range of siRNA quantities (from 0.05 to 0.4 μ g) and ratios (from 2 to 8) on 2×10^5 luciferase-expressing osteosarcoma cells seeded in a 96-well optical bottom plate. Animals bearing a LucF-osteosarcoma were injected intratumorally every 2 days with 2.5–10 μ g of siRNA combined with liposomes at ratio 6. The efficiency was evaluated by BLI and tumor volume measurements.

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad InStat v3.02 software (La Jolla, CA). *In vivo* experimentation results (ifosfamide and siRNA treatments) were analysed with the unpaired nonparametric Mann–Whitney *U* test using two-tailed *P*-values. Results with *P* ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Mouse POS-1 and rat OSRGA cell modification by lentiviral transduction

A mixture of luciferase-encoding lentiviral particles (LucF-virus) and EGFP-encoding lentiviral particles (EGFP-virus) was produced. Using a ratio of 10 EGFP viral particles for each POS-1 cell and 50 viral particles for each OSRGA cell, an efficient and homogenous modification of cells was obtained, with, respectively, 97 and 95% of cells expressing EGFP, as determined by flow cytometry (Figure 1a). As LucF and EGFP plasmids were used at a ratio of 10:1 for the lentiviral production, it was

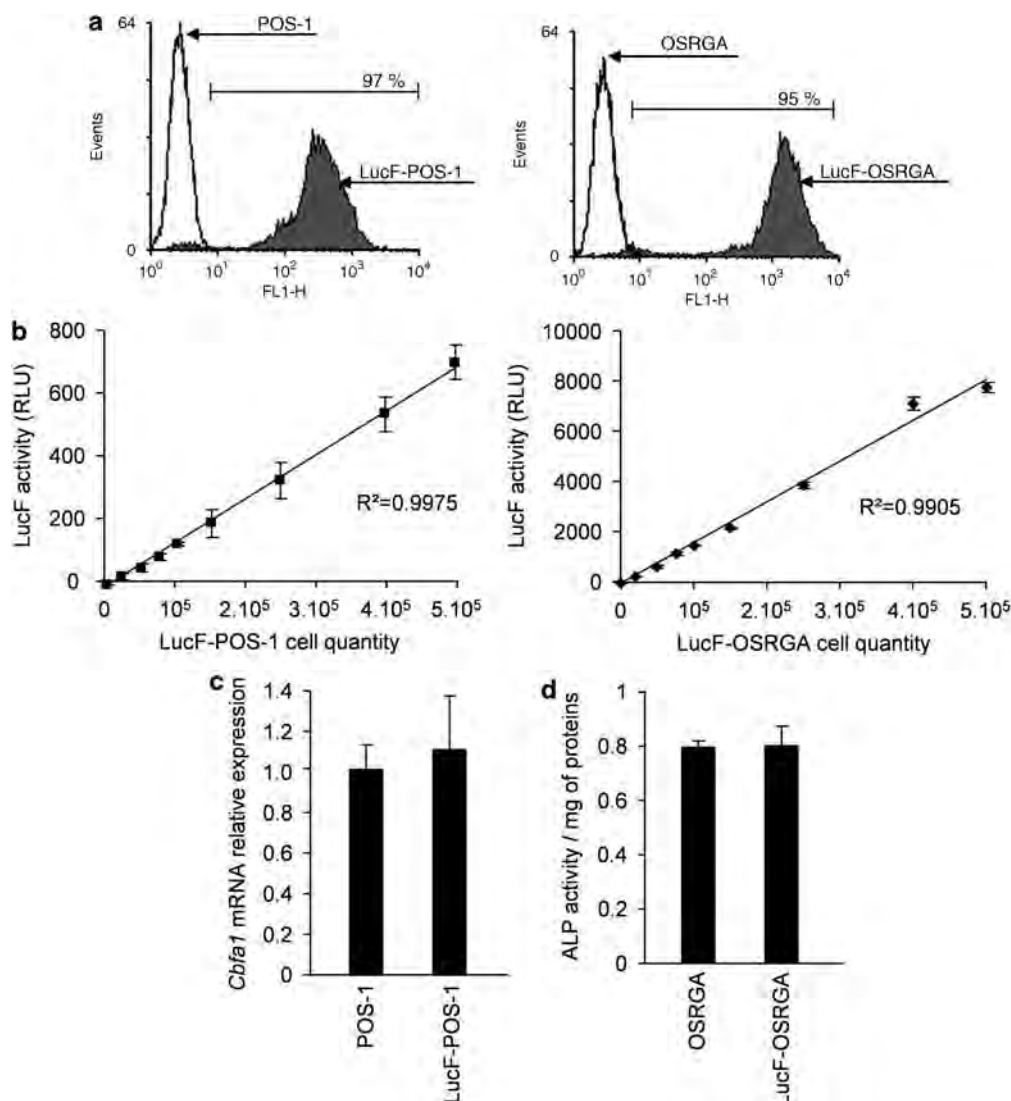


Figure 1 *In vitro* characterization of luciferase-expressing osteosarcoma cells. (a) Flow cytometry analyses of enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression are shown for LucF-POS-1 and parental POS-1 or OSRGA cells using the WinMDI 2.8 software. (b) Luciferase activity is shown for varying numbers of LucF osteosarcoma cells. (c) *Cbfa1* expression level was compared between LucF-POS-1 and parental POS-1 cells by real time PCR analysis. The results are given as a ratio of relative expression using *Hprt 1* and *cycloB* as housekeeping genes. (d) Comparison of alkaline phosphatase (ALP) activity per mg of total protein between LucF-OSRGA and parental OSRGA cells. (c, d) Data are shown as mean \pm s.d.

assumed that the *LucF* gene was transferred as efficiently as the *EGFP* gene. The modified POS-1 and OSRGA cells showed stable luciferase activity proportional to cell number over a period of at least 3 months in culture (Figure 1b), and were designated as LucF-POS-1 and LucF-OSRGA cells. The LucF-OSRGA cells seemed to be more efficiently transduced than LucF-POS-1 cells, as EGFP and luciferase expression was 3.5- and 13-fold higher, respectively, in LucF-OSRGA as compared with LucF-POS-1 cells. We were unable to obtain a higher POS-1 cell transduction efficiency as cells died in culture when a higher multiplicity of infection was used. To maintain the initial heterogeneity and biological properties of osteosarcoma cells, modified cells were maintained without cloning.

Several *in vitro* tests were next performed to check whether the lentiviral transduction had affected the osteoblastic phenotype of transformed cells. Real-time PCR analyses showed that the expression level of core-binding factor alpha1 (*Cbfa1*/Runx-2), which is an essential transcription factor for osteoblast differentiation, was similar between LucF-POS-1 and parental POS-1 cells (Figure 1c). Regarding LucF-OSRGA cells, alkaline phosphatase activity (Figure 1d) and mineralized nodule formation (data not shown³³) were not altered as compared with osteogenic parental cells. Moreover, LucF-POS-1 and LucF-OSRGA cells retained their tumorigenic properties. Injection of transformed cells into the footpad of mice resulted in primitive tumors fragments of which were successfully transplanted into

naive mice to reproduce the complete osteosarcoma animal models, as previously described.^{34,25}

LucF-OSRGA osteosarcoma transplanted in nude mice enables early in vivo tumor detection while maintaining osteogenic and osteolytic properties

The OSRGA osteosarcoma model was originally developed in male Sprague–Dawley rats. Owing to the large amount of D-luciferin required for BLI detection in rats, we decided to establish a LucF-OSRGA transplant model in immunodeficient mice. For this model, a fragment of a LucF-OSRGA tumor from a footpad was transplanted adjacent to the tibia of recipient mice. Tumor development was observed in all transplanted immunodeficient mice. Bioluminescence was detected as early as day 5 (Figures 2a and b), whereas tumors were clinically detected only between day 21 and 38 after tumor implantation (Figure 2c). Until day 20, the bioluminescence increased progressively, suggesting tumor cell proliferation even in the absence of visible tumor. Between day 21 and 30,

bioluminescence stabilized, and finally decreased from day 32 to 51 (2.5-fold decrease). In contrast, the mean tumor volume continued to increase until the animal was killed (day 51). The discrepancy between BLI and tumor volume could be partially explained by necrotic cell death. Indeed, histological analyses showed large necrotic, fibrotic regions (Figure 2d), which were also observed within unmodified OSRGA tumors. The necrotic, fibrotic areas are included in the measurement of tumor volume, but have a lower luciferase activity than healthy, non-necrotic tumor areas.

Finally, the extensive bone remodeling that is normally associated with OSRGA osteosarcoma²⁵ was similarly observed with LucF-OSRGA tumors. Radiography and microscanner analyses showed characteristic osteolytic lesions and ectopic bone formation along the cortical bone at the tumor implantation site (Figures 2e and f).

Similar results were obtained for LucF-OSRGA tumors in the footpad of mice: (1) earlier tumor detection by BLI than by measurement of tumor volume, (2) lack of correlation

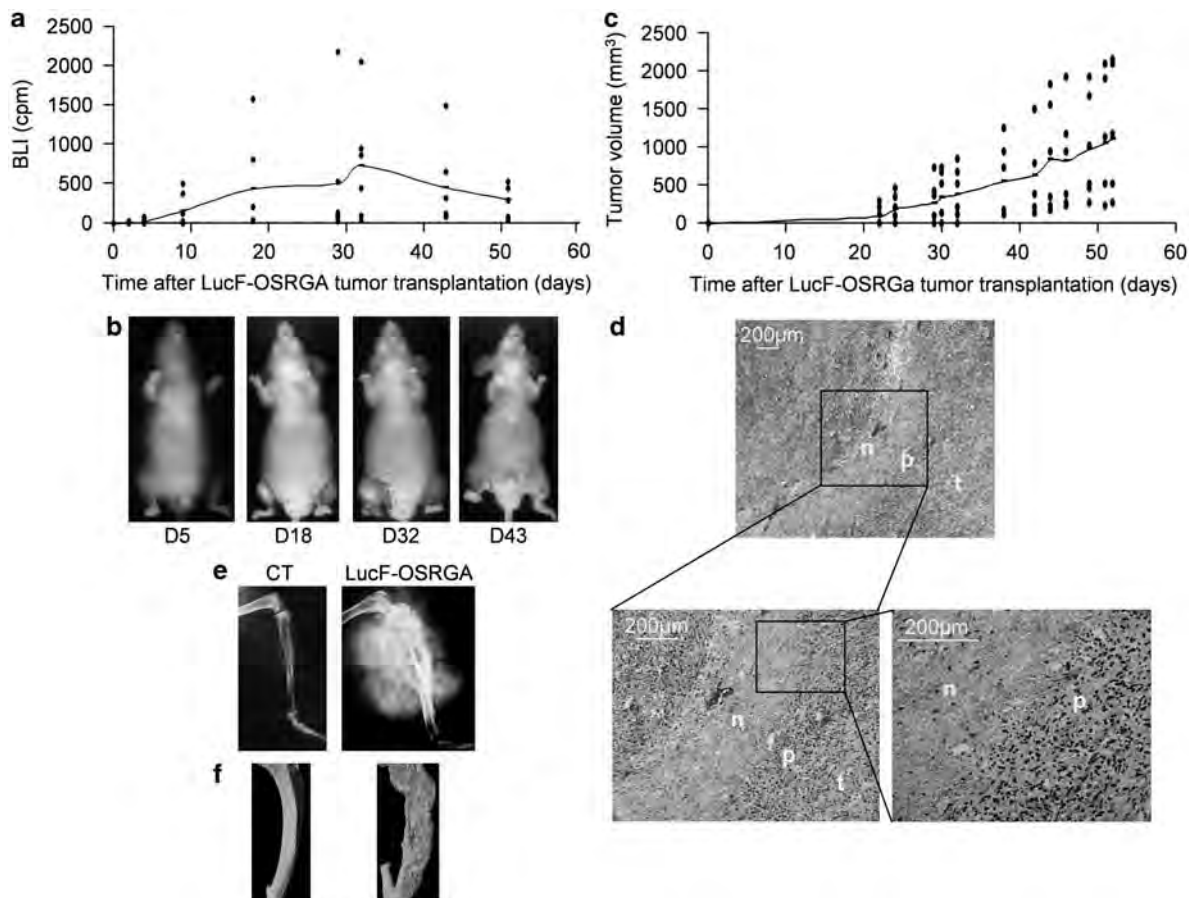


Figure 2 Characterisation of LucF-OSRGA osteosarcoma transplanted in immunodeficient mice. (a and b) Bioluminescence activity evolution after LucF-OSRGA tumor fragment implantation (three mice on both legs) by individual measures (points) and mean curves (a) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 5, 18, 32 and 43 of tumor development (b). (c) As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (d) Representative images of LucF-OSRGA tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Necrotic, fibrotic tissue is identified as a green cell-poor region (n) surrounded by a region containing numerous pyknotic nuclei (p). Viable tumor cells are present in surrounding areas (t). (e and f) Radiographic (e) and microscanner images (f) are shown for a representative transplanted LucF-OSRGA tumor.

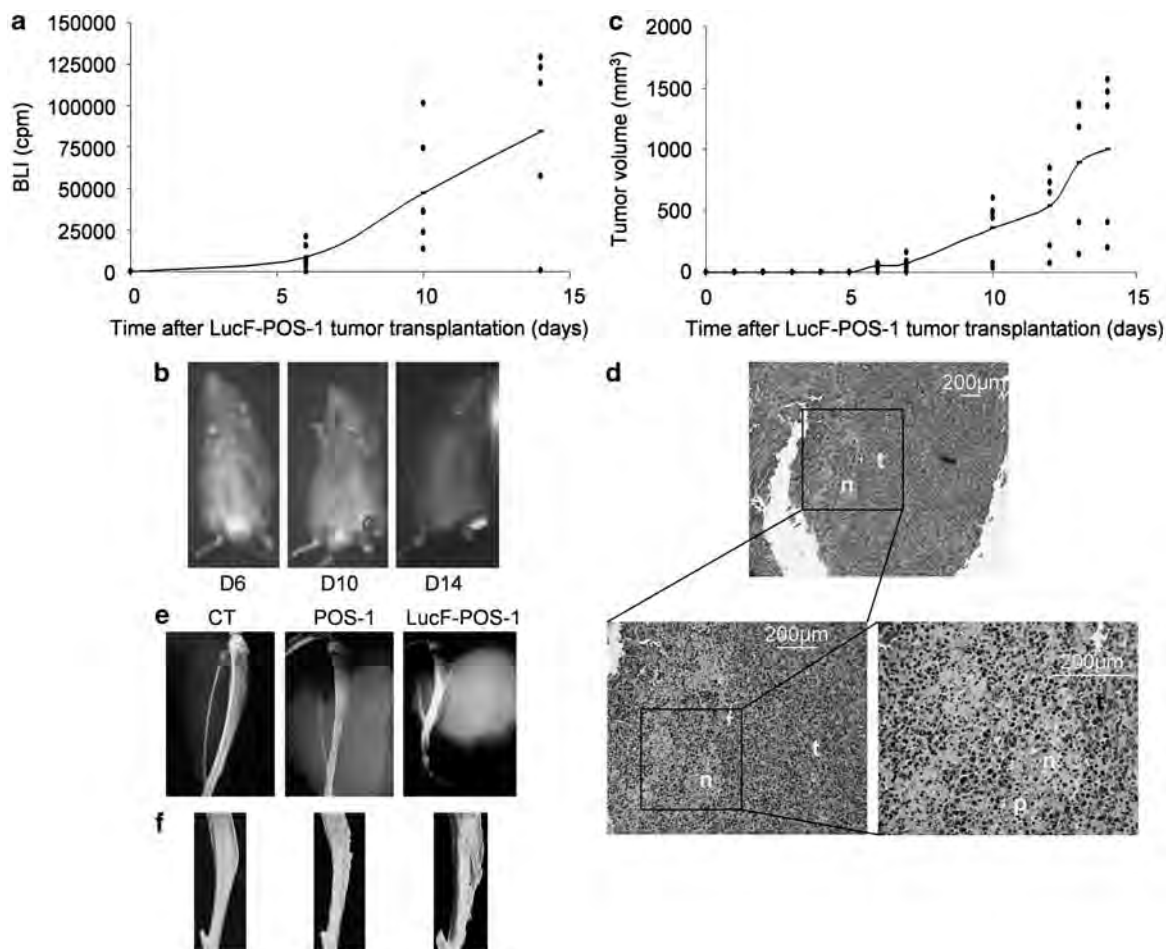


Figure 3 Characterization of LucF-POS-1 osteosarcoma transplanted into syngeneic mice. (**a** and **b**) Bioluminescence activity evolution after LucF-POS-1 tumor fragment implantation ($n=5$) by individual measures (points) and mean curves (**a**) associated with bioluminescence images showing luciferase detection as an example at day 6, 10 and 14 of tumor development (**b**). (**c**) As for the bioluminescence activity, evolution of tumor volume is shown after tumor induction. (**d**) Representative images of LucF-POS-1 tumor sections after Masson Trichrom staining. Original magnifications are indicated. Small necrotic, fibrotic areas are identified as cell-poor region containing numerous pyknotic nuclei (n). Viable tumor cells are present within surrounding areas (t). (**e** and **f**) Radiographic (**e**) and microscanner images (**f**) are shown for a representative transplanted LucF-POS-1 tumor.

between BLI and tumor volume and (3) preservation of OSRGA osteogenic properties (data not shown).

Tumor volume and bioluminescence measurements correlate during osteolytic LucF-POS-1 osteosarcoma development in syngeneic mice

Fragments of a primary LucF-POS-1 footpad tumor were transplanted adjacent to the tibia of syngeneic mice. Bioluminescence signals were observed as early as day 6 (Figure 3a and b), whereas tumors were not measurable at that time (Figure 3c). Longitudinal analysis showed that bioluminescence signal intensity increased exponentially and correlated with tumor volume. Moreover, such correlation was observed for the LucF-POS-1 footpad tumors as well (data not shown). Histological analyses of transplanted LucF-POS-1 tumors showed minor necrotic, fibrotic regions (Figure 3d), which were much smaller than those observed within

LucF-OSRGA tumors (Figure 2d). Radiography and microscanner analyses revealed osteolytic lesions resulting in cortical destruction comparable with those observed for parental POS-1 tumors (Figures 3e and f), suggesting that the interaction between osteoclasts and tumor cells that has been previously described for parental POS-1 cells¹⁴ was maintained for luciferase-expressing POS-1 cells.

Bioluminescence is superior to measurement of tumor volume to reveal LucF-POS-1 osteosarcoma growth inhibition in response to chemotherapy

Using the LucF-POS-1 model, in which a good correlation was observed between bioluminescence signal intensity and tumor volume for untreated tumors, we evaluated whether BLI enabled earlier detection of tumor responsiveness to chemotherapy, as compared with the measurement of tumor volume. The conventional antic-

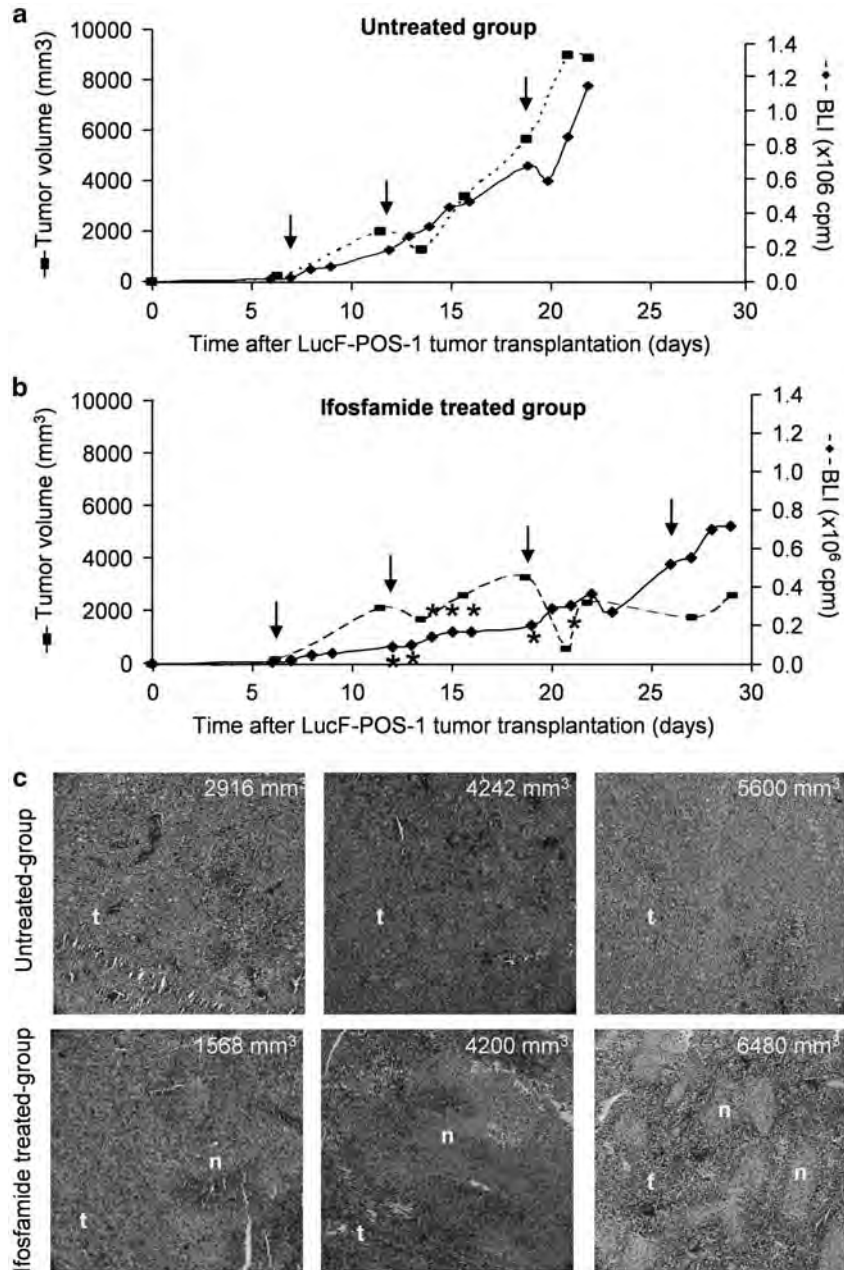


Figure 4 Response of LucF-POS-1 osteosarcoma to ifosfamide treatment. (a and b) Progression of mean tumor volume (solid lines with diamonds) and mean bioluminescence (dashed lines with squares) are shown for untreated (a) or ifosfamide-treated (b) mice ($n=5$) bearing LucF-POS-1 tumors. Ifosfamide treatments are indicated by arrows. Asterisks indicate significant differences ($P<0.05$) between mean tumor volume of the treated and the untreated group. (c) Comparison between the untreated and ifosfamide-treated groups by histological analyses of tumor sections after Masson Trichrom staining revealed the presence of extensive necrotic, fibrotic tissue surrounded by areas containing numerous pycnotic nuclei (n) in tumors from ifosfamide-treated mice, whereas tumors from untreated mice contained predominantly areas of proliferating tumor cells (t).

ancer drug ifosfamide has previously shown partial efficacy in the treatment of rats bearing OSRGA tumors.³⁴ In this study, we extended the ifosfamide use in the mouse POS-1 osteosarcoma model. Mice bearing LucF-POS-1 tumors were treated with ifosfamide or vehicle only for 3 consecutive days every week. A correlation between bioluminescence and tumor volume measurements was observed for the vehicle-treated group

(Figure 4a), similar to results described above. In the ifosfamide-treated group, a slow concomitant increase of tumor volume and BLI was observed until day 19 after tumor implantation (Figure 4b). Between days 12 and 21, the mean tumor volume was significantly lower in the treated group as compared with the untreated group. Statistical analyses were not performed after day 21 as several mice either died or were killed in the untreated

group as a result of tumor progression. Therefore, the LucF-POS-1 tumor growth significantly slowed down after one sequence of ifosfamide treatment, and an increase in the survival rate was observed in the treated group (data not shown). Moreover, radiographic analyses of tibia bearing LucF-POS-1 tumor showed a lower rate of bone remodeling in the treated group compared with the untreated group (small osteolytic areas with cortical integrity versus extensive osteolytic areas associated with cortical destruction in untreated control mice; data not shown).

In the ifosfamide-treated group, the stabilization of BLI from day 20 to the end of the experiment was suggestive of a complete inhibition of LucF-POS-1 osteosarcoma growth, whereas tumor volume measurements indicated a slowdown rather than an arrest of tumor growth (Figure 4b). After day 25, the correlation between bioluminescence and tumor volume was lost within the treated group. Histological analyses of LucF-POS-1 tumors from the ifosfamide-treated group showed more extensive necrotic, fibrotic areas than those of the untreated group (Figure 4c). These necrotic areas are part of the tumor mass and reflect the response to chemotherapy, but poorly express the luciferase, leading to a discrepancy between BLI and tumor volume measurements.

Luciferase expression can be successfully targeted by siRNA

As described above, the development of large necrotic, fibrotic areas observed in LucF-OSRGA tumors resulted in a poor correlation between BLI and tumor volume measurements as tumor development progressed (Figures 2a, c and d), whereas a close correlation between these two parameters was observed during LucF-POS-1 tumor development (Figures 3a and c). Therefore, the latter model was used to establish an *in vivo* siRNA delivery protocol.

We compared the effects of siRNA directed against luciferase messenger RNA (LucF siRNA) with the effects of control siRNA (CT siRNA) that lacks a messenger RNA target in mouse cells. Small interfering RNAs were formulated with the cationic liposome RPR209129/DOPE to form lipoplexes that have demonstrated efficient delivery of siRNA targeted toward tumor necrosis factor- α in a model of rheumatoid arthritis.²⁶ This formulation also contained a DNA cargo that was shown to enhance the lipoplexe efficiency.²⁷ First, siRNA transfections were performed on LucF-POS-1 cells *in vitro* to determine the most efficient nucleic acid/cationic lipid charge ratio. The highest level of inhibition of luciferase activity (30%) was achieved with 0.1 μ g of LucF siRNA formulated in lipoplexes at a charge ratio of 6 as compared with CT siRNA transfections (data not shown). Other LucF siRNA quantities and charge ratios did not result in greater and specific inhibitions. On the basis of these results, mice bearing a LucF-POS-1 osteosarcoma were treated intratumorally with siRNA formulated in lipoplexes at the optimal charge ratio of 6. In preliminary studies, we tested various quantities of CT

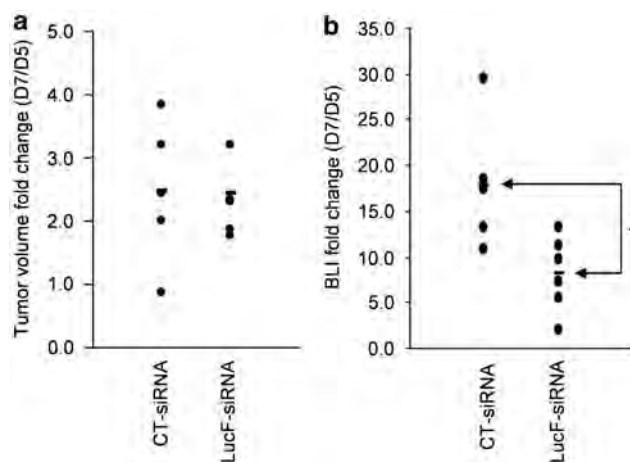


Figure 5 Bioluminescence imaging (BLI) detection after luciferase-targeting small interfering RNA (siRNA) transfection with lipoplexes. Mice bearing LucF-POS-1 osteosarcoma were treated with LucF siRNA or CT siRNA formulated with cationic liposome and a DNA cargo ($n=6$ in each group). The tumor volume (a) and BLI measurements (b) are shown as fold-change between the second (D5) and last day of treatment (D7; asterisks indicates $P < 0.05$).

siRNA (2.5, 5 or 10 μ g) and followed the tumor development. Injections of 2.5 μ g CT siRNA did not alter tumor growth, whereas administration of 5 or 10 μ g CT siRNA resulted in a significant slowdown of tumor progression as compared with untreated mice. Next, we compared the effects of two 2.5- μ g LucF siRNA injections with those of CT siRNA on LucF-POS-1 tumor progression; the first injection was administered when a BLI signal was just detectable (at day 3 after tumor transplantation) and the second injection 2 days later (at day 5). Progression of tumor volume and BLI between day 5 and 7 was compared for the LucF siRNA and CT siRNA-treated groups. As shown in Figure 5a, the fold-increase in tumor volume between day 5 and 7 was similar between the two treatment groups. In contrast, the number of photons detected was significantly (54.5%) lower in the group treated with LucF siRNA, as compared with the group that received CT siRNA (Figure 5b). Thus, our results indicate that liposomal delivery of siRNA can inhibit gene expression in a specific manner in osteosarcoma tumors.

Discussion

Osteosarcomas are malignant tumors that produce variable amounts of bone or osteoid tissue while simultaneously inducing osteolytic lesions. Owing to this clinical heterogeneity, osteolytic or osteogenic preclinical models are in use to develop and evaluate new therapeutic strategies. For example, the therapeutic association of ifosfamide and zoledronic acid was initially performed in the rat OSRGA model³⁴ and next transferred to the French clinical trial OS2006. In this study, two osteosarcoma cell lines POS-1 and OSRGA corresponding to,

respectively, an osteolytic and an osteogenic model were modified to express the firefly luciferase enzyme to enable *in vivo* tumor detection by BLI. Preclinical models of luciferase-expressing osteosarcoma were successfully established with conserved physiological and clinical properties. Indeed, LucF-OSRGA-derived osteosarcomas showed a strong osteogenic activity in nude mice, whereas LucF-POS-1-derived osteosarcomas triggered osteolytic lesions in syngeneic mice.

In addition, the LucF cell detection by BLI provided new insights into the tumor growth kinetics. The osteosarcomas were detected earlier by bioluminescence than by tumor volume measurement, allowing very early treatment monitoring. Today osteosarcoma response to preoperative chemotherapy is based on histopathologic analysis of tumor resection specimen as defined by Huvos,³⁵ in which examination of necrotic fibrotic and viable tumor areas serve as prognostic markers. In our preclinical study, BLI measurement better correlated with the estimation of tumor regression by histological analyses than tumor volume measurement. Indeed, ifosfamide treatment led to a slowdown of the mean tumor volume, challenging the treatment efficiency, whereas it led to a strong decrease followed by a stagnation of the mean bioluminescence, indicating a tumor growth arrest. Histological analyses confirmed the ifosfamide treatment efficiency with numerous necrotic fibrotic areas that contribute to the tumor volume but not to the alive tumor expressing the firefly luciferase.

As the discovery in 2001 of the RNAi machinery in mammalian cells and in worms, synthetic siRNAs have emerged as promising new drugs, combining high specificity (sequence-mediated gene silencing) with a homogenous chemical structure.³⁶ The major challenge lies in developing a way to efficiently deliver siRNA into target cells in patients without significant off-target effects. Using our newly developed LucF-POS-1 osteosarcoma model that showed a good correlation between tumor volume and bioluminescence measurements, we optimized a method for the efficient and specific delivery of siRNA, that is, inducing a significant decrease in bioluminescence using siRNA directed against luciferase, without altering tumor progression. As siRNAs are unstable in serum and need to cross cell membrane, they can be combined with various chemical agents (cationic lipids, polymers or peptides).³⁷ In this study, the siRNAs were complexed with the cationic liposome RPR209120/DOPE for *in vivo* delivery. This chemical agent has proven efficiency to deliver siRNA in a mouse experimental model for rheumatoid arthritis, achieving 50–60% inhibition of the siRNA-targeted gene when administered intravenously.²⁶ The LucF-POS-1 cells are usually difficult to transfect with chemical agents, and such limit was also observed for RPR209120/DOPE-combined siRNA transfer. However, despite the poor *in vitro* transfection efficiency, we established an efficient *in vivo* siRNA delivery method. Intratumoral injections of 2.5 µg siRNA combined with RPR209120/DOPE resulted in a 50% decrease in luciferase expression without interfering with tumor progression. Our experiments indicate that greater

quantities of siRNA and RPR209120/DOPE inhibited tumor growth nonspecifically. These nonspecific effects may result from the activation of innate immune responses by nucleic acids, whereas an excessive inflammatory cytokine release can have strong toxic effects in human.³⁸ Consequently, various strategies are developed to formulate siRNA with lipids to obtain an antitumoral effect through specific gene silencing without triggering an immune response.³⁹ The formulation of siRNA with the RPR209120/DOPE liposome includes the pre-association of siRNA with a plasmid DNA cargo. Indeed, naked siRNA and siRNA complexed alone in a lipoplex confer mild or intermediate protection against arthritis, whereas protection was complete with the plasmid DNA cargo formulation.²⁶ We recently showed that the addition of a DNA cargo in the siRNA formulation has minor effect on the structure of the lipoplexes, whereas the presence of plasmid DNA into the formulation could help the dissociation of the lipoplexes by interaction/competition with cell surface proteoglycans.²⁷ However, an optimization of the siRNA formulation with the cationic liposome RPR209120/DOPE would be to replace the carrier plasmid for clinical development.

By inducing transient RNAi, a few preclinical studies have shown that sarcoma progression can be reduced by downregulating genes that are implicated in cell cycle control or progression. Wang *et al.*²⁰ have observed an inhibition of human osteosarcoma xenografts in which the apurinic/apyrimidinic endonuclease gene has been downregulated by RNAi. For this, they have injected short hairpin RNA expression vectors into tumors. For certain clinical applications, siRNA has advantages over short hairpin RNA vector as smaller amounts of siRNAs are required for efficient delivery into target cells. Naked siRNAs against *stathmin*, which is an important regulator of microtubule dynamics and overexpressed in various human cancer cells, have been injected into the tail vein of mice bearing xenografted osteosarcoma.²¹ They have enabled a slight direct antitumor activity and enhanced significantly the chemosensitivity of osteosarcomas. However, the *in vivo* inhibition of *stathmin* has not been demonstrated after siRNA injection. Hu-Lieskovan *et al.*¹⁹ have treated metastatic Ewing's sarcoma with siRNA directed against the *EWS-FLII* oncogene. In their report, tail vein injections of naked siRNA have shown no therapeutic effect, while injections of these siRNA combined with polyplexes have inhibited tumor growth and human tumor cell engraftment. They have also demonstrated that siRNA-targeted genes (luciferase or *EWS-FLII*) were efficiently downregulated *in vivo*. All together these studies suggest that siRNA could be useful as drug combined with chemotherapeutic or antiangiogenic agents in sarcoma therapies. In addition, they have highlighted the need to demonstrate the effective gene silencing and the absence of indirect antitumor effects of siRNA *in vivo*.

Numerous studies using recombinant protein have demonstrated that progression of primary or secondary bone tumors depends on molecular and cellular interactions within the bone microenvironment, forming the soil

where the seed can grow.^{40,41} In one study using siRNA, a soil-dependent effect was observed. Bisanz *et al.*¹⁸ reported a strong effect of siRNA directed against integrin subunits combined with liposome on the growth of human prostate tumor in bone, but not on subcutaneous tumor growth. Similar site-dependent effects can be expected with siRNA directed against RANKL, the major cytokine involved in the vicious cycle between osteolysis and bone tumor progression. In our previous preclinical studies, RANKL blockade was achieved by overexpression of decoy receptors (osteoprotegerin or RANK-Fc) by gene transfer, which resulted in a strong inhibition of osteosarcoma growth.^{13,14} In this study, we demonstrate that siRNA can be successfully used to target a specific gene in osteosarcoma induced in mice. This raises the possibility that RANKL inhibition in osteosarcoma may be achieved using synthetic siRNA, which would be ideal for antitumor therapies due to its ease of manufacturing and the transient nature of its effect.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Région des Pays de la Loire (JG/ND/RECH N 660, fellowship for JR) and the Agence Nationale de la Recherche 2007 'Pathophysiology of Human diseases' Project N R07196NS.

References

- Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* 2007; **2**: 6.
- Ward WG, Mikaelian K, Dorey F, Mirra JM, Sassoon A, Holmes EC *et al.* Pulmonary metastases of stage IIB extremity osteosarcoma and subsequent pulmonary metastases. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1849–1858.
- Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A *et al.* Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann Oncol* 2001; **12**: 1145–1150.
- Lamoureux F, Trichet V, Chipoy C, Blanchard F, Gouin F, Redini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; **7**: 169–181.
- Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 2007; **6**: 2609–2617.
- Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2001; **61**: 2572–2578.
- Pearse RN, Sordillo EM, Yacoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N *et al.* Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 11581–11586.
- Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, Keller ET. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 2003; **63**: 7883–7890.
- Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A *et al.* Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001; **98**: 3534–3540.
- Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, Kostenuik PJ. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 2001; **61**: 4432–4436.
- Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziaradzi I, Komarova SV, Sarosi I *et al.* Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006; **440**: 692–696.
- Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, Murali R *et al.* An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 2007; **67**: 202–208.
- 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**: 7308–7318.
- Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, Charrier C *et al.* Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**: 3389–3398.
- Schwarz EM, Ritchlin CT. Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 2007; **9**(Suppl 1): S7.
- Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; **13**: 464–477.
- Grzelinski M, Urban-Klein B, Martens T, Lamszus K, Bakowsky U, Hobel S *et al.* RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs *in vivo* exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Hum Gene Ther* 2006; **17**: 751–766.
- Bisanz K, Yu J, Edlund M, Spohn B, Hung MC, Chung LW *et al.* Targeting ECM-integrin interaction with liposome-encapsulated small interfering RNAs inhibits the growth of human prostate cancer in a bone xenograft imaging model. *Mol Ther* 2005; **12**: 634–643.
- 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**: 8984–8992.
- Wang D, Zhong ZY, Li MX, Xiang DB, Li ZP. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin *in vivo*. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1993–2001.
- Wang R, Dong K, Lin F, Wang X, Gao P, Wei SH *et al.* Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression. *Mol Med* 2007; **13**: 567–575.
- Xie FY, Woodle MC, Lu PY. Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discov Today* 2006; **11**: 67–73.

- 23 De Fougerolles AR. Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 125–132.
- 24 Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, Banas A, Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. *Methods Mol Biol* 2009; **487**: 83–92.
- 25 Cherrier B, Gouin F, Heymann MF, Thiery JP, Redini F, Heymann D *et al*. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumour Biol* 2005; **26**: 121–130.
- 26 Khoury M, Louis-Plence P, Escriou V, Noel D, Largeau C, Cantos C *et al*. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 1867–1877.
- 27 Rhinn H, Largeau C, Bigey P, Kuen RL, Richard M, Scherman D *et al*. Escriou how to make siRNA lipoplexes efficient? Add a DNA cargo. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 219–230.
- 28 Jasmin C, Allouche M, Jude JG, Klein B, Thiery JP, Perdereau B *et al*. An experimental model of osteosarcomas in rats. *Sem Hop* 1982; **58**: 1684–1689.
- 29 Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T. Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* 2000; **155**: 169–172.
- 30 Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C *et al*. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 803–813.
- 31 Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 183–188.
- 32 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT–PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**: RESEARCH0034.
- 33 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**: 1850–1861.
- 34 Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C *et al*. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005; **37**: 74–86.
- 35 Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med* 1977; **101**: 14–18.
- 36 Haussecker D. The business of RNAi therapeutics. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 451–462.
- 37 Nguyen T, Menocal EM, Harborth J, Fruehauf JH. RNAi therapeutics: an update on delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2008; **10**: 158–167.
- 38 Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009; **19**: 89–102.
- 39 Robbins M, Judge A, Ambegia E, Choi C, Yaworski E, Palmer L *et al*. Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 991–999.
- 40 Chirgwin JM, Guise TA. Skeletal metastases: decreasing tumor burden by targeting the bone microenvironment. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 1333–1342.
- 41 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* 1989; **8**: 98–101.

Article 3

Perrot P, Rousseau J, Bouffaut AL, Rédini F, Cassagnau E, Deschaseaux F, Heymann MF, Heymann D, Duteille F, Trichet V, Gouin F.

Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence.

PloS One. 2010 Jun 8;5(6):e10999.

Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence

Pierre Perrot^{1,2,3}, Julie Rousseau^{1,2}, Anne-Laure Bouffaut^{1,2,3}, Françoise Rédini^{1,2}, Elisabeth Cassagnau⁴, Frédéric Deschaseaux⁵, Marie-Françoise Heymann^{1,2,4}, Dominique Heymann^{1,2}, Franck Duteille^{1,2,3}, Valérie Trichet^{1,2}, François Gouin^{1,2,6*}

1 INSERM, U957, Nantes, France, **2** Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire, Service de Chirurgie Plastique et des Brûlés, Nantes, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France, **5** Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique, EA3855, Tours, France, **6** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Orthopédie-Traumatologie, Pôle Ostéo-articulaire, Nantes, France

Abstract

Background: Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumour in young adult treated by neo adjuvant chemotherapy, surgical tumor removal and adjuvant multidrug chemotherapy. For correction of soft tissue defect consecutive to surgery and/or tumor treatment, autologous fat graft has been proposed in plastic and reconstructive surgery.

Principal Findings: We report here a case of a late local recurrence of osteosarcoma which occurred 13 years after the initial pathology and 18 months after a lipofilling procedure. Because such recurrence was highly unexpected, we investigated the possible relationship of tumor growth with fat injections and with mesenchymal stem/stromal cell like cells which are largely found in fatty tissue. Results obtained in osteosarcoma pre-clinical models show that fat grafts or progenitor cells promoted tumor growth.

Significance: These observations and results raise the question of whether autologous fat grafting is a safe reconstructive procedure in a known post neoplastic context.

Citation: Perrot P, Rousseau J, Bouffaut A-L, Rédini F, Cassagnau E, et al. (2010) Safety Concern between Autologous Fat Graft, Mesenchymal Stem Cell and Osteosarcoma Recurrence. PLoS ONE 5(6): e10999. doi:10.1371/journal.pone.0010999

Editor: Peter McCulloch, University of Oxford, United Kingdom

Received: October 9, 2009; **Accepted:** May 14, 2010; **Published:** June 8, 2010

Copyright: © 2010 Perrot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fondation pour l'Avenir de la Recherche Médicale Appliquée (study ET 8-486, Paris, France), Ligue contre le cancer/ Canceropole Grand Ouest/Regions Bretagne, Centre, Pays de la Loire, Poitou-Charentes (convention DAFCG/7506, Nantes, France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: francois.gouin@chu-nantes.fr

Introduction

In plastic and reconstructive surgery, autologous fat grafting enables soft tissue augmentation and is increasingly used for cosmetic indications but also for correction of defect following tumor treatment. This procedure proposed by Coleman was applied first for facial remodelling and more recently for breast augmentation [1,2]. This lipofilling procedure is usually considered as a safe procedure and does not require a permit application. Indeed it consists of autologous tissue injection in a site of defect, directly after harvesting without *ex vivo* expansion.

The only safety concern which was predicted in 1987 by the American Society of Plastic and Reconstructive Surgeons was that fat grafting may compromise breast cancer detection by inducing microcalcifications. In fact a recent clinical study has demonstrated that previous breast augmentation leads to difficulties for breast cancer detection and for tumor management and reconstruction procedure [3]. Concerning breast reconstruction after mastectomy, fat injection seems to be accepted, but it remains controversial to treat cosmetic sequelae after conservative breast surgical treatment [4,5]. Indeed one safety question

concerns the potential risk of recurrence caused by fat injection side effect, but this question remains unanswered for breast cancer as relapse incidence is already high for certain groups of patients.

In contrast, late local recurrence is an unexpected event after complete remission of an osteosarcoma. Only 5% of patients with recurrent disease have local recurrence and such event occurs at a median time ranging from 6 to 28 months as reported by Ferrari *et al.* [6]. Additionally these authors have observed a disease free survival of 46% stable from the 8th to 12th year. In another study, Meyers *et al.* have found the latest recurrence at the 9th year [7]. Bielack *et al.* have only reported 2 cases of late relapse over the 204 patients followed during 10 years; both were distant relapses with no local recurrence [8]. In fact, late local recurrence (after 15 to 20 years) has only been reported for low grade parosteal osteosarcoma subtype [9].

Here we report an unexpected local osteosarcoma relapse which occurred at the exact site of autologous fat grafts in a female patient who did not present any predictive factor of local recurrence. Previous experimental osteosarcoma models have been widely used to set up new therapeutic protocols and to

understand the interactions between osteosarcomas and their environment [10,11,12]. In this study, pre-clinical experiments were set up using a human osteosarcoma model induced in athymic nude mice to determine whether tumor growth may be modified by fat grafts. Because we observed that tumor growth was promoted by fat injection, we investigated the role of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), as fat tissue is a well-known source of MSC-like cells whose implication in cancer is controversial.

Materials and Methods

Ethics statement

- A surplus of human adipose tissue was used to isolate human mesenchymal stem cells and for injection in mice. This fat surplus was obtained from a female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction. The oral consent of the patient was obtained for the use of fat sample for research. A written consent was not necessary because it was anonymized unlinked research in accordance with French law (Art. L. 1245-2 du code de la santé publique, Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 Journal Officiel du 7 août 2004).

- All research involving animals were conducted following the guidelines (named "Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale") of the French ethical committee (named "Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale") and have been approved by the committee named CEEA.PdL.06.

Coleman's procedure

Coleman's procedure was performed over one female patient under general anesthesia [1]. The fat donor site was the abdominal subcutaneous tissues. The fat was taken using a cannula connected to a 10 ml Luer-Lock syringe. A steel stopper device helped to maintain the vacuum in the syringe during the aspiration phase. The sampling syringes were sealed and centrifuged at 3000 rpm for 3 min. After centrifugation the sample was separated into 3 layers: the upper yellow layer composed of oil from destruction of fat fragment, the middle layer composed of the adipose tissue graft and the bottom one composed of blood. The top and bottom layers were discarded and fatty tissue is injected through 1-mm incisions in subcutaneous and muscle tissue to obtain a filling effect.

Cell culture

SaOS2 cell line. The human osteosarcoma cell line SaOS2 was initially derived from an 11-year old Caucasian girl [13]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biowhittaker, Verviers, Belgium) with 1% antibiotic mixture (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Dominique Dutscher, Brumath, France), at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l) (Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgium).

POS-1 cells. The murine osteosarcoma cell line POS-1, derived from osteosarcoma which spontaneously developed in C3H/HeN mice was kindly provided from Kanagawa Cancer Center (Kanagawa, Japan [14]). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). The cells were harvested at confluence with trypsin (0.5 g/l)/EDTA (0.2 g/l).

C3H10T1/2 MSCs. These cells were originally derived from C3H/HeN mouse embryos and were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-226, Manassas, VA, USA). They represent a model of murine MSCs, able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts [15]. They were cultured in alpha-MEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 10% FBS.

Co-culture. Thirty thousands osteosarcoma POS-1 cells were seeded in 24 well-plates with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Murine C3H10T1/2 MSCs (15 000) were seeded in BD Falcon Cell Culture Insert (pore size 3 microns, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) with alpha-MEM supplemented with 10% FBS. One day after cell seeding, the murine MSCs were incubated with POS-1 cells with RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS. A trypan blue cell counting was then performed on POS-1 cells 24 and 72 hours later.

Isolation and characterization of human MSCs from adipose tissue

Human fat sample was obtained from one female patient in the course of an aesthetic abdominal liposuction with her informed consent for the use for anonymized unlinked research. The donor had no significant medical history. Fat was removed using the Coleman's procedure and 200 µl of centrifuged fat were plated in 25 cm² flask in 5 ml of alpha-MEM supplemented with 0.5 ml of FBS and 0.05 ml of antibiotics (Penicillin 100 U/ml and Streptomycin 100 mg/l; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To remove non adherent cells, the cells were washed after 24 hours three times and then supplemented with fresh medium. For phenotypic characterization, surface antigen markers were analyzed by flow cytometry on MSCs. Cells were washed twice with phosphate-buffered solution (PBS) containing 0.4% bovine serum albumin (BSA) before staining with the following antibodies: FITC-conjugated anti-CD90 (Biosciences, Erembodegem, Belgium), PE-conjugated anti-CD105, FITC-conjugated anti-CD34 and PE-conjugated anti-CD45 (Biolegend, San Diego, CA, USA).

Differentiation potential assessment. After expansion, the cells were seeded into chamber slides (LabTek, Nunc) and stimulated by osteogenic, adipogenic and vascular smooth muscle inducing media. Osteogenic medium consisted of alpha-MEM medium complemented by 10% FBS, 50 µg/ml freshly prepared ascorbic acid (Sigma, Saint-Quentin, Fallavier, France), 10 mM sodium-beta-glycerophosphate (Sigma) and 300 ng/ml recombinant human BMP4 (RnD systems, Lille, France). The cells were cultured three weeks and then mineralization was assessed by using alizarin red and von Kossa staining [16]. After extensive washing, cells were observed under light microscopy. Adipogenic medium consisted of 1×10⁻⁶ M dexamethasone and 0.5 mM isobutylmethylxanthin (IBMX, Sigma). The vascular smooth muscle fate was obtained by adding 20 ng/ml TGFβ1. Nile Red-Oil (Sigma) was used to stained lipid droplets. Monoclonal antibodies recognizing SM-α actin (clone 1A4, Sigma), SM-α actinin (clone 1E12, Developmental Studies Hybridoma Bank, university of Iowa), SM22α (clone 10H12, Novocastra) and SM myosin heavy chain (clone hsmv, Sigma) were used.

Histological analyses

Surgical specimens were fixed in 10% buffered formaldehyde and after embedding in paraffin, 5 µm-thick sections were stained with haematoxylin-eosin-safran solution. For presence of neutral lipids, osteosarcoma specimens were frozen and sliced into 5 µm-thick sections. Sections were fixed with 10% paraformaldehyde, then rinsed in distilled water, washed in 60% isopropanol and finally stained with Oil Red O solution (3 g/l).

In vivo experiments

Human osteosarcoma model in nude mice. Four-week-old female athymic mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) following the guidelines of the French ethical committee (CEEA.PdL.06). The mice were anesthetized by inhalation of an isoflurane-air mix (2%, 1 l/min) before any surgical manipulation. Human osteosarcoma SaOS2 cells were injected in the tibial anterior muscle (8×10^6 cells in 50 μ L PBS) of athymic mice to induce a primary tumor. Then fragments (0.02 g) of this primary tumor were transplanted next to the tibia of mice of the same athymic strain to induce osteosarcoma development [11]. Eight days after fragment transplantation, tumors were detected. Then they were either injected with 100 μ l of fat harvested from one female patient following the Coleman's procedure or injured with empty cannula. The tumor volume was calculated by the measure of 2 perpendicular diameters with a vernier caliper and calculated with the formula $(l^2 \times L)/2$ where l and L represent respectively the smallest and the largest diameter.

Mouse osteosarcoma model in C3H/HeN mice. Four-week-old male C3H/HeN mice (Elevages Janvier) were housed under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit as described above. Subcutaneous injections of POS-1 cells (2×10^6) were performed in the hind footpad of the mice. In some experiments, POS-1 cells were co-injected with C3H10T1/2 MSCs at the ratio 2/1. The tumor volume was calculated as described above.

Results

Case report

A 17 year-old girl was admitted in our institution in August 1994 with a metaphyseo-epiphyseal bone tumor of the proximal humerus. An incisional biopsy made the diagnosis of telangiectasic osteosarcoma (Fig. 1A), in conformity with clinical and radiolog-

ical features. The patient received pre operative chemotherapy in respect to french protocol at this time (4 cures of Holoxan/cis platinumium). Then a limb-salvage procedure consisting of an extra articular resection of proximal humerus with gleno-humeral articulation was performed. The reconstruction consisted of an arthrodesis with a vascularised scapular crest bone graft. The histopathologic examination of the specimen concluded of clear wide margins and no viable cells have been found out (good response, Huvos grade 4). The patient received two more cures of the same chemotherapeutic protocol. She has been continuously follow-up every 6 months for 5 years then every year [Magnetic Resonance Imaging (MRI) and chest X ray] until now.

In 2005, because of the unsightly appearance of her left arm due to resection of soft tissue and mainly deltoid muscle (Fig. 1B), she was referred to a reconstructive surgeon of our institution and received three autologous fat grafts harvested from her abdominal wall and injected circularly around the bone graft in soft tissues (March 2005, June 2005 and January 2006). The patient reported a good cosmetic result with a lasting increased volume of the arm.

In August 2007, she consulted her oncologist because of pain, inflammation and swelling at the lipofilling site (Fig. 2A). The Magnetic Resonance Imaging (MRI) showed an extensive soft tissue tumor (Fig. 2B). Histological analysis of the biopsy revealed an osteosarcoma with neoplastic cells and thin osteoid formation (Fig. 2C). No lipid droplets have been observed after Oil Red O staining of the biopsy. No distant relapses have been found out. The patient received again 4 cures of chemotherapy (API-AI French protocol) and a trans scapula amputation was performed (Fig. 2D). Tumor cells still responded well to chemotherapy (Huvos grade 3) and no post operative chemotherapy was proposed because of severe renal deficiency after pre operative chemotherapy. Despite the high rate of necrosis, the pathologist was able to see wide area of haemorrhage compatible with telangiectasic subtype (Fig. 2E). One year after the surgery the patient does not present any sign of local or distant relapse.

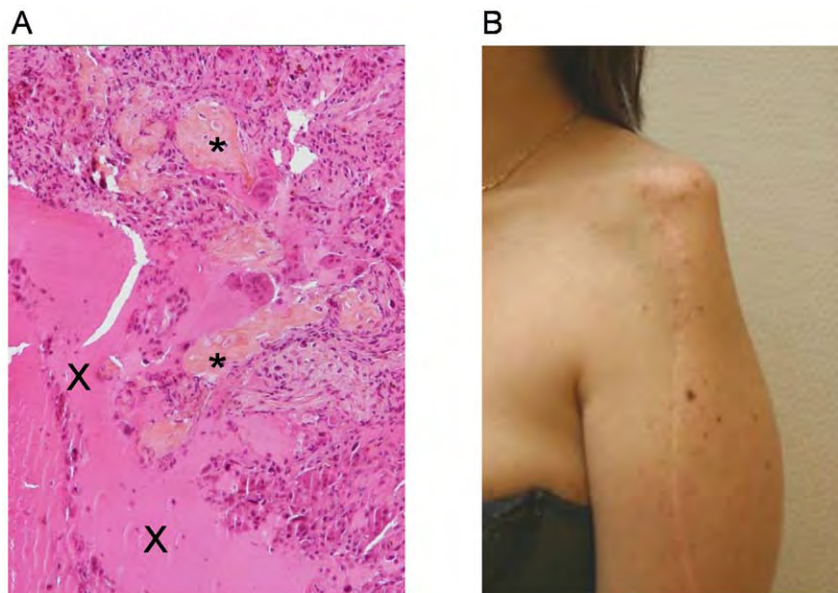


Figure 1. Telangiectasic osteosarcoma and post surgical defect. (A) Photomicrograph of the initial telangiectasic osteosarcoma showing proliferation of neoplastic cells, focal osteoid formation (*) and telangiectasic space containing blood (X) (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (B) Post-surgical defect of the left arm in January 2005, 2 months before the first lipofilling procedure. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g001

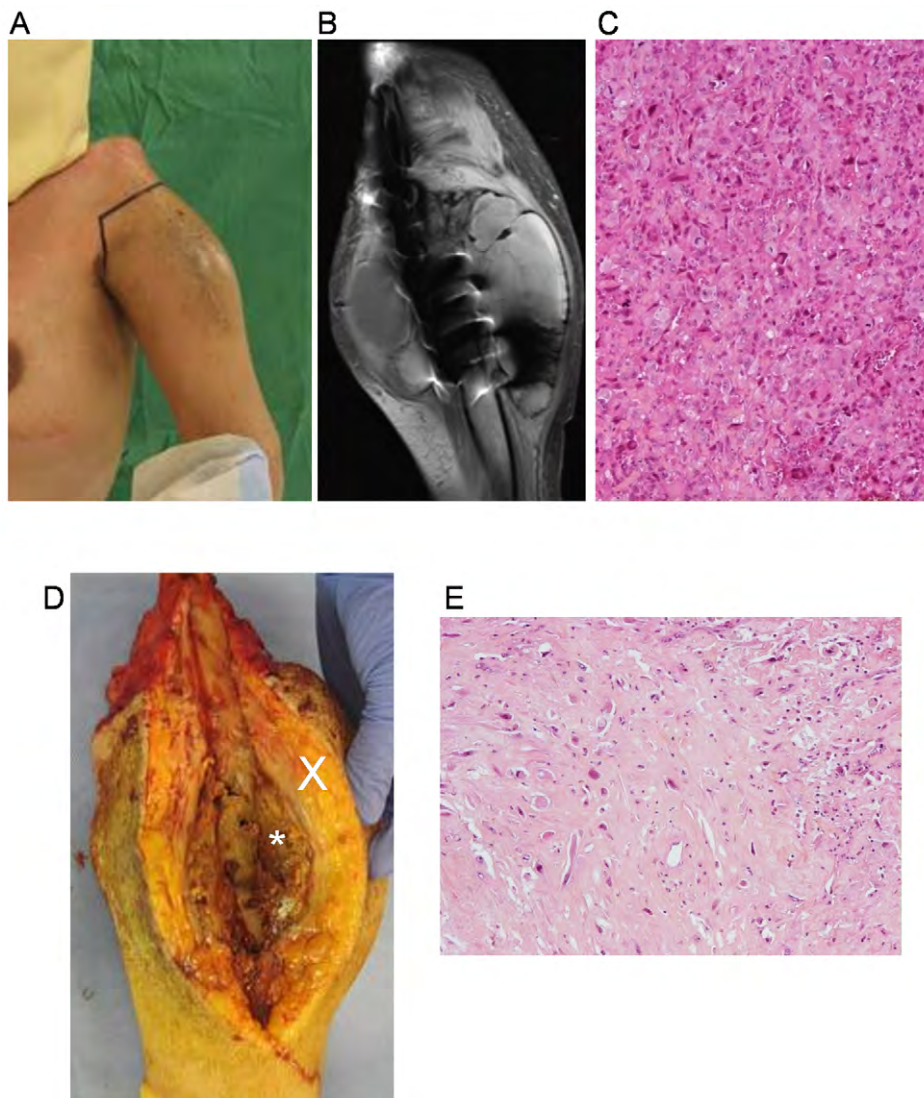


Figure 2. Osteosarcoma recurrence at the lipofilling site. (A) Inflammatory and swelling of the lipofilling site at the left arm after 4 cures of chemotherapy. (B) T2 weighted MRI shows extensive circular soft tissue tumor of the left arm, measuring 12 cm by 10 cm. (C) Photomicrograph of the biopsy specimen at the recurrent tumor site showing high grade malignant cell proliferation and thin osteoid formation (optical microscopy, HES staining, $\times 100$). (D) Photograph of the open resected tumor with tumor mass (*) around the left humerus diaphysis and peripheral fat engraftment (X) (E) Histology of resected tumor specimen (optical microscopy, HES staining, $\times 100$).
doi:10.1371/journal.pone.0010999.g002

Osteosarcoma growth is increased by fat injection

As a result of this surprising clinical case, we wondered whether fat graft was the cause of the local late osteosarcoma recurrence. In a first attempt to test this hypothesis, we tested whether a fat sample which is used for an autologous fat graft can modify the growth of human osteosarcoma induced in immunodeficient mice. First, athymic nude mice were injected with human SaOS2 osteosarcoma cells in muscle leading to tumor development in less than 50% of mice. To obtain a greater bone tumor incidence, fragments of a primary tumor induced by SaOS2 cell injection were transplanted next to the tibia of recipient mice of the same strain. Twenty one mice were transplanted with human osteosarcoma fragments of the same weight, then were divided into 3 groups: the control SaOS2 group just received tumor fragment at day 0; the SaOS2 + fat group was injected with human fat into the tumor site at day 8 after transplantation when a progressive tumor was detected (size $>100 \text{ mm}^3$); the SaOS2 + cannula group was

transplanted with tumor fragment at day 0, then at day 8 the tumors were injured with an empty cannula to reproduce potential inflammatory process; and a group of three mice was injected only with human fat in the tibial muscle. Results of tumor progression are shown in figure 3. In the control SaOS2 group, osteosarcoma developed rapidly reaching a mean volume of 1393 mm^3 23 days after tumor implantation (Fig. 3A). Tumor growth was greatly and significantly increased at day 21 after tumor induction in the group that received fat injections (Fig. 3B). As the fat injection was realized with a cannula which may have induced inflammation, a group of injured osteosarcoma was studied in the same conditions. In this case, the inflammation caused by cannula injury did not change osteosarcoma growth as compared to the control SaOS2 group with uninjured osteosarcoma (Fig. 3C). The tumor size increase observed in the SaOS2 + fat group was not due to the fat mass itself as only reduced and stable volumes (less than 200 mm^3) were observed with fat injections alone into naive control mice

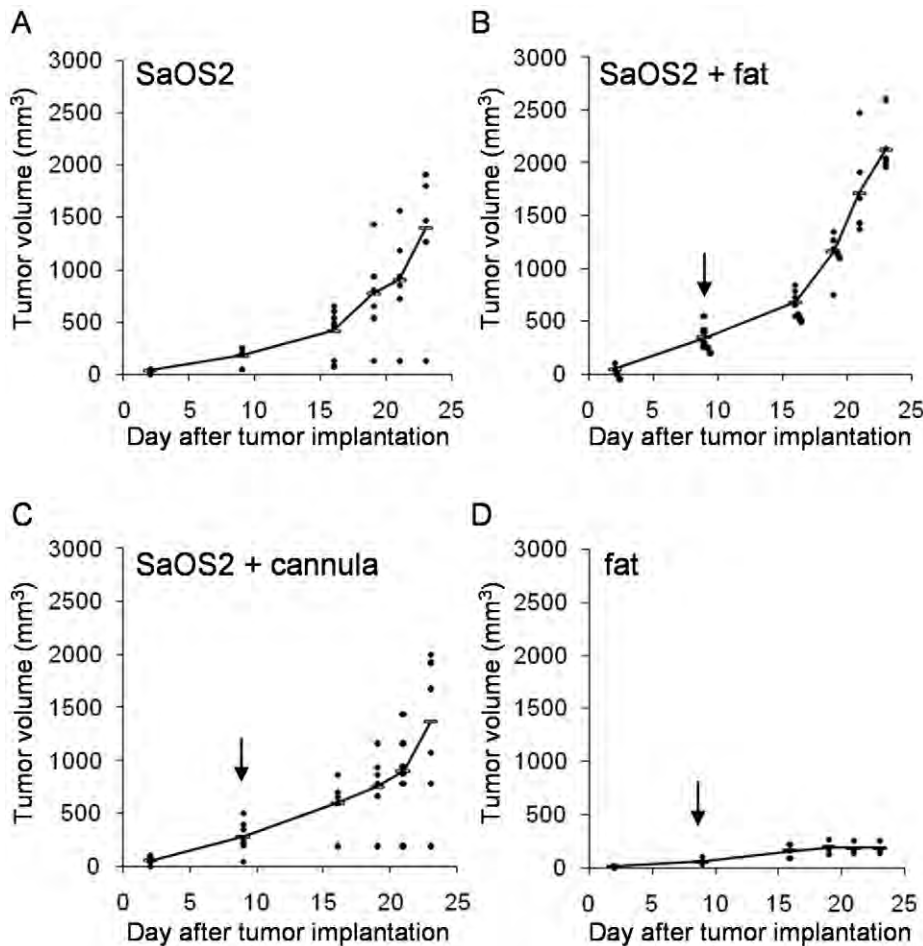


Figure 3. Fat injections into osteosarcoma induced in nude mice. (A) Six mice were considered as control tumors (SaOS2). (B) A group of 6 mice was injected at the tumor site with human fat harvested by the Coleman's technique (SaOS2 + fat). (C) A control group of 6 mice was injured with empty cannula at the tumor site. (D) Another group of 3 mice received the fat alone. Arrows indicate day 8 after transplantation when fat injections or cannula injuries were performed. Statistical analyses were calculated with the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) using GraphPad InStat v3.02 software. The p value was less than 0.05 for SaOS2 + fat versus SaOS2 alone or versus SaOS2 + cannula at day 21, but was not significant for SaOS2 alone versus SaOS2 + cannula. doi:10.1371/journal.pone.0010999.g003

(Fig. 3D). Moreover, we could observe that animals which received fat grafts in osteosarcoma tumors were more homogeneous in their tumor progression as compared with control groups (SaOS2 and SaOS2 + cannula).

Histological analyses revealed few but large adipocytes between the neoplastic cells for tumor specimens of the SaOS2 + fat group (Fig. 4A), whereas only small adipocytes were identified within fibrotic areas and not between neoplastic cells within tumor specimens of the SaOS2 + cannula group (Fig. 4B) or control SaOS2 group (data not shown). The proportion of these large adipocytes seems too small to explain the tumor size increase which was observed in the SaOS2 + fat group. Then we may hypothesize that fat injections have stimulated osteosarcoma cell proliferation.

MSC-like cells are present in the injected fatty tissue

One hypothesis for the stimulation of osteosarcoma growth by fat injection may lie to the presence of MSCs in the injected fatty tissue. An aliquot of the fat tissue which was injected into SaOS2-bearing mice was tested in culture for the presence of adherent cells. Such cells were obtained and analyzed by flow cytometry. At passage 3,

these cells were positive for the MSC markers CD105 and CD90 (Fig. 5A) and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34 (data not shown). Moreover, these cells differentiated into the osteoblastic and adipocytic cells as well as muscle cells from vascular smooth muscle lineage as shown in figure 5. Indeed, according to the type of induction the presence of mineralized nodules was identified by either von Kossa or alizarin red staining and adipocytes by their content in lipid droplets positives labelled by Nil Red-Oil. In addition, MSC-like cells were able to give rise vascular smooth muscle (VSM) cells since expression of cytoskeletal molecules specific of VSM lineage such as SM22 α , SM myosin heavy chain, SM- α actin and SM- α actinin increased dramatically after VSM induction. Therefore, adherent cells-derived from fat had characteristics similar to what it is largely described for bone marrow MSC [17].

After passage 8, these MSC-like cells were injected in three mice and the three intramuscular injections of two million cells per mouse did not induce tumor development after 60 days. These fat-derived cells maintained long-term self-renewal (>20 passages), but they have lost the CD105 expression as early as passage 6 showing rapid phenotypic change in culture.

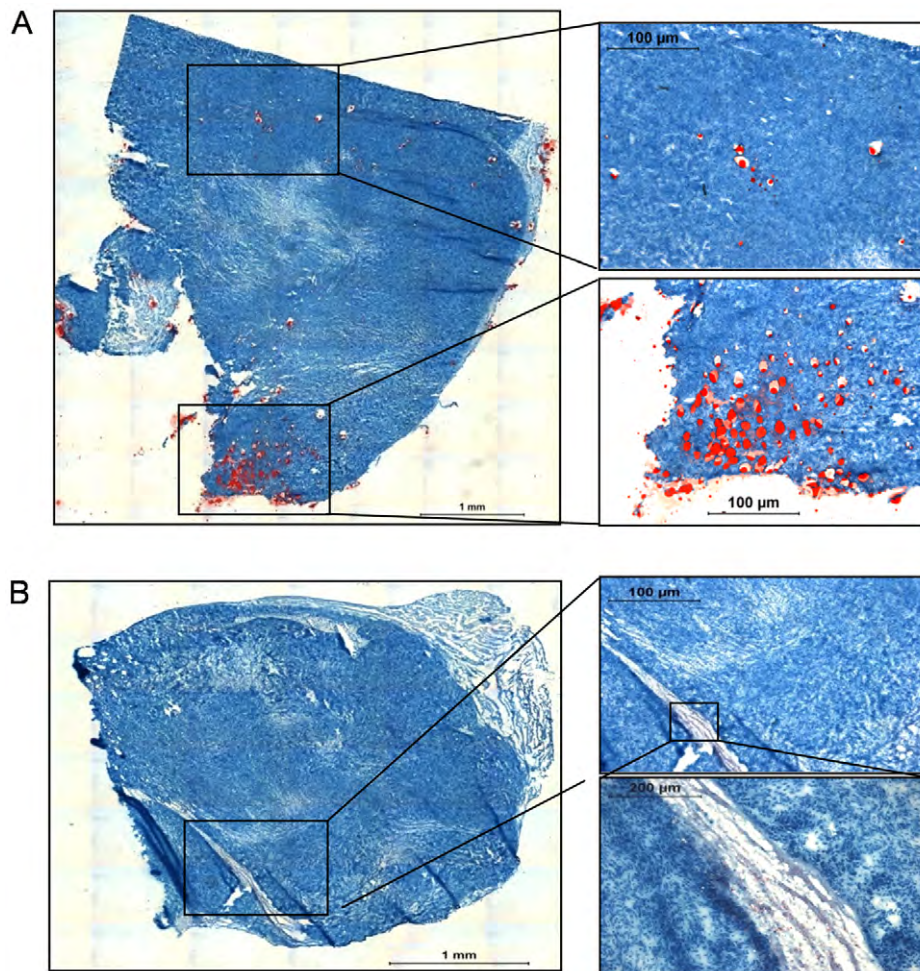


Figure 4. Identification of lipid droplets in osteosarcoma specimens. (A) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + fat group showing large red lipid droplets. (B) Photomicrograph of a tumor specimen from the SaOS2 + cannula group showing small red lipid droplets (optical microscopy, Oil Red O staining).

doi:10.1371/journal.pone.0010999.g004

Injections of MSCs with osteosarcoma cells increase tumor progression

To determine whether MSCs can interact with osteosarcoma cells and may modulate the early tumor development, we compared the tumor progression induced in mice by injection of osteosarcoma cells alone or with MSCs. For this experiment, we tested mouse osteosarcoma POS-1 cells rather than human SaOS2 cells because their injection in mouse footpad led to a greater tumor incidence (80% versus 50%). The POS-1 cells and C3H10T1/2 MSCs have been derived from the C3H/HeN mouse strain, allowing us to perform this experiment in a syngenic immunocompetent model. Eighteen C3H/HeN mice were divided into 3 groups: one control group was injected with 2×10^6 osteosarcoma POS-1 cells (POS-1 group); a second control group received 10^6 C3H10T1/2 cells (C3H10T1/2 MSC group); and mice in the test group were co-injected with POS-1 and C3H10T1/2 cells at the above mentioned concentrations (POS-1 + C3H10T1/2 MSC). Results of individual tumor progression showed a disparity in the time course of tumor onset in the POS-1 group (Fig. 6A): 5 animals out of 6 developing a tumor at different time (from day 15 to 32). On the contrary, all the animals in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group developed a tumor early after cell injection (around day 10) with the same time

of onset (Fig. 6A); while MSCs alone did not induce any tumor development (data not shown). The tumor development appeared earlier and more homogeneously in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than in the POS-1 group. The median tumor volume was three times higher in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group than the one in the POS-1 group at day 19 (775 versus 218.5 mm^3) and the difference was very significant ($p = 0.0076$ with Mann-Whitney test using GraphPad InStat v3.02 software). Similar results were obtained using a co-injection of rat MSC-like cells and rat osteosarcoma cells in the footpad of nude mice: earlier onset and faster growth of tumors as compared to osteosarcoma cells injected alone (Figure S1A).

We wondered whether MSCs may change the proliferation rate of osteosarcoma cells. Then C3H10T1/2 MSCs and POS-1 cells were co-cultured *in vitro* at a 1:2 ratio without cell contact. The number of blue stained POS-1 cells did not change when comparing co-cultured and cultured alone POS-1 cells; whereas the number of POS-1 live cells was significantly increased when co-cultured with C3H10T1/2 MSCs as compared to POS-1 cultured alone (Fig. 6B). Similarly the proliferation of rat osteosarcoma cells (OSRGA) was increased when co-cultured with rat MSC-like cells under same experimental conditions as described above (Figure S1B). Therefore MSC-like cells secreted

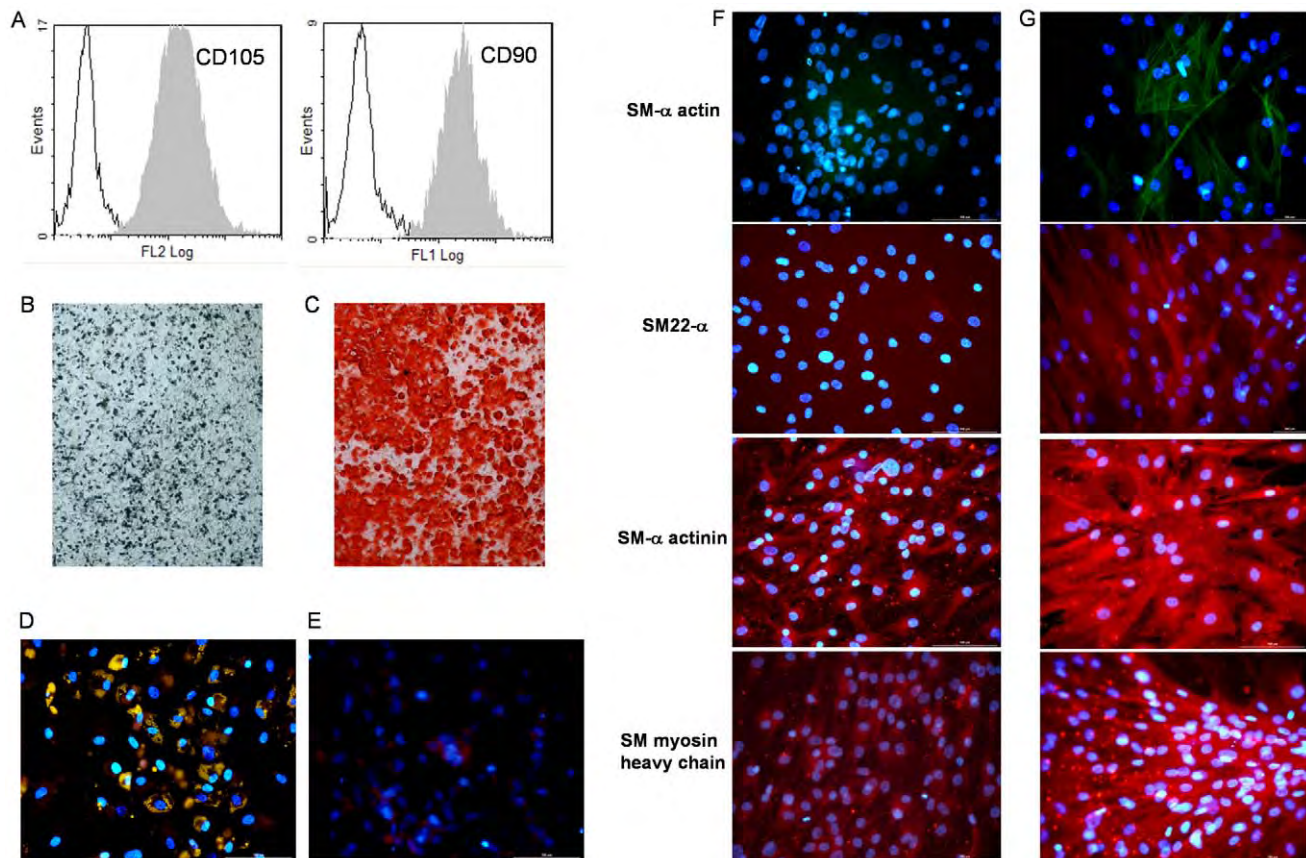


Figure 5. Characterisation of human fat derived MSC-like cells. (A) Flow cytometry analysis showed CD105 and CD90 positive cells after the third passage in culture. In addition, multipotential capacities of MSC-like cells were tested by inducing cells to differentiate into osteoblastic cells capable to mineralize, adipocytes and vascular smooth muscle (VSM) cells. (B) Mineralized nodules were identified as black spots using von Kossa silver staining or (C) as red spots using alizarin red staining after incubation of fat derived MSC-like cells in osteogenic differentiation medium. Adipocytes containing small Nil Red-positive lipid droplets were easily observed upon adipogenic conditions (D) whereas non induced cells were not labeled (E). In contrast to non induced cells (F), those cultured upon VSM conditions (G) generated elongated cells positive for several VSM markers such as SM- α actin, SM22 α , SM- α actinin and SM myosin heavy chain.
doi:10.1371/journal.pone.0010999.g005

one or several soluble factors which have promoted osteosarcoma cell proliferation *in vitro*.

Discussion

A patient in complete remission of an humerus telangiectasic osteosarcoma since ten years consulted for a cosmetic correction by lipofilling. Three injections of autologous fat grafts harvested by the Coleman's technique were realized and few months after the last one, a local recurrence of osteosarcoma occurred 13 years after the initial treatment. Late local recurrence of an osteosarcoma is a very unexpected event after complete remission and 10 years of follow-up. To our knowledge this is one of the longest delay reported between remission and local recurrence, another case being reported by Bacci *et al.* [18]. The patient reported here did not present any predictive factor of local recurrence. It was a telangiectasic osteosarcoma subtype and wide margins were obtained after extra articular monobloc resection, both considered as good predictive factors of disease free survival [8,18]. Even a bad response to chemotherapy is not considered as a bad prognostic factor for late relapse (after 4 years) instead of earlier relapse [19,20]. Thus, this local recurrence of telangiectasic osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts performed 18 months before raised the question of their possible relationship.

Despite the widespread clinical use of Coleman's lipofilling technique, very little is known about its consequence on tissue environment after tumor resection. The only published data concerned conservative treatments in breast cancer patients in which this technique represents an advance, but in these cases the correlation between fat transfer and recurrent breast cancer is difficult to analyze [2,21,22,23,24]. Motrescu and Rio have described a vicious cycle between adipocytes and cancer cells: the last ones induce secretion by adipose tissue of Matrix Metalloproteinase 11 which in turn favors cancer cell survival and tumor progression by changing the tumor surrounding environment [25]. To investigate the possible relationship between fat graft and osteosarcoma growth, an experimental model reproducing the clinical case of human fat injection in osteosarcoma was set up using human SaOS2 osteosarcoma cells in athymic mice. The human fat tissue was harvested from a patient and injected following the Coleman's procedure. Results showed that osteosarcoma growth was significantly increased by fat injection whereas fat alone produced only small and stable volumes at injection sites in naive mice. Several hypotheses could explain these observations. On one hand, fat may promote angiogenesis thereby interfering with tumor growth. Indeed, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which is expressed in the interstitial connective tissue of fat grafts favours graft

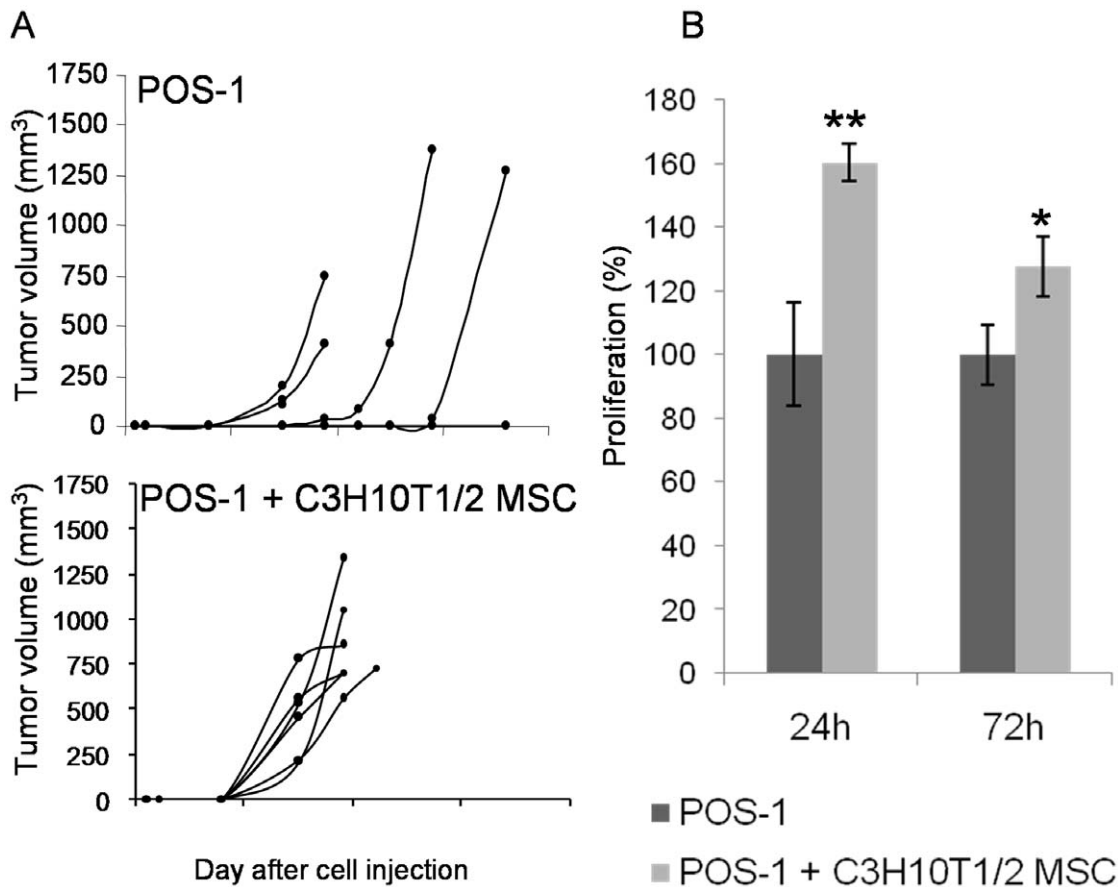


Figure 6. Mouse MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of C3H/HeN mice. Mice of the control group (POS-1) received osteosarcoma POS-1 cells alone, while POS-1 cells were associated with C3H10T1/2 MSCs at a ratio of 2:1 in the POS-1 + C3H10T1/2 MSC group. (B) POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs were co-cultured without cell-cell contact. The POS-1 cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours of co-culture. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of POS-1 cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means (* for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0010999.g006

survival [26], but can stimulate growth, invasion and metastasis of solid tumors [27,28]. In another hand, adipocytes highly express Adiponectin (also designed as adipose most abundant gene transcript) which was shown to stimulate Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL or TNFSF11) and inhibit Osteoprotegerin expression in osteoblasts [29]. Therefore fat may regulate two bone resorption mediators which are highly implicated in the development of bone tumors [30]. Indeed blocking RANKL by soluble RANK [31,32,33] or by the decoy receptor Osteoprotegerin [11,34,35,36,37] was proven to be effective in several *in vivo* models of bone tumors and leads to the clinical development of a fully-humanized monoclonal antibody directed against RANKL (Denosumab) [38].

In addition, the role of MSC-like cells which are contained in fatty tissue must be considered [39]. Our study showed that the fat harvested following Coleman's procedure contains progenitor cells which share numerous characteristics with MSCs. They were positive for the phenotypic markers CD90 and CD105 and simultaneously negative for the hematopoietic markers CD45 and CD34. They showed ability to survive in long term culture without producing tumor *in vivo* and to differentiate *in vitro* into the osteoblast lineage. Adipose-derived stem/stromal cells (designed ADSCs or ASCs) are proposed as cellular agent to enhance angiogenesis after ischemic injury [40,41] or to promote survival of

fat graft for breast augmentation or reconstruction [42], but additionally they could promote migration and invasion of breast cancer cells [43]. The effect of bone marrow-derived MSCs has been studied on osteosarcoma development by injection in the caudal vein of nude mice bearing SaOS2 cell-induced osteosarcoma: the addition of MSCs has promoted tumor growth and pulmonary metastasis *in vivo* [44]. In our study, we used a complete syngeneic model with POS-1 osteosarcoma cells and C3H10T1/2 MSCs which have been derived from C3H/HeN mice and were injected into mice of the same strain. The osteosarcoma onset and incidence were greatly enhanced by C3H10T1/2 MSC presence. Djouad F *et al.* have shown an immunosuppressive effect of primary or C3H10T1/2 MSCs on tumor growth: B16 melanoma cells have proliferated into allogeneic C3H/HeN mice only when they have been co-injected with MSCs otherwise they have been rejected [45]. Into a syngeneic tumor model, C3H10T1/2 MSCs have induced an earlier onset of tumors but did not interfere with the tumor growth kinetic [46]. Using a co-culture method without cell contact, we observed that C3H10T1/2 MSCs promoted POS-1 cell proliferation by secreting one or several soluble factors. We noted similar observations like earlier onset of tumors in a xenogeneic model and greater proliferation *in vitro* when rat osteosarcoma cells were combined with rat MSC-like cells. Numerous soluble factors have to be considered as MSC

mediators able to modify tumor cell proliferation or the tumor environment. Among them, the insulin growth factor, the fibroblast growth factor, the interleukin Il-6, the chemokine CCL5 (RANTES) and the matrix metalloproteinases MMP-2 and MT1-MMP are few of the mediators that could have a particular role in bone tumor development [47,48,49]. Further studies have to be performed to identify the MSC mediators acting on osteosarcoma cells. To address this point, the main difficulty is that the panel of cytokines and growth factors secreted by MSCs is likely to be different *in vitro* and *in vivo* because their expression can be modulated by inflammatory mediators *in vivo* [50].

Controversial results have been reported when MSCs have been injected into mice with induced tumor, resulting either in promotion or inhibition of tumor growth depending on the studies. Antitumoral action of rat MSCs on rat gliomas has been reported by Nakamura *et al.* [51]. In that report, MSCs have been responsible for prolonged survival of glioma-bearing rats. Similarly and somewhat to their own surprise, Khakoo AY *et al.* [52] have obtained also an antitumorigenic effect of human MSCs on Kaposi's sarcomas which have been induced on nude mice. Since their first warning, Djouad F *et al.* have also reported that the immunosuppressive effect of mouse MSCs *in vivo* depends on environmental parameters and that even "a low but relevant amount of MSCs may induce tumor rejection" [46]. Therefore the effect of MSCs within tumors seems unpredictable and dependant of microenvironment signals. By exploring the interaction of MSCs with the tumor environment, new therapeutic options could be provided [53].

In an osteosarcoma experimental model, Naumov *et al.* have shown that switch from non angiogenic to angiogenic phenotype could be a biologic behavior associated to the clinical expression of a quiescent tumor [54]. Assuming that cancer stem cell-like theory in bone sarcoma is correct [55,56], their presence at the site of the primary tumor after treatment is in agreement with a "supposed" good response chemotherapy and wide monobloc surgery as in our patient. Despite the lack of biological data on the mechanism by which cancer stem cells drive the tumor growth, the modulation of microenvironment induced by the fat graft could interfere with the biological behaviour of this sub-population. The preclinical experimental designs used in the present study mimic surgical procedure for lipofilling enabling to study *in vivo* interaction between fat and osteosarcoma cells, but do not mimic the late and local recurrence of osteosarcoma after a long lasting remission as observed in the clinical case reported here. Further experimental investigations are necessary to understand the mechanism regulating the interactions between the graft, the tissue recipient and quiescent tumor cells. However surgery associating inflammatory process could be directly responsible for the reactivation of dormant tumor cells [57,58]. This last assumption attributes a

minor or non role to adipose tissue but constitutes anyway a warning concerning the fat grafting or any other surgical procedure in a post-neoplastic environment.

In conclusion, because of the unexpected late local recurrence of an osteosarcoma at the exact area of autologous fat grafts and the stimulation of osteosarcoma tumor growth by fat or MSC-like cells in experimental models, clinician must be aware of the possible long term local relapse of tumor after an autologous fat graft which is usually considered as a safe procedure.

Supporting Information

Figure S1 Rat MSCs interact with osteosarcoma cells. (A) Evolutions of the tumor volume induced into the footpad of nude mice (NMRI nu/nu; Elevages Janvier, Le Genest St Isle, France). The OSRGA cells were derived from a transplantable rat osteosarcoma model originally induced by radiation [11]. Relatively undifferentiated mesenchymal cells (MSC-like cells) were obtained from calvaria of newborn rat (2 days old Sprague-Dawley rat, Charles River, L'Arbresle, France) as previously described. Mice of the control group (OSRGA) received 106 OSRGA cells alone, while OSRGA cells were associated with calvaria-derived MSC-like cells at ratio 2:1 in the OSRGA + MSC group. A third group received 0.5×106 MSC-like cells alone and have not developed any tumor after 85 days (data not shown). The significance test is not performed as only three mice per group were included in this preliminary experiment. (B) OSRGA cells and calvaria-derived MSC-like cells were co-cultured without cell-cell contact. The OSRGA cell proliferation was analyzed by trypan blue cell counting after 24 and 72 hours. Results are presented as proliferation percentages relatively to the total number of OSRGA cells cultured alone. Error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences between means ($p < 0.01$).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010999.s001 (0.50 MB TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank C. Bailly and C. LeCorre from the Experimental Therapy Unit platform of the IFR26 (Nantes, France) for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PP DH VT. Performed the experiments: PP JR ALB. Analyzed the data: PP JR ALB VT. Contributed reagents/materials/analysis tools: PP EC F Deschaseaux MFH VT. Wrote the paper: PP FR DH F Duteille VT FG. Histological analysis: EC MFH. Plastic surgeon of the patient: F. Duteille. Orthopaedic surgeon of the patient: FG.

References

- Coleman SR (1997) Facial recontouring with lipofstructure. *Clin Plast Surg* 24: 347–367.
- Coleman SR, Saboeiro AP (2007) Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 119: 775–785; discussion 786–777.
- Spear SL (2008) Fat for breast: where are we? *Plast Reconstr Surg* 122: 983–984.
- Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C (2007) Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. *Eur J Surg Oncol* 33: 685–690.
- Salgarello M, Visconti G, Farallo E (2009) Autologous Fat Graft in Radiated Tissue Prior to Alloplastic Reconstruction of the Breast: Report of Two Cases. *Aesthetic Plast Surg*.
- Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, et al. (1997) Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 8: 765–771.
- Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, et al. (1992) Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 10: 5–15.
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, et al. (2002) Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20: 776–790.
- Koksai Y, Akyuz C, Varan A, Atilla B, Gedikoglu G, et al. (2008) Late recurrence in primary region of parosteal osteosarcoma: a case report. *Pediatr Hematol Oncol* 25: 83–88.
- Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, et al. (2009) Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 69: 526–536.
- Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, et al. (2007) Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma:

- blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 67: 7308–7318.
12. Ory B, Heymann MF, Kamijo A, Gouin F, Heymann D, et al. (2005) Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* 104: 2522–2529.
 13. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59: 221–226.
 14. Uesugi M, Koshino T, Mitsugi N, Hiruma T (2000) Predictive value of serum immunosuppressive acidic protein for lung metastasis after amputation of murine osteosarcoma of the lower limb. *Cancer Lett* 155: 169–172.
 15. Pinney DF, Emerson CP, Jr. (1989) 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect* 80: 221–227.
 16. Bills CE, Eisenberg H, Pallante SL (1971) Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* 128: 194–207.
 17. Dennis JE, Charbord P (2002) Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 20: 205–214.
 18. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, et al. (2000) Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 18: 4016–4027.
 19. Ferrari S, Briccoli A, Mercuri M, Bertoni F, Cesari M, et al. (2006) Late relapse in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 28: 418–422.
 20. Kim MS, Cho WH, Song WS, Lee SY, Jeon DG (2007) time dependency of prognostic factors in patients with stage II osteosarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 463: 157–165.
 21. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD (2008) Autologous fat transfer—a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61: 1438–1448.
 22. Delay E, Gosset J, Toussoun G, Delaporte T, Delbaere M (2008) [Efficacy of lipomodelling for the management of sequelae of breast cancer conservative treatment]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 153–168.
 23. Gosset J, Flageul G, Toussoun G, Guerin N, Tourasse C, et al. (2008) [Lipomodelling for correction of breast conservative treatment sequelae. Medicolegal aspects. Expert opinion on five problematic clinical cases]. *Ann Chir Plast Esthet* 53: 190–198.
 24. Mojallal A, Saint-Cyr M, Garrido I (2009) Autologous fat transfer: controversies and current indications for breast surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62: 708–710.
 25. Motrescu ER, Rio MC (2008) Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*.
 26. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M (2000) Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope* 110: 1333–1338.
 27. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 572–577.
 28. Vona-Davis L, Rose DP (2009) Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 193–201.
 29. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, et al. (2006) Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21: 1648–1656.
 30. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007) Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6: 2609–2617.
 31. Lamoureux F, Picarda G, Rousseau J, Gourden C, Battaglia S, et al. (2008) Therapeutic efficacy of soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B-Fc delivered by nonviral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 7: 3389–3398.
 32. Pearce RN, Sordillo EM, Yacoby S, Wong BR, Liau DF, et al. (2001) Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11581–11586.
 33. Zhang J, Dai J, Yao Z, Lu Y, Dougall W, et al. (2003) Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB Fc diminishes prostate cancer progression in bone. *Cancer Res* 63: 7883–7890.
 34. Croucher PJ, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 98: 3534–3540.
 35. Heath DJ, Vanderkerken K, Cheng X, Gallagher O, Prideaux M, et al. (2007) An osteoprotegerin-like peptidomimetic inhibits osteoclastic bone resorption and osteolytic bone disease in myeloma. *Cancer Res* 67: 202–208.
 36. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Koziarzki I, Komarova SV, et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692–696.
 37. Morony S, Capparelli C, Sarosi I, Lacey DL, Dunstan CR, et al. (2001) Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngenic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Res* 61: 4432–4436.
 38. Schwarz EM, Ritchlin CT (2007) Clinical development of anti-RANKL therapy. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1: S7.
 39. Gimble JM, Nuttall ME (2004) Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine* 23: 183–188.
 40. Carriere A, Ebrahimian TG, Dehez S, Auge N, Joffre C, et al. (2009) Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1093–1099.
 41. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292–1298.
 42. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, et al. (2008) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32: 48–55; discussion 56–47.
 43. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*.
 44. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT (2009) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett* 281: 32–41.
 45. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, et al. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837–3844.
 46. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, et al. (2006) Earlier onset of syngenic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 82: 1060–1066.
 47. Damies C, Grimaud E, Rousselle AV, Charrier C, Fortun Y, et al. (2000) Cysteine protease production by human osteosarcoma cells (MG63, SAOS2) and its modulation by soluble factors. *Cytokine* 12: 539–542.
 48. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, et al. (2009) Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 29–41.
 49. Lazenec G, Jorgensen C (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26: 1387–1394.
 50. Ponte AL, Marais E, Gally N, Langonne A, Delorme B, et al. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737–1745.
 51. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, et al. (2004) Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11: 1155–1164.
 52. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, et al. (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203: 1235–1247.
 53. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D (2009) Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 69: 1255–1258.
 54. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, et al. (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98: 316–325.
 55. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, et al. (2005) Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7: 967–976.
 56. Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, et al. (2008) Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J* 175: 69–75.
 57. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M (2007) Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 699–710.
 58. Varani J, Lovett EJ, 3rd, Lundy J (1981) A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery. *J Surg Oncol* 17: 9–14.

OSTEOSARCOME, CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES, TISSU ADIPEUX : INTERACTIONS DANS DES APPROCHES DE RECONSTRUCTION TISSULAIRE.

Mots clés : Ostéosarcome, cellules souches mésenchymateuses, tissu adipeux, reconstruction osseuse, microenvironnement tumoral, lipomodélage.

La réponse au traitement de référence de l'ostéosarcome (chimiothérapie et chirurgie) est insuffisante. Nous avons proposé d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses (CSM) comme vecteur de molécules anti-résorption osseuse telles que l'ostéoprotégérine (OPG) ou le récepteur activateur de NF- κ B (Rank) sous une forme soluble (Rank-Fc). Par leurs propriétés de différenciation vers la voie ostéoblastique, ces cellules pourraient également participer à la reconstruction du tissu osseux souvent dégradé près du site tumoral. Une des questions les plus controversées concerne le pouvoir inhibiteur ou stimulateur des CSM sur la croissance tumorale, qui semble variable selon l'origine des CSM utilisées, le site de la tumeur et le type de cellules tumorales employées. Concernant l'ostéosarcome, nos résultats montrent soit un effet pro-tumoral, soit un effet pro-métastatique. Les cellules d'origine mésenchymateuses semblent jouer un rôle central dans le microenvironnement des cellules tumorales. Elles pourraient être responsables des récurrences locales tardives ou des évolutions métastatiques différées. Un cas clinique de récurrence locale tardive d'ostéosarcome 13 ans après la pathologie initiale et 18 mois après lipomodélage de la région concernée a été observé au CHU de Nantes. L'injection de graisse autologue à proximité de cellules quiescentes potentiellement tumorales provoque une modification majeure du microenvironnement (apport d'adipocytes et d'Ad-CSM, sécrétant de multiples cytokines), ce qui conduit à se poser la question de l'innocuité du lipomodélage dans un contexte post-tumoral.

OSTEOSARCOMA, MESENCHYMAL STEM CELLS, ADIPOSE TISSUE : INTERACTIONS IN TISSUE RECONSTRUCTION.

Keywords: Osteosarcoma, mesenchymal stem cells, adipose tissue, bone reconstruction, tumor microenvironment, lipomodelling.

The response to standard treatment for osteosarcoma (chemotherapy and surgery) is insufficient. The mesenchymal stem cells (MSCs) or osteoblast precursors may be used as vectors to produce anti-bone resorption molecules like osteoprotegerin (OPG) or receptor activator of NF- κ B (RANK) soluble form (Rank -Fc). Due to their properties to differentiate into osteoblasts, these cells could also participate in the reconstruction of bone tissue often damaged near the tumor site. One of the most controversial issues concerns the pro-tumor or anti-tumor effect of MSCs depending on either MSC origin or tumor type. On osteosarcoma, our results show either a local pro-tumor effect or a pro-metastatic effect. The MSCs seem to play a central role in the microenvironment of tumor cells. They may be responsible for late local recurrence or metastatic developments delayed. We report a clinical case of late local recurrence of osteosarcoma 13 years after the initial disease and 18 months after lipofilling. The autologous fat injection causes a major modification of the microenvironment of potential quiescent tumor cells. The intake of fat cells and Ad-CSM secreting multiple cytokines may influence the tumor progression and metastasis, this which leads to the question of the safety of lipofilling in a post-neoplastic context.

Pierre PERROT
15, rue Maurice Guichard
44100 Nantes