

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE et conjointement dans les locaux :

- d'**Atlantic Bone Screen SAS**
- du **Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives - INSERM UMR 957 - EA 3822**



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur François Gouin, qui a accepté de prendre en charge la responsabilité de ce projet.

Un grand merci à M. Luc Sensébé, M. Philippe Galera, M. Marc Denis (merci pour le suivi de thèse et les séquençages !) et Mme Elisabeth Miot-Noirault pour avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance de thèse. Je remercie chaleureusement Mme Anne Brouchet pour son intérêt pour mon travail. Je tenais également à remercier M. Jean-Christophe Pagès, M. Frédéric Deschaseaux et toutes les équipes participant au programme MoDICSOME (Région Centre/FEDER) pour leur collaboration avec notre unité et leurs travaux sur les micro-RNA, qui m'ont permis de réaliser mes travaux sur le miR-152.

Merci infiniment à Atlantic Bone Screen de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux en tant que membre à part entière de l'entreprise. Je remercie en particulier M. Ronan Le Bot pour m'avoir donné ma chance et m'avoir soutenu durant les trois années de ce projet qui ne s'est pas toujours déroulé comme prévu (l'entreprise est sur de bons rails, bonne chance!). Un grand merci également à Alexandrine pour sa participation active au projet BCS et l'aide précieuse qu'elle m'a apporté durant la première partie de ma thèse. Je remercie aussi tout le personnel d'ABS : Cécile (merci pour les Olympiades, tartiflettes et autres évènements festifs, c'était une chouette ambiance !), Véro (la Reine du vivo ! Merci pour les formations et tes conseils avisés ! En espérant que tu aies un autre calendrier cette année !), Tiphaine, Hélène (qPCR forever !), Marie, Amélie et Laeti (l'équipe histo de choc !), Flo, Elodie (bon courage pour la fin de ta thèse ! Ca se passera bien, c'est sûr !), Elisabeth, les membres passés (Fabien, Isabelle, Sébastien) et les nouvelles arrivantes Stéphanie, Florence, Fanny, Marie-Amélie. Du côté des chimistes, merci à Maxim pour ses discussions sur la chimiothérapie (et sur bien d'autres sujets !), à Maud, Aude, Sylvie, Mickael, Jean-Yves, Eden, Clément, Mathilde, aux nouveaux arrivants et aux « ex-ACP » : Nolwenn (best Florence Foresti EVER !), Bertrand, Max. Et merci aussi aux anciens membres du LPRO qui ont rejoint les rangs d'Atlanthera cette année : Manue (merci de m'avoir accueilli à mon arrivée au LPRO ! Tes conseils m'ont été très utiles. Bonne continuation avec toute la petite famille !) et Julien (Merci pour tous les instants sympas qu'on a passé au labo et aussi parfois dehors, à parler films, musique, Kaamelott et autres... Bonne chance pour la suite !). Maintenant que vous

êtes bien installés, profitez-bien des nouveaux locaux (quel déménagement épique !), bon courage à tous !

Je remercie également toutes les personnes ayant participé au projet BCS :

- Mme Soraya Saiagh, M. Sylvain Bercegeay, Mme Amélie Bellec et Mme Stéphanie Ponsolle de l'UTCG. Merci pour le travail colossal que vous avez réalisé avec toutes les cultures de biopsies. Le projet BCS, c'est surtout vous, bravo !
- Le personnel hospitalier du pôle ostéo-articulaire et des services d'oncopédiatrie du CHU de Nantes pour avoir permis la réalisation des prélèvements nécessaires au bon déroulement du projet.
- Mme Marine Biger, qui a rassemblé toutes les données cliniques à notre intention.
- Le docteur Laurence Lodé et son laboratoire, pour les PCR p53 et le génotypage des lignées.
- Le professeur Philippe Piloquet et son équipe pour les caryotypes et l'aide qu'il m'a apporté pour les analyser.
- Mme Françoise Gros, du plateau technique de génomique de l'IRS-UN, pour le séquençage p53 et la mise à disposition des équipements pour TLDA.
- Mme Marie-Françoise Heymann pour son travail en anatomopathologie.

Enfin, un immense merci à tous les patients qui ont donné leur consentement pour participer à cette étude dans l'espoir d'aider la recherche à améliorer leur condition. Merci pour la confiance que vous placez en nous et pour l'espoir que vous donnez aux autres malades.

Je me tourne maintenant vers le LPRO, où j'ai passé la grande majorité de mon temps ces trois dernières années. Tout d'abord, un grand merci au professeur Dominique Heymann de m'avoir accueilli dans son unité et de m'avoir permis de conduire tous mes travaux dans ce laboratoire (merci pour tout ce que tu fais pour les doctorants, stagiaires et chaque membre du labo !). Un merci tout particulier à Frédéric Blanchard pour avoir été mon co-directeur de thèse (Fred, merci infiniment pour ta disponibilité, tes conseils, ton aide précieuse et ton soutien en toute circonstance et surtout dans les moments difficiles... Ces trois années passées à travailler avec toi auront été extrêmement agréables et enrichissantes, merci pour tout et tous mes vœux dans tous les domaines!). Merci enfin à tous les membres du laboratoire :

- Les doctorants qui ont terminé ou presque : Bérengère (félicitations et bon courage pour le post-doc ! Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite !), Luis (la petite

famille continue de s'agrandir... Beaucoup de bonheur à tous !) et Jimmy (bonne chance à toi pour la fin de la thèse!).

- Les doctorants actuels qui ont repris le flambeau et à qui j'adresse tout mon soutien et mes vœux de réussite : Anne-Laure (Bon courage pour la fin de ton projet, un ultime effort !), Aude (pour les bons moments passés en salle de culture, avec nos super playlists ! Merci pour ton soutien et bonne chance !), Lidia (pour la touche de soleil et de dynamisme que tu apportes dans le labo !) Romain (quelle classe Monsieur Guiho ! Je ne suis pas sûr que ma musique te manquera, mais en tout cas bonne continuation !), Pierre (le boss des mots fléchés, quelle culture !) et Audrey L. (les talons-hauts dans les sur-chausses, ça m'aura toujours impressionné ! Bon courage pour la dernière année !).
- Les tout-fraîchement M2 devenus thésards, Camille, Marie-Astrid et Benjamin, avec toutes mes félicitations (vous le méritez vraiment !). Merci à tous les trois pour votre bonne humeur et votre gentillesse, et bonne thèse ! Bon courage aussi à Christelle pour sa thèse de médecine. Une petite pensée pour les nombreux M1 de cette année, en espérant qu'ils trouvent tous la voie qui leur plaira.
- Joséphine, ma « petite » stagiaire deux années de suite. Merci pour ton excellent travail qui m'a énormément aidé, ton dynamisme et ton goût pour la recherche. Bonne chance pour la suite de ton parcours ! Merci aussi au petit Eliott de m'avoir supporté pendant une semaine de stage ; bonne chance pour le lycée ! Merci également aux élèves de 1^{ère} S du lycée Ste Marie de Cholet et à Laurène pour la belle aventure du Passeport Recherche.
- Les techniciens, sans qui l'ambiance au labo ne serait pas ce qu'elle est : Régis (merci pour ta disponibilité, ton immense générosité et tout ce que tu fais pour le labo, tu es irremplaçable ! C'était très agréable de travailler à tes côtés, merci pour tout !), Audrey R. (fournisseuse officielle de MSC et « tortionnaire de rongeurs », mais c'est pour leur bien... Merci pour les bons moments passés à faire le ménage, on était une bonne team !), Gwen, Florian (alors comme ça d'ABS on passe au LPRO... Bonne chance pour la suite !) Julie C. pour son aide en vivo, Kévin et Rachel pour l'histologie.
- Les ingénieurs : Martine pour son aide incomparable en biologie moléculaire (pour les heures passées à essayer d'interpréter des résultats parfois « étranges », pour les designs de primers, les conseils techniques... Merci beaucoup et bonne retraite!), Jérôme (mon voisin de bureau pendant trois ans ! « Histologue en chef », analyste

d'images, pêcheur à ses heures perdues et fan inconditionnel de François Pignon...
Tous mes vœux de bonheur avec ta petite famille, et bonne chance pour la suite !),
Céline, Séverine, Eric et Mathias pour leur disponibilité et leurs conseils.

- Verena, pour avoir été une très agréable « voisine de bureau d'en face » et avec qui j'ai eu des discussions toujours intéressantes sur beaucoup de domaines. Bonne chance avec ABS ! Je remercie aussi les autres post-docs présents (Meadhbh, Marta) et passés (Kosei, avec qui j'ai passé de très bons moments. « Arigatou gozaimashita ! »).
- Merci à Béné, Marco, François et Ben pour leurs conseils sur les post-docs.
- Merci à tous les « chefs » pour leur sympathie et leur disponibilité : Valérie (merci de m'avoir encadré sur une bonne partie du projet miR-152), Françoise, Fred L., Franck, Pierre.
- Merci à Sandrine, Annie, Marie-Hélène et Nathalie pour leur aide dans les tâches administratives, et à Laurent pour le travail qu'il fournit au laboratoire au quotidien.
- Je remercie également l'équipe de l'UTE pour toute la partie expérimentation animale : Guylène, Pierre et Yohann.
- Une pensée enfin pour les anciens doctorants (Gatien, Sandrine, Thomas, Carmen, les deux Julie, Pierre, Steven) et pour la famille de Marc Padrines.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une mention spéciale à tous mes amis (trop nombreux pour être cités ici, ne m'en voulez pas !) de Nantes (des Waraeba et de l'AJFJ, de NNO et de Pix'N Joy mais aussi des Z'involtes !), de Toulouse (la team GBA – bon courage à toutes et tous pour la suite de vos projets !, les amis de la fac), de Lund (bon courage Tivi pour la fin de ta thèse !), et surtout à mes amis du lycée (depuis toutes ces années, vous êtes toujours là ! Merci pour tout !). Je vous adresse à tous un immense remerciement pour votre écoute, votre compréhension et pour tous les moments passés avec vous durant ces dernières années.

Mes dernières pensées vont enfin vers ma famille, pour leur soutien et leurs encouragements dans tous mes projets et pour m'avoir toujours permis de les réaliser. Cette thèse leur est dédiée, et en particulier à mes parents, ma sœur Marion et mon frère Sacha.

Table des matières

INTRODUCTION	1
1^{ère} Partie : Physiologie des tissus osseux et cartilagineux.....	2
I. Le tissu osseux.....	3
A. Fonctions et organisation macroscopique	3
B. Organisation microscopique	4
1. Les cellules osseuses	4
2. La matrice extracellulaire.....	7
II. Le tissu cartilagineux	8
A. Structure du cartilage	9
1. La matrice extracellulaire.....	9
2. Le périchondre.....	9
B. Classification et localisation des cartilages	10
C. Le chondrocyte	11
1. Croissance du cartilage.....	11
2. Organisation cellulaire	11
3. Fonctions	12
III. Croissance et remodelage de l'os.....	12
A. La croissance osseuse.....	12
1. L'ossification endochondrale	12
2. Autres types d'ossification	15
B. Le remodelage osseux	16
IV. Les cellules souches mésenchymateuses	19
A. Propriétés et applications thérapeutiques	19
B. La différenciation ostéoblastique.....	22
C. La différenciation chondrocytaire	23
D. La différenciation adipocytaire	25
E. MicroARN et différenciation mésenchymateuse.....	26
1. Définition et biosynthèse des microARNs chez les mammifères.....	26
2. MiRNA et différenciation ostéoblastique.....	28
3. MiRNA et différenciation chondrocytaire.....	29
4. MiRNA et différenciation adipocytaire.....	30
2^{ème} Partie : Les tumeurs osseuses primitives	31
I. Origine cellulaire des TOP	33
A. Ostéosarcomes et chondrosarcomes	33
B. Sarcomes d'Ewing.....	33

II. Le chondrosarcome	35
A. Généralités	35
B. Classification	35
1. Les chondrosarcomes primaires	35
2. Les chondrosarcomes secondaires.....	39
C. Diagnostic.....	42
D. Aspects génétiques	42
E. Traitement.....	45
F. Chondrosarcome et chimiorésistance.....	46
1. Causes intrinsèques de la chimiorésistance des CS	47
2. Causes extrinsèques de la chimiorésistance des CS	48
III. L'ostéosarcome.....	50
A. Epidémiologie	50
B. Localisations.....	50
C. Caractéristiques et classification histologique.....	51
1. Les ostéosarcomes centraux	52
2. Les ostéosarcomes de surface.....	53
D. Diagnostic	54
E. Etiologie	55
1. Ostéosarcome et croissance.....	55
2. Pathologies prédisposant à l'ostéosarcome	55
3. Anomalies cytogénétiques fréquentes	55
F. Traitement.....	56
1. Voies thérapeutiques classiques	56
2. Thérapies de différenciation.....	59
G. MicroARN et ostéosarcome	61
1. Tumorigenèse	62
2. Potentiel métastatique	63
3. Réponse aux traitements.....	63
4. Voies thérapeutiques potentielles	64
3^{ème} Partie : Objectifs de la thèse	67
RESULTATS.....	70
1^{ère} Partie : Différenciation des chondrosarcomes et chimiorésistance	71
I. Le projet Bone Cell Supplier.....	72
A. Introduction.....	72
B. Méthodologie	73
II. Article scientifique	75

III. Compléments de discussion.....	95
A. Matrice cartilagineuse et chimiorésistance.....	95
1. Le modèle de chondrogenèse <i>in vitro</i>	95
2. Le cartilage comme barrière physique à la diffusion des drogues.....	97
B. Résultats complémentaires du projet BCS	98
1. Recherche de marqueurs moléculaires discriminants dans les lignées d'OS, de CS et d'ES.	98
2. Culture cellulaire	100
3. Modèles animaux	102
4. Conclusions	104
2^{ème} Partie : Effets du miR-152 sur le développement de l'ostéosarcome	106
I. Introduction	107
II. Matériel et méthodes	109
A. Culture cellulaire.....	109
B. Transduction lentivirale <i>in vitro</i>	109
C. RT-PCR quantitative (RT-qPCR).....	110
D. Analyse bioinformatique.....	112
E. Suivi de la prolifération de cellules en culture.....	113
F. Test de chimiosensibilité <i>in vitro</i>	113
G. Différenciation ostéoblastique.....	113
H. Induction de développement tumoral chez la souris Nude.....	114
I. Histologie.....	114
J. Analyses statistiques.....	117
III. Résultats.....	117
A. Induction de la surexpression du miR-152 dans des lignées d'OS.....	117
B. Identification des cibles principales du miR-152 dans la lignée HOS miR152.....	119
C. Effet du miR-152 sur le phénotype de la lignée HOS en culture.....	120
D. Développement du modèle murin HOS miR152.....	121
E. Effet du miR-152 sur l'ostéolyse para-tumorale.....	123
F. Effet <i>in vivo</i> du miR-152 sur la différenciation.....	124
G. Analyses histologiques des tumeurs miR152.....	125
IV. Discussion.....	125
CONCLUSION GENERALE	132

Table des illustrations

Figure 1 - Organisation macroscopique du tissu osseux	4
Figure 2 - Histologie du tissu osseux	5
Figure 3 - Ostéoclaste exerçant son activité de résorption d'un os (microscopie électronique à balayage).....	6
Figure 4 - Histologie des trois différents types de cartilage	10
Figure 5 - Ossification endochondrale	14
Figure 6 - Les différentes étapes du cycle de remodelage osseux.....	16
Figure 7 - Implication de la triade RANK/RANKL/OPG dans la différenciation ostéoclastique.....	17
Figure 8 - Principaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle des voies de différenciation mésenchymateuse.....	20
Figure 9 - Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation ostéoblastique (d'après (66))	22
Figure 10 - Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation chondrocytaire	24
Figure 11 - Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation adipocytaire	26
Figure 12 - Biosynthèse des microARN chez les mammifères (adapté de (97)).....	27
Figure 13 - Origine des ostéosarcomes, des chondrosarcomes et des sarcomes d'Ewing.....	34
Figure 14 - Classification par grade histologique des CS conventionnels centraux (adapté de (147))	36
Figure 15 - Histologie des chondrosarcomes primaires (coloration hématoxyline/éosine, d'après (141,147))	38
Figure 16 - Développement de CS secondaires à partir de tumeurs cartilagineuses bénignes	41
Figure 17 - Rôle des enzymes IDH1 et IDH2 dans le cycle des acides tricarboxyliques.....	43
Figure 18 - Interconnexion des voies RB et p53 par les protéines p16INK4A et p14ARF.....	44
Figure 19 - Origines intrinsèques et extrinsèques possibles de la chimiorésistance des chondrosarcomes	49
Figure 20 - Incidence des tumeurs osseuses primitives malignes en fonction de l'âge (adapté de (126))	50
Figure 21 - Histologie des ostéosarcomes centraux (hématoxyline/éosine, d'après (231,235)).....	53
Figure 22 - Protocoles de chimiothérapie utilisés pour le traitement des OS en France	58
Figure 23 - Maturité des ostéoblastes et tumorigenèse des ostéosarcomes (adapté de (130)).....	59
Figure 24 - Dérégulation des microARN dans les cancers (adapté de (273))	61
Figure 25 - Méthodologie appliquée pour l'établissement de modèles tumoraux osseux dans le cadre du projet BCS	73
Figure 26 - Perte de l'expression d'EWS-FLI1 dans les cellules dérivées de la mise en culture de la biopsie BCSEW33.....	102
Figure 27 - Histologie de la tumeur humaine BCSOS11 et de sa xéno greffe murine.....	103
Figure 28 - Suivi des cultures de xéno greffe murine BCSOS11 et BCSCH01	104
Figure 29 - Surexpression du miR-152 dans une lignée d'ostéosarcome	121
Figure 30 - Impact de la surexpression du miR-152 sur les HOS en culture.	121
Figure 31 - Conséquences de la surexpression du miR-152 sur la tumorigenèse en souris Nude.....	121
Figure 32 - Impact de la surexpression du miR-152 sur les propriétés ostéolytiques du modèle HOS murin (première manipulation).....	123

Figure 33 - Analyse par RT-qPCR de l'expression du VEGFA et de marqueurs impliqués dans les voies de différenciation ostéoblastique (RUNX2, OSTX, COL1, BSP, SOST) et adipocytaire (PPARGC1A, PPARG, FABP4) dans les tumeurs HOS shLacZ et miR152 (première manipulation).....	124
Figure 34 - Analyses histologiques réalisées sur les tumeurs HOS shLacZ et miR152 (première manipulation).....	126
Figure 35 - Rôle central de la matrice cartilagineuse des chondrosarcomes dans leur mécanisme de chimiorésistance (adapté de (329))	135
Figure 36 - Mode d'action hypothétique du miR-152 sur l'ostéoblastogenèse et connexion avec les voies de régulation de RUNX2 et PPAR γ (adapté de 66,93,192,337)).....	139

Tableau 1 - Exemples de microRNA dérégulés dans les tumeurs osseuses primitives malignes et capacités de différenciation des lignées dérivées de ces pathologies	65
Tableau 2 - Profils d'expression des lignées cellulaires du laboratoire pour les marqueurs moléculaires mésenchymateux, souche et pour EWS-FLI1	99
Tableau 3 - Données cliniques relatives aux patients prenant part au projet BCS (hormis les CS), résultat des cultures et des transplantations chez l'animal	101
Tableau 4 - Réaction de Reverse-Transcription spécifiques du miR-152 et du contrôle U6B.....	110
Tableau 5 - Réaction de RT-qPCR spécifiques du miR-152 et du contrôle U6B	111
Tableau 6 - Séquences des amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR quantitatives	112
Tableau 7 - Anticorps utilisés pour les colorations immunohistochimiques Caspase 3 active et Ki67.....	116
Tableau 8 - Identification des processus biologiques impliquant des cibles du miR-152 chez l'homme par analyse d'enrichissement fonctionnel (DAVID).....	119

Liste des Abréviations

α-KG : alpha-cétoglutarate	MEC : Matrice extracellulaire
ABC : ATP-binding cassette	miRISC : microARN-induced silencing complex
ACAN : Aggrécane	miRNA : MicroARN
ADN : Acide désoxyribonucléique	MMP : Matrix metalloproteinase
ALP : Phosphatase alcaline	MO : Ostéochondromatose multiple
ARN : Acide ribonucléique	MRP : Multidrug resistant proteins
ATP : Adénosine triphosphate	MSC : Cellules souches mésenchymateuses
BCS : Bone Cell Supplier	NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
BSP : Sialoprotéine osseuse	OC : Ostéocalcine
BMP : Bone morphogenetic protein	OPG : Ostéoprotégérine
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein	OPN : Ostéopontine
CD : Cluster of differentiation	OS : Ostéosarcome
CDK : Cyclin-dependent kinase	OSTX : Osterix
CIS : Cisplatine	Pgp : Glycoprotéine P
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	PPARγ/PPARG : Peroxysome proliferator activated-receptor gamma
COLLn : Collagène de type n	PPARGCA1 : PPARG, coactivator alpha-1
COMP : Cartilage oligomeric matrix protein	PTH : Hormone parathyroïdienne
CS : Chondrosarcome	PTH LH : Parathyroid hormone-like hormone
D2HG : D-2-hydroxyglutarate	RANK : Receptor activator of NF κ B
DMP1 : Dentin matrix protein 1	RANKL : Receptor activator of NF κ B ligand
DOX : Doxorubicine	RFP : Red fluorescent protein
ES : Sarcome d'Ewing	RT-qPCR : RT-PCR quantitative
FABP4 : Fatty acid-binding protein 4	RUNX2 : Runt-related transcription factor
FGF : Fibroblast growth factor	SHH : Sonic Hedgehog
GAG : Glycosaminoglycanes	siRNA : Small interfering RNA
HIF : Hypoxia-inducible factor	SOST : Sclérostine
IAP : Inhibitor of apoptosis protein	SOXn : SRY-related high-mobility group box n
IGF : Insulin-like growth factor	TGF : Transforming growth factor
IHH : Indian Hedgehog	TNF : Tumor necrosis factor
IL : Interleukine	TOP : Tumeurs osseuses primitives
LPL : Lipoprotein lipase	TRAP : Tartrate resistant acid phosphatase
MAF : Mafosfamide	VEGF : Vascular endothelial growth factor
MAP : Mitogen Activated Protein	
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor	
MDR : Multiple drug resistance	

INTRODUCTION

1^{ère} Partie :

**Physiologie des tissus osseux et
cartilagineux**

I. Le tissu osseux

A. Fonctions et organisation macroscopique

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

Il exerce quatre fonctions principales :

- Une fonction mécanique, en assurant le soutien du corps et le maintien des organes grâce à sa grande résistance (1).
- Une fonction métabolique, assurée par un remodelage constant. Ce processus dynamique s'accompagne de la libération de sels minéraux et d'hormones comme le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) (2) ou l'ostéocalcine (OC) (3) qui jouent respectivement des rôles importants dans le contrôle du métabolisme minéral (phosphocalcique) et énergétique (du glucose) (4).
- Une fonction hématopoïétique, grâce à ses espaces médullaires qui contiennent la moelle hématopoïétique à l'origine des cellules du sang (1).
- Une fonction immunologique, la moelle osseuse abritant d'importantes sous-populations de cellules immunitaires effectrices ou mémoire (5).

Il existe trois types d'os dans le squelette humain, classés selon leur forme générale : les os longs (fémur, tibia, humérus), les os courts (phalanges, vertèbres) et les os plats (sternum, côtes). Les os longs chez l'adulte servent classiquement de modèle pour décrire la structure de l'os (figure 1), et sont formés de plusieurs parties :

- Une partie centrale et cylindrique, la diaphyse.
- Deux extrémités recouvertes de cartilage articulaire, les épiphyses.
- Les interfaces entre la diaphyse et chaque épiphyse, les métaphyses.

On distingue dans l'organisme deux types de tissu osseux, selon leur degré de porosité :

- L'os compact ou cortical, aussi nommé lamellaire haversien, est un tissu dense de 5 à 30% de porosité que l'on observe au niveau de la couche externe des os. Il est constitué en grande partie de systèmes de Havers ou ostéons, des unités cylindriques mesurant de 100µm à 1mm de diamètre et pouvant atteindre jusqu'à 1 cm de

longueur. Ces ostéons sont formés par l'empilement de fibres de collagène disposées en lamelles concentriques autour du canal de Havers où circulent un capillaire sanguin et une fibre nerveuse amyélinique. Les canaux de Havers communiquent entre eux ainsi qu'avec la cavité médullaire grâce à des canaux obliques, les canaux de Volkmann.

- L'os spongieux ou trabéculaire, aussi nommé lamellaire non haversien, a un degré de porosité de 30 à 90%. Il se situe principalement au niveau des métaphyses et épiphyses des os longs et constitue la majeure partie des os courts et plats. Il se compose d'un assemblage de plaques osseuses réunies par des piliers. Les interstices ainsi formés contiennent la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse.

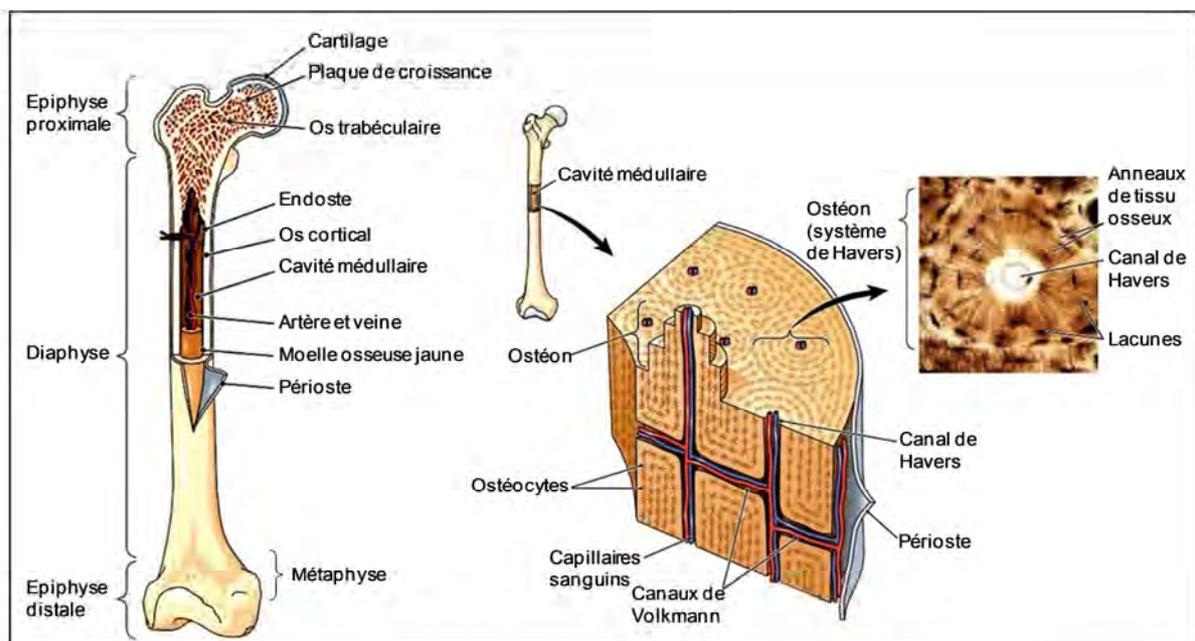


Figure 1 – Organisation macroscopique du tissu osseux

La partie externe de l'os cortical, excepté au niveau des surfaces articulaires et des endroits d'insertion des ligaments et des tendons, est recouverte par le périoste. Cette membrane se compose d'une couche externe fibreuse hautement vascularisée et d'une couche interne cellulaire apportant les progéniteurs des ostéoblastes et ostéoclastes. Plus proche de la cavité médullaire, la face interne de l'os cortical est recouverte par une membrane de tissu conjonctif, l'endoste (6).

B. Organisation microscopique

1. Les cellules osseuses

Il existe cinq principales catégories de cellules dans le tissu osseux.

Les cellules ostéoprogénitrices ou préostéoblastes dérivent directement des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules allongées sont capables de se diviser mais ne peuvent pas encore minéraliser la matrice extracellulaire (MEC) du tissu osseux. Elles expriment quelques marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique, tels que le collagène de type I (COLL1) et la phosphatase alcaline (ALP) (7).

Les ostéoblastes (figure 2) sont issus de la différenciation des préostéoblastes. Ils sont responsables de la synthèse et de la minéralisation de la MEC osseuse durant la croissance et de son renouvellement chez l'individu adulte (8). Ces cellules ont une activité de division très réduite mais leur cytoplasme riche en organites leur permet de réaliser un grand nombre de synthèses protéiques. Elles communiquent entre elles par de nombreuses jonctions communicantes et reposent sur le tissu ostéoïde, une couche non minéralisée constituée de collagène, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAG). Une fois matures, les ostéoblastes libèrent l'ALP, une enzyme capable d'hydrolyser des esters phosphoriques qui inhibent le processus de minéralisation (9). Ils sécrètent également les protéines osseuses présentes dans la matrice extracellulaire : le COLL1, la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine (OPN) et l'ostéocalcine (OC) (10,11). Ils synthétisent aussi des facteurs de croissance qui régulent leur propre métabolisme et des facteurs paracrines influençant le métabolisme des cellules voisines et qui stimulent notamment la formation ou l'activité des ostéoclastes (12).

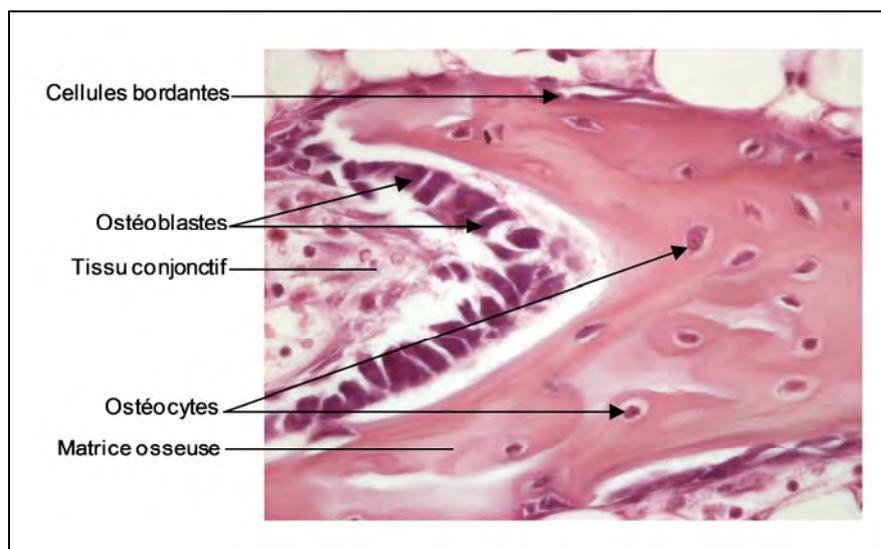


Figure 2 – Histologie du tissu osseux

Les cellules bordantes (figure 2) sont des ostéoblastes inactivés, ou quiescents. Elles forment sur les surfaces trabéculaires une monocouche de cellules aplaties ou fusiformes

contenant peu de cytoplasme et peu d'organites, exerçant par conséquent une activité de synthèse réduite. Leur principale fonction est d'assurer la communication entre les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse et leur environnement cellulaire. Elles sont également capables de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs (13).

L'ostéocyte (figure 2) apparaît une fois l'ostéoblaste emmuré dans la matrice osseuse minéralisée. Situées dans une logette, l'ostéoplaste, ces cellules très abondantes dans l'os mature sont reliées les unes aux autres ainsi qu'aux cellules bordantes par un réseau de canalicules dans lesquels elles émettent de fins prolongements cytoplasmiques (7). L'ostéocyte a un niveau d'activité métabolique bien inférieur à celui de l'ostéoblaste, mais joue un rôle-clé du fait de sa localisation dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux et influençant son métabolisme (14).

L'ostéoclaste (figure 3) est une grande cellule multinucléée (2 à 30 noyaux) issue de la fusion de cellules mononucléées d'origine hématopoïétique dérivées de la lignée monocyte/macrophage (15). Ses enzymes protéolytiques, telles que la cathepsine K, la TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase), des collagénases ou des métalloprotéases, sont responsables de la dégradation de la fraction organique de la MEC osseuse (16), et l'action de ses pompes à protons ATP-dépendantes permet la solubilisation de la fraction minérale de la MEC osseuse par acidification (17). La membrane basale de la cellule en contact avec l'os présente une succession d'expansions et d'invaginations permettant de nombreux échanges métaboliques. La zone de contact avec l'os, appelée « zone claire », est dénuée de tout organite et constitue le siège du mécanisme de résorption osseuse (18).

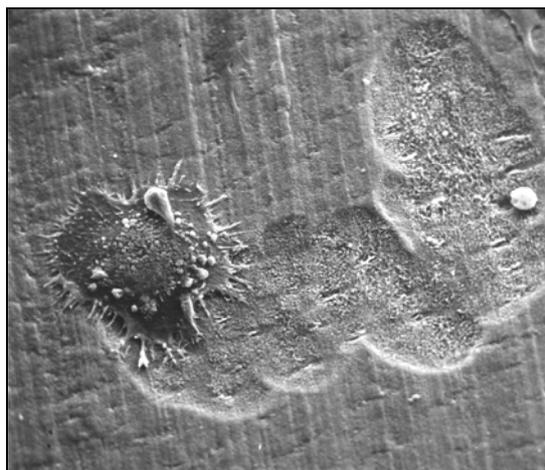


Figure 3 – Ostéoclaste exerçant son activité de résorption d'un os (microscopie électronique à balayage)

2. La matrice extracellulaire

2.1. Fraction organique

La fraction organique de la MEC représente 22% de la masse osseuse.

Elle se compose principalement d'une partie fibrillaire (90%) formée en majeure partie de COL1, macromolécule synthétisée par les ostéoblastes et résultant de l'assemblage de trois chaînes alpha de polypeptides. L'orientation des fibrilles de collagène dans le tissu osseux est responsable de la capacité de l'os à résister aux tensions mécaniques. La partie fibrillaire est également constituée d'élastine, qui exerce comme le COL1 un rôle structural, et de fibronectine, impliquée dans l'organisation de la MEC et l'adhésion cellulaire.

La substance interfibrillaire ne représente que 10% de la fraction organique de la MEC du tissu osseux. Elle englobe les glycosaminoglycanes et protéoglycanes, une faible quantité de lipides ainsi que des petites protéines non collagéniques :

- L'ostéocalcine (OC), sécrétée par les ostéoblastes, est impliquée dans le processus de minéralisation ainsi que dans la régulation de l'homéostasie calcique et de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes (19).
- L'ostéopontine (OPN) est une protéine reliant l'hydroxyapatite de la fraction minérale de la MEC aux cellules osseuses (20). Selon son état de phosphorylation, elle exerce un effet inhibiteur sur le processus de minéralisation en empêchant le dépôt des cristaux d'hydroxyapatite sur les fibres de collagène de la MEC osseuse (21).
- La sialoprotéine osseuse (BSP) est impliquée dans la minéralisation initiale de l'os. En se déposant sur la MEC, elle facilite la formation des cristaux d'hydroxyapatite (22).

On retrouve également en petite quantité dans la fraction organique de la MEC osseuse des facteurs de croissance et des cytokines tels que le Transforming Growth Factor (TGF), l'Insulin-like Growth Factor (IGF), des interleukines (IL) et des Bone Morphogenetic Proteins (BMP). Ces facteurs protéiques jouent un rôle central dans l'activation et la différenciation cellulaire et interviennent dans le couplage entre formation et résorption osseuse.

2.2. Fraction minérale

Constituant environ 65% de la matrice osseuse, elle confère à l'os sa rigidité, sa résistance mécanique et représente la plus importante réserve minérale de l'organisme. Environ 99% du calcium de l'organisme, 85% du phosphore et entre 40 et 60% du sodium et du magnésium sont en effet incorporés dans les cristaux qui constituent la substance minérale osseuse ; ces minéraux sont ensuite rapidement mobilisables grâce au processus de remodelage osseux. Elle est essentiellement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) disposés dans les espaces interfibrillaires. Leur nombre et leur taille s'accroissent lentement au cours du processus de minéralisation.

Le processus de minéralisation fait intervenir les vésicules matricielles, qui se forment par bourgeonnement à la surface des ostéoblastes probablement en réponse aux taux intracellulaires de calcium et extracellulaires de phosphate. Ces vésicules sont riches en plusieurs phospholipides et en particulier en phosphatidylsérine, qui a une haute affinité pour l'ion calcium. Elles contiennent également de nombreuses protéines entrant en jeu dans le métabolisme du calcium et du phosphate, ainsi que la phosphatase alcaline (ALP) (23).

La première étape de ce processus correspond à la synthèse des cristaux d'hydroxyapatite au sein des vésicules matricielles, par accumulation de calcium et de phosphate jusqu'à cristallisation en CaPO_4 . Dans une seconde étape, ces cristaux d'hydroxyapatite nouvellement formés traversent la membrane des vésicules matricielles et s'allongent dans l'espace extracellulaire. La production continue d'hydroxyapatite dans les vésicules matricielles est assurée par un maintien de taux élevés de calcium et d'hydroxyde de phosphate notamment grâce à l'activité de l'ALP. Les cristaux d'hydroxyapatite se propagent en clusters autour des vésicules matricielles et remplissent ainsi petit à petit l'espace entre les fibres de collagène de la MEC osseuse (24).

II. Le tissu cartilagineux

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif spécialisé formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, inclus dans des logettes nommées chondroplastes au sein d'une MEC constituée de glycosaminoglycanes (GAG) et de collagène. Le tissu cartilagineux a une consistance dure, mais contrairement à l'os, il n'est pas minéralisé et est totalement dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que de nerfs.

Ce tissu élastique et solide présente 3 fonctions principales :

- Support structural
- Facilitation des mouvements
- Rôle primordial dans le processus d'ossification

A. Structure du cartilage

1. La matrice extracellulaire

La MEC du tissu cartilagineux est composée de substance fondamentale et de fibres.

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

- L'eau, qui représente 70 à 80 % du poids de la MEC, permet la déformabilité des cartilages.
- La chondroïtine-sulfate et la kératane-sulfate sont des GAG très hydrophiles. Ils favorisent la teneur élevée en eau et l'élasticité du cartilage.
- Des protéoglycanes, majoritairement l'aggrécane (ACAN), sont responsables des propriétés mécaniques de compressibilité et d'élasticité du cartilage. En dehors de l'ACAN, on peut également citer la décorine.
- Des GAG sulfatés (acide hyaluronique).
- Des glycoprotéines de structure (chondronectine).

Les métalloprotéinases matricielles et aggrécanasés sont des enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement.

Les fibres, essentiellement de collagène, sont associées à la substance fondamentale et assurent la résistance mécanique du tissu cartilagineux. Dans la MEC du tissu cartilagineux, le collagène de type 2 (COLL2) est le plus abondant, mais on y retrouve aussi les collagènes de type 9, 10 et 11 (COLL9, COLL10 et COLL11).

2. Le péri-chondre

Ce tissu conjonctif irrégulier et non orienté est constitué en majorité de fibroblastes, d'un réseau dense de fibres de COLL1 et de substance fondamentale. Contrairement au cartilage, le péri-chondre est un tissu bien vascularisé, et assure la nutrition et la croissance du cartilage voisin. Sa couche externe ou tendiniforme est fibreuse et nourricière, et sa couche interne ou chondrogène contient les MSC à l'origine des chondrocytes.

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

B. Classification et localisation des cartilages

On distingue 3 variétés histologiques de cartilage, classés selon la richesse de leur MEC en fibres de collagènes ou élastiques (figure 4).

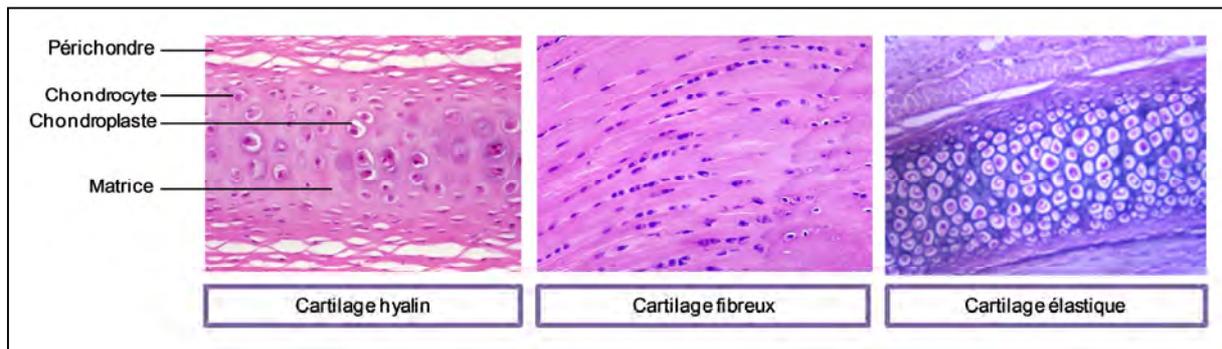


Figure 4 - Histologie des trois différents types de cartilage

Le cartilage hyalin est le cartilage le plus répandu dans le corps humain. Les chondrocytes y sont volumineux et la matrice extracellulaire abondante. Les microfibrilles de COLL2 et COLL11 y sont disposées en un réseau à mailles larges. Le cartilage hyalin dit « articulaire » est localisé à la surface des articulations mobiles de type synoviale en continuité du périoste du tissu osseux (genou) et permet de supporter les forces et les mouvements réguliers des pièces osseuses. Le cartilage hyalin non-articulaire est notamment présent dans la cloison nasale, les cartilages thyroïde et cricoïde du larynx, les anneaux des bronches et de la trachée, ou encore aux extrémités des côtes.

Le cartilage fibreux, ou fibrocartilage, est un tissu intermédiaire entre le cartilage hyalin et le tissu conjonctif fibreux. Il est constitué d'un réseau dense de fibres de COLL1 orienté selon les forces de tension, le rendant très résistant aux tractions et aux compressions. Les chondrocytes, ici plus ou moins fusiformes et dépourvus d'inclusions lipidiques, y sont entourés d'une zone péricellulaire de substance fondamentale afibrillaire. Ce type de cartilage est retrouvé dans les disques intervertébraux, les ménisques des genoux, la symphyse pubienne et au niveau des sites d'insertion des ligaments, des tendons et des capsules articulaires.

Le cartilage élastique présente une densité cellulaire très importante avec des chondrocytes contenant souvent de volumineuses inclusions lipidiques. Sa MEC est riche en fibres de COLL2 et fibres élastiques qui lui confèrent sa résistance et sa grande flexibilité. Le

cartilage élastique est notamment présent dans l'oreille externe, les trompes d'Eustache, l'épiglotte et les cartilages aryténoïdes du larynx.

Si à la naissance le cartilage hyalin est le composant majeur du squelette d'un individu, sa proportion va diminuer avec l'âge. Les cartilages de conjugaison, ou cartilages de croissance, situés entre la métaphyse et l'épiphyse des os longs jusqu'à la puberté, vont assurer leur croissance en longueur par le processus d'ossification endochondrale, et ne seront donc plus présents chez l'individu adulte.

C. Le chondrocyte

1. Croissance du cartilage

La croissance du cartilage s'effectue selon deux modes :

- La croissance appositionnelle ou périchondrale s'opère par la différenciation des MSC du périchondre en chondroblastes puis en chondrocytes matures. Cette croissance en épaisseur s'effectue par apposition de couches successives de substance fondamentale à la surface de la pièce cartilagineuse. Elle est essentiellement observée au cours du développement du fœtus.
- La croissance interstitielle s'effectue par mitoses successives des chondrocytes, qui vont aboutir à la formation de clones cellulaires ou groupes isogéniques qui vont se disposer selon l'axe des mitoses de manière rectiligne (groupe isogénique axial) ou circulaire (groupe isogénique coronaire). Ces différentes dispositions permettent la croissance axiale ou circonférentielle du tissu cartilagineux. Ce type de croissance est observé chez le fœtus et au cours de la croissance des os longs jusqu'à la puberté et la soudure des cartilages de conjugaison.

2. Organisation cellulaire

Les chondrocytes proviennent de la différenciation des MSC sous l'effet de nombreux facteurs de transcription comme SOX9 (sex determining region Y-box 9) (25). Il existe trois stades de différenciation chondrocytaire : le chondroblaste, le chondrocyte mature et le chondrocyte hypertrophique.

Les chondrocytes sont des cellules arrondies et volumineuses (de 10 à 40 μm de diamètre), qui possèdent un noyau volumineux dans leur région centrale (figure 4).

Suite à la croissance interstitielle, des chondrocytes peuvent former un groupe isogénique, un clone issu de la division d'un même chondroblaste initial. La région entourant un de ces groupes isogéniques est appelée le territoire, et se caractérise par une forte basophilie. Un territoire et ses chondrocytes forment ensemble un chondrone.

3. Fonctions

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

Les chondrocytes possèdent des récepteurs pour l'hormone de croissance, les vitamines A et D, la parathormone (PTH), les glucocorticoïdes et les œstrogènes.

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

III. Croissance et remodelage de l'os

A. La croissance osseuse

Le développement de l'os s'effectue toujours par le remplacement du tissu conjonctif préexistant par du tissu osseux. On distingue cependant 4 modes d'ostéogénèse.

1. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale (figure 5.A) intervient au cours du développement en longueur des os longs. La formation osseuse est dans ce cas réalisée à partir d'une ébauche cartilagineuse (tissu cartilagineux hyalin) et aboutit essentiellement à la formation d'os spongieux : le cartilage préexistant est détruit puis remplacé par de l'os. Ce processus comprend deux grandes phases (1).

L'ossification primaire ou diaphysaire caractérise la formation initiale du tissu osseux chez le fœtus. Elle aboutit à la formation de l'os primaire endochondral, immature et non lamellaire. L'ossification primaire endochondrale débute au centre de la diaphyse par un phénomène d'hypertrophie des chondrocytes qui s'accompagne d'un élargissement des chondroplastes, d'une libération de facteurs angiogéniques dont le VEGF (vascular

endothelial growth factor) qui induit une vascularisation locale du tissu cartilagineux, et de la calcification du tissu cartilagineux. Suite à la mort des chondrocytes par apoptose, les chondroplastes demeurent vides et séparés par des travées de tissu cartilagineux calcifié et vascularisé. Grâce à cette vascularisation, les MSC parviennent jusqu'à ce nouveau tissu et s'y différencient en ostéoblastes. S'enclenche alors l'ossification des travées de tissu cartilagineux, qui conduit à la formation d'un point d'ossification primaire au centre de la diaphyse. De la même manière, l'ossification primaire endochondrale au niveau des épiphyses aboutit à la formation d'un point d'ossification centro-épiphysaire. Cette ossification préserve une zone de cartilage articulaire au niveau de la cavité synoviale et les cartilages dits de conjugaison au niveau de la métaphyse.

L'ossification secondaire ou épiphysaire correspond à la croissance et à la maturation osseuse qui s'achèvent à la fin de la puberté. Il s'agit du complet remplacement de l'os immature par un os mature dit lamellaire, ainsi que de la croissance en longueur des os. La croissance en longueur des os longs fait intervenir la plaque de croissance, qui se situe entre l'épiphyse cartilagineuse et l'os nouvellement formé dans la métaphyse, et s'organise en colonnes et couches successives :

- La zone de cartilage hyalin la plus éloignée du front d'ossification est la zone de cartilage au repos. Cette réserve de chondrocytes est responsable de la synthèse protéique et du maintien de la structure germinale.
- La zone de cartilage sérié contient les chondrocytes qui prolifèrent rapidement et s'aplatissent.
- La zone de cartilage hypertrophié, à proximité du front d'ossification, est constituée de chondrocytes très volumineux. Cette zone de transformation se divise en deux couches pré-hypertrophique et hypertrophique. Les chondrocytes hypertrophiques interviennent dans la calcification de la MEC cartilagineuse, la vascularisation du tissu cartilagineux, le recrutement des MSC puis leur différenciation en ostéoblastes.
- La zone dégénérative est composée de chondrocytes entrant en apoptose. Le processus de minéralisation est engagé et devient intensif suite au relargage accru d'ALP, de calcium et de vésicules matricielles par les chondrocytes au stade terminal de leur différenciation. La matrice extracellulaire qui entoure les chondrocytes hypertrophiques se calcifie, puis ces chondrocytes meurent. Cette mort cellulaire produit l'ébauche de la cavité médullaire des os.

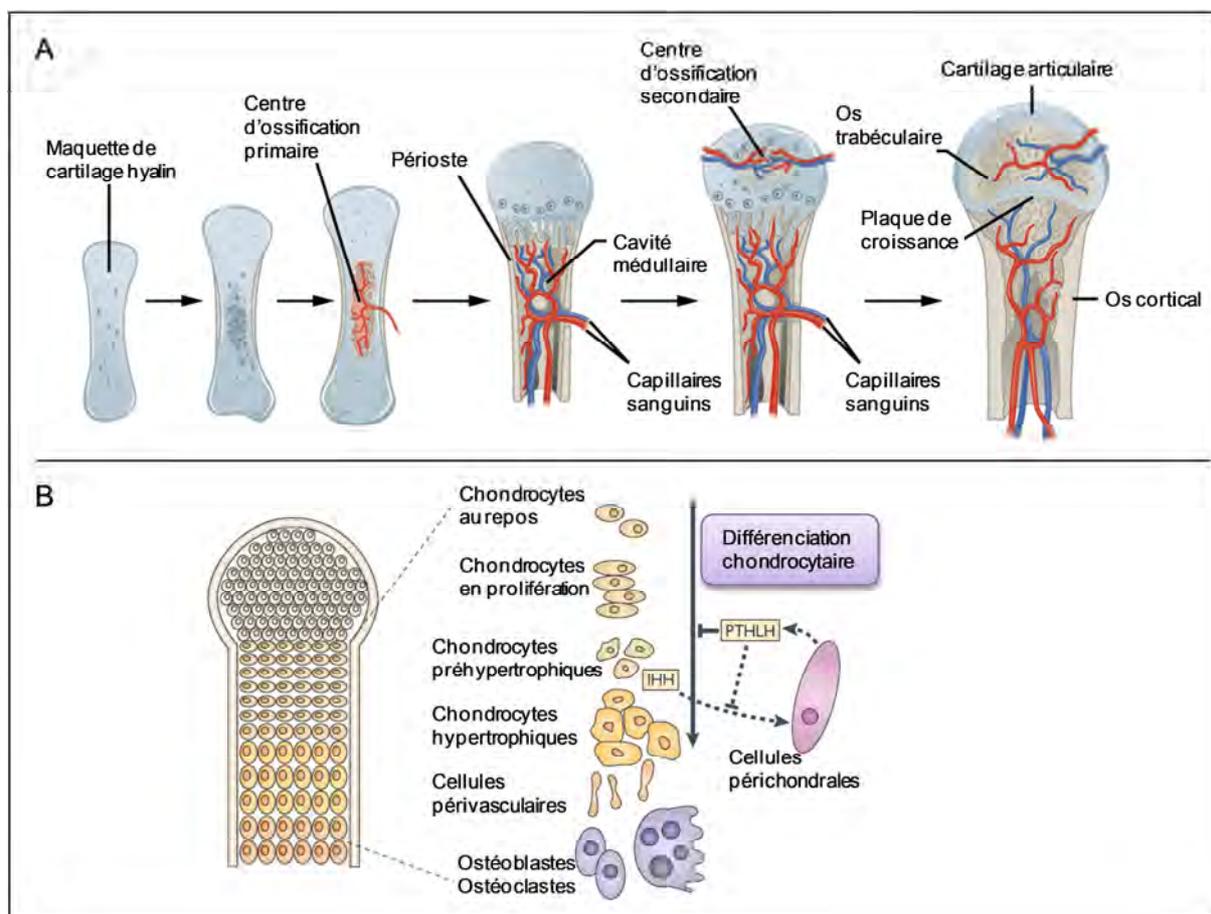


Figure 5 – Ossification endochondrale

A. Représentation schématique des différentes étapes du processus d'ossification endochondrale

B. Régulation de la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance par la boucle de rétro-contrôle IHH/PTHrP (adapté de (26))

La prolifération et la différenciation des chondrocytes durant le processus d'ossification endochondrale est régulée par de nombreux facteurs endocrines, paracrines et autocrines tels que des hormones de croissance, thyroïdiennes ou sexuelles, la voie Wnt/ β -caténine, des BMP, le VEGF, l'IGF, le TGF- β , l'oxyde nitrique et la vitamine D.

L'IGF-1 et les hormones sexuelles (œstrogènes/androgènes) sont les principaux facteurs hormonaux agissant sur les cartilages de conjugaison pendant toute la période de croissance.

Le VEGF est synthétisé par les chondrocytes hypertrophiques. Cet agent pro-angiogénique permet la néovascularisation du tissu cartilagineux primaire. Son activité de chimiotactisme favorise la migration des MSC et ostéoblastes vers la zone d'ossification.

La PTHrP (parathyroid hormone-like hormone), connue aussi sous le nom de PTHrP (parathyroid hormone-related protein), et l'IHH (Indian Hedgehog) inhibent la différenciation des chondrocytes proliférant dans la plaque de croissance. L'IHH produite par les chondrocytes pré-hypertrophiques stimule la prolifération des chondrocytes adjacents et la

production de PTHLH par les cellules du périchondre. A son tour, la PTHLH inhibe à la fois la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance et l'expression d'IHH (27) (figure 5.B). Il a été prouvé que d'autres éléments de la voie de signalisation Hedgehog, comme GLI3 (28), interviennent dans le processus complexe de différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance.

Parmi les autres facteurs locaux influençant l'ossification endochondrale, on peut citer une très importante contribution des BMP à différents niveaux, selon des mécanismes encore méconnus (29).

2. Autres types d'ossification

L'ossification membraneuse est à l'origine des os plats du crâne et de la face. Au niveau d'une zone vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire, des MSC prolifèrent et se différencient directement en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes. Ces cellules élaborent la matrice ostéoïde sur un support de fibres de COLL1, qui se minéralise dans un second temps. L'ossification progresse de proche en proche, formant ainsi le réseau de travées osseuses de l'os spongieux. L'os formé au niveau de ces sites d'ossification est de l'os fibreux qui sera ensuite résorbé et remplacé par du tissu osseux lamellaire durant le processus d'ossification secondaire (1).

L'ossification périostique participe à la croissance des os courts et assure l'augmentation du diamètre métaphysaire des os longs. Elle fait intervenir les MSC du périoste qui vont se différencier en ostéoblastes, et l'ossification se fait par apposition de lamelles osseuses concentriques à partir du périoste.

L'ossification haversienne correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support déjà élaboré après une phase de destruction de la matrice osseuse préexistante par les ostéoclastes. Elle a pour but de créer un os mieux vascularisé et capable de mieux résister aux contraintes mécaniques : c'est la formation des ostéons. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs. Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire, qui sont ensuite colonisés par des ostéoprogéniteurs qui vont se différencier en ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent de la matrice ostéoïde qui va se minéraliser rapidement. Le processus va se répéter avec le recrutement de nouveaux ostéoprogéniteurs sur la matrice osseuse nouvellement formée, qui va emprisonner ces nouveaux ostéoblastes et ainsi de suite jusqu'à la formation d'ostéons et des étroits canaux que sont les canaux de

Havers et de Volkmann. L'os haversien va ainsi entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique (1).

B. Le remodelage osseux

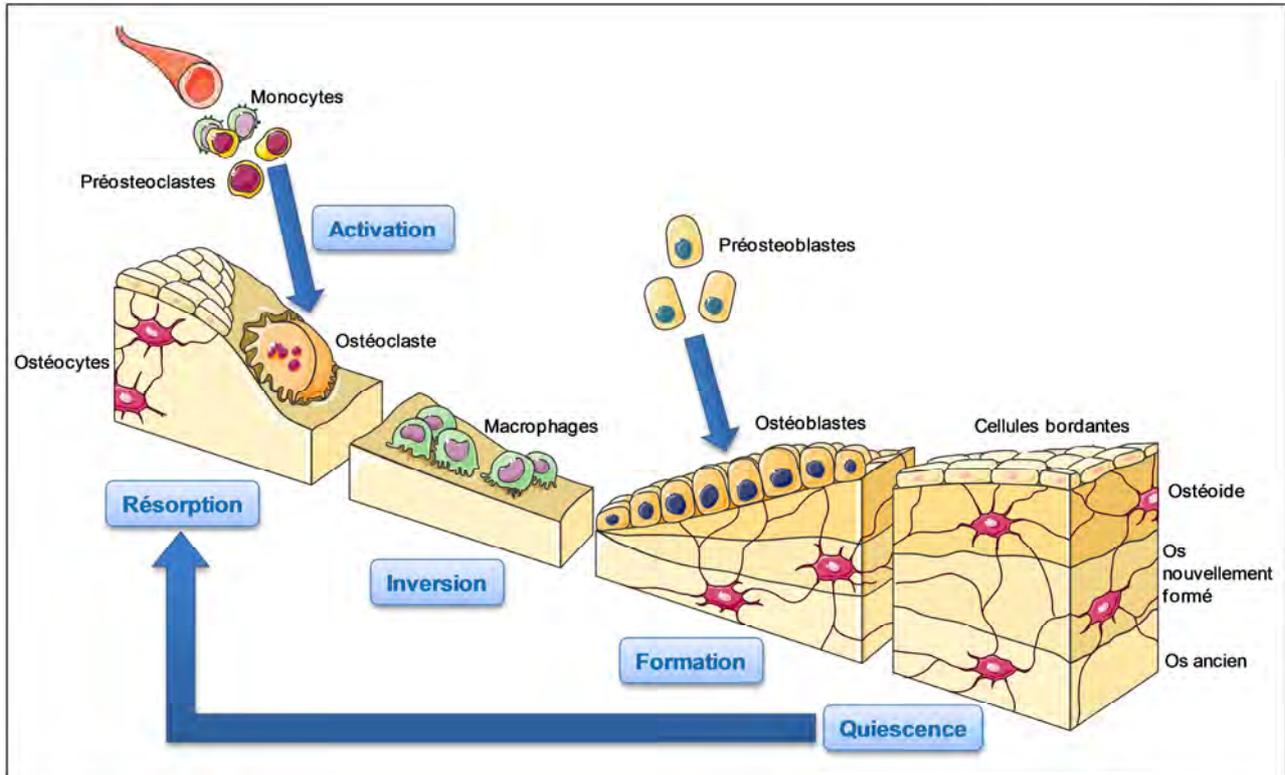


Figure 6 - Les différentes étapes du cycle de remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant renouvellement grâce à un équilibre entre les phases de production par les ostéoblastes et les phases de résorption par les ostéoclastes (8). Ce processus, nommé remodelage osseux, peut être divisé en 5 phases (figure 6) :

- Durant la phase de quiescence, les surfaces osseuses sont uniquement recouvertes d'une fine couche ostéoïde et de cellules bordantes inactives. Elles ne comportent ni ostéoblastes ni ostéoclastes. C'est le cas le plus fréquent chez l'adulte.
- La phase d'activation consiste en un recrutement le long d'une surface osseuse inactive des précurseurs des ostéoclastes, les préostéoclastes.
- Lors de la phase dite de résorption, les ostéoclastes différenciés sont localisés dans les lacunes de Howship, des zones concaves présentes le long des surfaces osseuses. L'ostéoclaste détruit progressivement la fraction organique de la MEC osseuse sous l'action de ses enzymes protéolytiques et de ses pompes à protons.

- Les ostéoclastes sont ensuite remplacés par des cellules de la lignée monocytes/macrophages qui vont lisser le fond de la lacune. C'est la phase d'inversion.
- Enfin, durant la phase de formation, les ostéoblastes sont recrutés au site résorbé et synthétisent une matrice collagénique afin de combler la lacune. Cette matrice sera finalement minéralisée.

L'homéostasie du tissu osseux repose principalement sur deux types cellulaires aux actions antagonistes : l'ostéoblaste et l'ostéoclaste. Ces deux types cellulaires ne sont toutefois pas totalement indépendants puisque les ostéoblastes sécrètent des médiateurs solubles régulateurs de l'ostéoclastogénèse: l'OPG (Ostéoprotégérine), RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), le M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), le TNF (tumor necrosis factor) ou des interleukines (IL-1, IL-6, IL-11) (30,31). Les ostéoblastes sont ainsi impliqués à la fois dans la formation et la résorption osseuse.

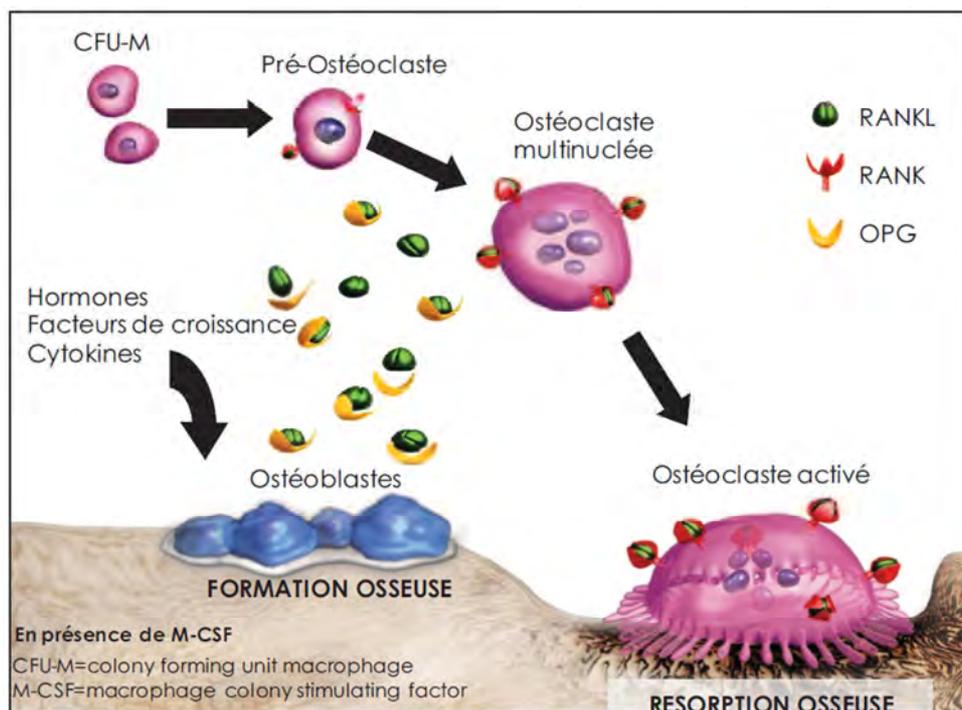


Figure 7 – Implication de la triade RANK/RANKL/OPG dans la différenciation ostéoclastique (d'après Amgen, adapté de (32))

La triade RANK/RANKL/OPG est le médiateur de cette communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes et exerce un rôle fondamental dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse (figure 7). RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) est une cytokine transmembranaire pouvant être clivée par des protéases de manière à générer une forme soluble. RANKL se lie avec une forte affinité à son récepteur RANK

exprimé à la surface des ostéoclastes. L'interaction RANK/RANKL est essentielle à la différenciation et à la survie des ostéoclastes (33) par l'activation des voies de signalisation PI3K, p38, ERK, JNK, AKT ou NFκB. Chez les souris invalidées pour les gènes RANKL ou RANK, l'activation des ostéoclastes est défectueuse, entraînant une ostéopétrose. L'OPG est une glycoprotéine soluble, produite notamment par les ostéoblastes et qui agit comme un récepteur leurre de RANKL. Le ratio entre le niveau d'expression de RANKL et d'OPG par les ostéoblastes permet le contrôle de la résorption osseuse (34). Il a en effet été prouvé que la délétion génique d'OPG entraîne une ostéoporose sévère caractérisée par une résorption excessive (35), alors qu'une surexpression d'OPG provoque l'apparition d'une ostéopétrose (36).

Différents facteurs sont capables de réguler l'homéostasie du tissu osseux en agissant sur la triade RANK/RANKL/OPG :

- Le facteur de transcription RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) régule directement l'expression des gènes de RANKL et de l'OPG par les ostéoblastes, constituant ainsi un lien moléculaire entre formation et résorption osseuse.
- La PTH inhibe la sécrétion de l'OPG et active l'expression de RANKL par les ostéoblastes (37).
- L'IL-1β et le TNF-α stimulent la synthèse de M-CSF et de RANKL par les précurseurs ostéoblastiques (38).
- L'IL-6 et les glucocorticoïdes stimulent également l'expression de RANKL.
- La vitamine D inhibe à dose physiologique la stimulation de l'expression de RANKL par la PTH.
- Le TGF-β, les œstrogènes et les BMP augmentent l'expression de l'OPG. La chute du taux d'œstrogène lors de la ménopause favorise ainsi le développement de l'ostéoporose.

Cette triade moléculaire contribue au bon déroulement du remodelage osseux. Tout dérèglement de cet équilibre entre les phases d'apposition et de résorption osseuse est susceptible d'induire l'apparition de pathologies ostéocondensantes ou ostéolytiques. Des modifications du ratio RANKL / OPG ont notamment été décrites dans des pathologies d'origine tumorale associées à un fort remodelage osseux (39).

IV. Les cellules souches mésenchymateuses

A. Propriétés et applications thérapeutiques

La moelle osseuse chez l'homme adulte est composée de tissu hématopoïétique associé à un tissu de soutien, le stroma, formé de fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales, adipocytes, macrophages et d'un panel de cellules multipotentes regroupées sous le nom de MSC. Ces cellules peuvent être présentes au niveau du périoste, de l'endoste, du tissu musculaire, du tissu adipeux blanc, de la membrane synoviale, du placenta ou du sang de cordon.

Les tissus mésenchymateux tels que le tissu squelettique et le derme dérivent de deux origines embryologiques : le mésoderme pour la majorité du corps et la crête neurale crâniale pour le crâne et quelques structures de la partie supérieure du tronc. Les MSC dériveraient donc largement du feuillet embryonnaire mésodermique (40). En 2007, l'équipe de Takashima a cependant prouvé que la première vague de MSC se développant au niveau de l'embryon dérive de la crête neurale et non du mésoderme (41), ces cellules étant ensuite progressivement supplantées par d'autres MSC d'origine mal définie.

Les MSC sont des cellules multipotentes capables de remplacer localement des cellules âgées ou lésées. Selon la Société Internationale de Cytothérapie (ISCT) (42), une population cellulaire peut être considérée comme des MSC si elles possèdent les caractéristiques suivantes:

- Adhésion au plastique dans des conditions standard de culture cellulaire.
- Expression des marqueurs mésenchymateux CD105 (endogline), CD90 (tyrosine kinase) et CD73 (5'-nucléotidase).
- Pas d'expression des marqueurs CD45 (PTPRC), CD34, CD14 ou CD11b (intégrine $\alpha M\beta 2$), CD79a ou CD19, et du CMH de classe II.
- Capacité de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes in vitro (figure 8).

Si toutes les MSC partagent un phénotype commun en cytométrie en flux, l'expression de certains antigènes de surface peut dépendre du tissu dont les cellules sont originaires. A titre d'exemple, le marqueur CD271 permet de discriminer efficacement les MSC des cellules souches hématopoïétiques dans un échantillon de moelle osseuse humaine (43), mais n'est pas

exprimé dans des MSC issues de sang de cordon ombilical (44). Les MSC dérivées du tissu adipeux se démarquent ainsi des MSC dérivées de moelle osseuse par l'expression d'autres marqueurs de surface, comme CD34 (45), considéré pourtant comme non exprimé dans les MSC selon la définition établie par l'ISCT (42).

De plus, en 2007, Sachetti et ses collaborateurs ont montré que les cellules progénitrices présentes dans la moelle osseuse humaine, capables d'auto-renouvellement et de générer le stroma osseux, expriment fortement le marqueur CD146, une protéine d'adhésion cellulaire (46). Or, ces cellules CD146⁺ représentent une sous-population de péricytes localisée au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires présents dans la moelle osseuse. Les MSC pourraient donc être des péricytes (47), mais il existerait cependant une différence entre les MSC et les cellules péricytaires. En effet, la culture de ces deux types cellulaires ne montre pas les mêmes capacités de différenciation (48).

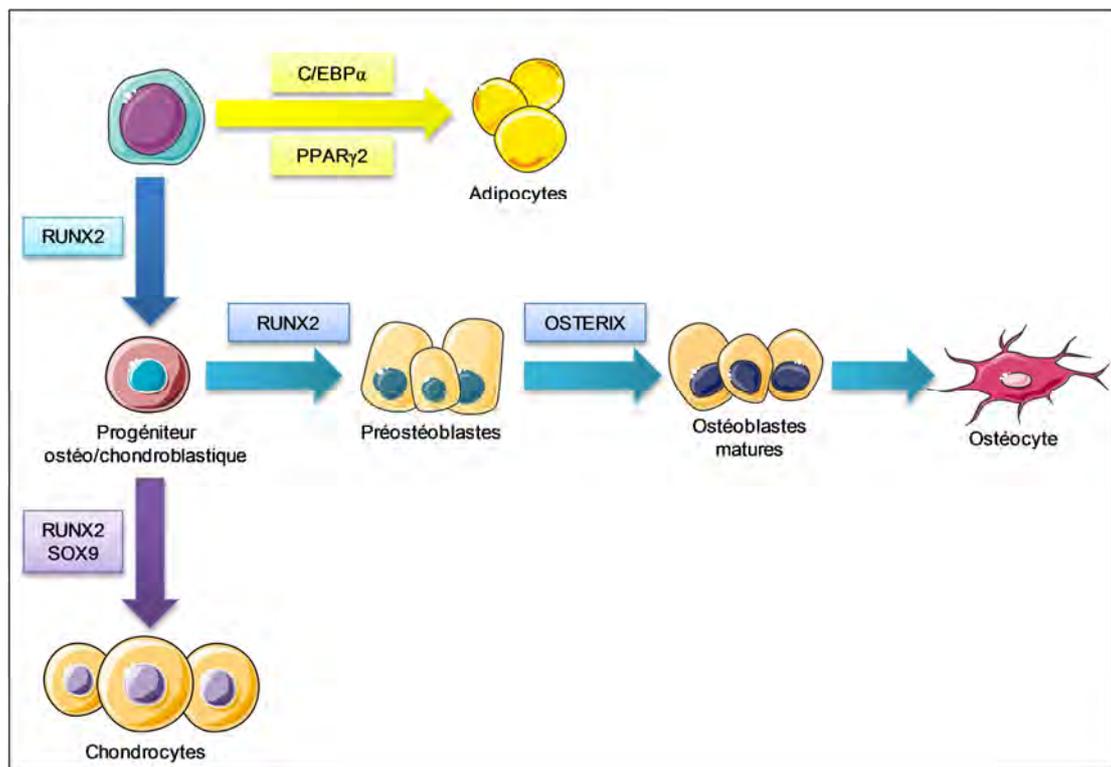


Figure 8 - Principaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle des voies de différenciation mésoenchymateuse

Les MSC prolifèrent facilement *in vitro*, et leurs propriétés en font d'excellents candidats pour de nombreuses applications thérapeutiques dans le domaine de la médecine réparative (49) :

- Leur capacité à migrer vers les sites d'inflammation et à s'y implanter leur permet d'exercer un effet local sur le tissu lésé (50,51).

- La différenciation des MSC a été observée dans d'autres voies que les trois principaux lignées mésenchymateux, ces résultats étant encore largement discutés et controversés. A titre d'exemple, des études ont montré que les MSC sont capables de se différencier *in vivo* en cellules épithéliales telles que des pneumocytes (52) et même en cellules nerveuses (53).
- Les MSC sécrètent différents facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (54) ayant des effets anti-apoptotiques et immunoprotecteurs (55).
- Les interactions des MSC avec un grand nombre de cellules de l'immunité innée et acquise leur confèrent des propriétés immunomodulatrices particulièrement intéressantes pour des applications thérapeutiques variées. Les capacités immunosuppressives des MSC sont activées par des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron- γ et le TNF- α . Dans ces conditions, les MSC produisent l'interleukine 6, l'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase), la PGE2 (Prostaglandine E2), le TGF- β et HLA-G (Human leukocyte antigen G) qui inhibent la prolifération des cellules T et favorisent leur maturation en cellules T régulatrices. Sans cette activation, les MSC peuvent au contraire accroître l'activité des cellules T en sécrétant des chimiokines comme MIP-1 α et β , RANTES/CCL5, CXCL9 et 10, qui vont recruter les lymphocytes au niveau des sites d'inflammation (56). Les facteurs solubles sécrétés par les MSC agissent également sur la polarisation des monocytes en macrophages pro- (M1) ou anti-inflammatoires (M2).

Ainsi, en raison de leur plasticité et de leurs propriétés immunomodulatrices, les MSC ont des applications thérapeutiques potentielles dans de nombreux champs de la médecine régénérative. Elles ont notamment montré leur efficacité pour réparer des défauts osseux suite à des fractures dans des os longs (57), des vertèbres (58) ainsi qu'au niveau crâno-facial (59). En revanche, leur efficacité pour régénérer du cartilage articulaire est aujourd'hui limitée, en raison de la différenciation *in situ* des MSC en un tissu cartilagineux fibreux qui ne possède pas les propriétés mécaniques du cartilage hyalin et n'est pas stable dans le temps (60). Des essais cliniques chez l'homme sont actuellement en cours pour traiter des pathologies très diverses comme des maladies osseuses (ostéoarthrite, ostéogenèse imparfaite), des affections cardiovasculaires (infarctus du myocarde, ischémie coronarienne), des maladies neurodégénératives (maladie de Charcot et de Parkinson), la cirrhose du foie ou encore le diabète de type I (61).

B. La différenciation ostéoblastique

L'ostéoblastogenèse a pour origine la différenciation des MSC en pré-ostéoblastes sous l'impulsion du facteur de transcription RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) ou CBFA1 (core-binding factor subunit alpha-1). Ce facteur-clé est en effet capable de se fixer sur un site consensus des promoteurs d'un grand nombre de gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique, notamment ceux codant pour COL1, BSP, OC et OPN (62). Les souris présentant une délétion de *Runx2* ne possèdent pas de tissu osseux mature et meurent à la naissance (63), prouvant que RUNX2 est requis pour le processus d'ossification de l'ébauche cartilagineuse initiale.

Les précurseurs ostéoblastiques expriment fortement le gène *MSX2*. Sa surexpression stimule *in vitro* la prolifération cellulaire et retarde donc la différenciation des ostéoblastes (64). Cette inhibition est notamment levée par DLX5, ce qui a pour effet de stimuler la production d'OC (65).

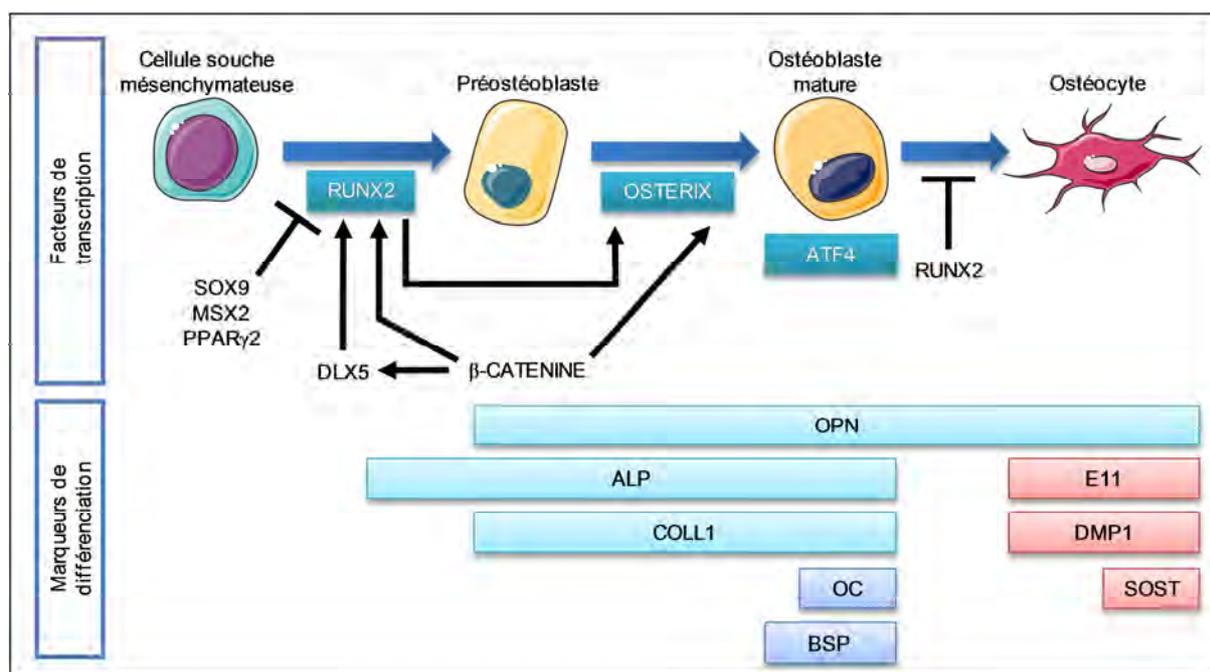


Figure 9 – Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation ostéoblastique (d'après (66))

La différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures fait intervenir le facteur de transcription OSTERIX (OSTX ou SP7) (67) qui active notamment le promoteur du gène *COL1A1* (68). Son expression est elle-même régulée par RUNX2, et l'on observe chez les souris déficientes en OSTX une différenciation des précurseurs ostéogéniques en

chondrocytes (67), ce qui atteste de son rôle primordial dans la détermination cellulaire des MSC vers la voie ostéoblastique.

ATF4 (activating transcription factor 4) joue un rôle important dans les ostéoblastes les plus matures. Il régule en effet directement l'expression de l'OC et de la BSP par les ostéoblastes ainsi que leur capacité à synthétiser du COLL1 (69,70).

Lors de leur différenciation en ostéoblastes, les MSC opèrent d'importants changements morphologiques et fonctionnels. Ces changements s'accompagnent de plusieurs vagues d'expression de gènes ostéoblastiques, selon le degré de maturation des ostéoblastes. Parmi les marqueurs précoces, on retrouve principalement l'ALP, le COLL1 et l'OPN, et la BSP et l'OC parmi les marqueurs tardifs.

Une fois emmuré dans la matrice osseuse minéralisée, l'ostéoblaste peut atteindre son stade de différenciation ultime et devenir un ostéocyte. Cette différenciation terminale s'accompagne d'une réduction progressive de l'expression de plusieurs marqueurs ostéoblastiques comme RUNX, l'ALP, la BSP et l'OC mais aussi de la préservation de l'expression de certains marqueurs de l'ostéoblaste mature comme l'OPN. Les ostéocytes expriment aussi des marqueurs qui leur sont spécifiques et ce, de la même manière que pour les ostéoblastes, en fonction de leur degré de maturation (7). On observe notamment une production importante d'E11/gp38 (71) et de DMP1 (dentin matrix protein 1) (7) dans les ostéocytes tout juste formés et de sclérostine codée par le gène *SOST* dans les ostéocytes les plus matures (72). On peut également citer parmi les marqueurs ostéocytaires les protéines PHEX (phosphate-regulating endopeptidase homolog x-linked), MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein), CD44 et le FGF23 (fibroblast growth factor-23) (14).

Les différentes étapes de l'ostéoblastogenèse (figure 9) sont sous le contrôle de cytokines ou d'hormones comme les BMP, le TGF- β , les voies de signalisation Hedgehog et Wnt/ β -caténine, les FGF (Fibroblast Growth Factor), les estrogènes ou les androgènes (66).

C. La différenciation chondrocytaire

Le facteur de transcription précoce le plus important dans la chondrogenèse est SOX9. Il induit la différenciation des progéniteurs mésenchymateux en chondroblastes puis en chondrocytes matures par le contrôle des gènes codant pour COLL2, 9, 10 et 11, ACAN et COMP (cartilage oligomeric matrix protein) (73,74) (figure 10). SOX9 se fixe au niveau des régions régulatrices qui gouvernent l'expression de ces gènes en formant des complexes de

transactivation avec d'autres protéines. Il a été prouvé notamment que l'activation de *COMP* et du gène *COL2A1* codant pour *COLL2* nécessitent une coopération de *SOX9* avec L-*SOX5*, un isoforme long de la protéine *SOX5*, et *SOX6* (75,76). De plus, il a été prouvé que l'expression de *SOX9* inhibe la transition des chondrocytes proliférants vers le stade hypertrophique durant l'ossification endochondrale (25).

RUNX2 joue également un rôle important dans la chondrogenèse et l'invasion vasculaire se produisant au niveau de la plaque de croissance. L'inactivation sélective de *RUNX2* dans les chondrocytes chez la souris entraîne en effet une sévère réduction de la taille des membres liée à des défauts de différenciation chondrogénique, d'invasion vasculaire, de différenciation ostéoclastique et de formation d'os périostique (77).

Lors de la transition vers le stade hypertrophique, les chondroblastes subissent d'importantes modifications phénotypiques. Les cellules quittent ainsi progressivement le cycle cellulaire et augmentent leur volume cytoplasmique jusqu'à 10 fois (78). Au stade pré-hypertrophique, les chondrocytes expriment plus fortement que les chondroblastes les gènes précoces codant pour les composants de la matrice cartilagineuse, tels *COL2A1* et *AGC1*, et commencent à exprimer les gènes tardifs *PTHRI* (codant pour la *PTH1H*), *IHH* et *COL10A1*. Une fois le stade hypertrophique atteint, seule l'expression de *COL10A1* est maintenue à un haut niveau et s'accompagne dans les chondrocytes les plus matures de l'expression de *VEGFA*, de *MMP-13* (matrix metalloprotease 13) et d'*ALP* (79) (figure 10). L'expression de ces marqueurs tardifs est conjointement régulée par les facteurs de transcription *RUNX2* et *MEF2C* (myocyte enhancer factor 2C) (80).

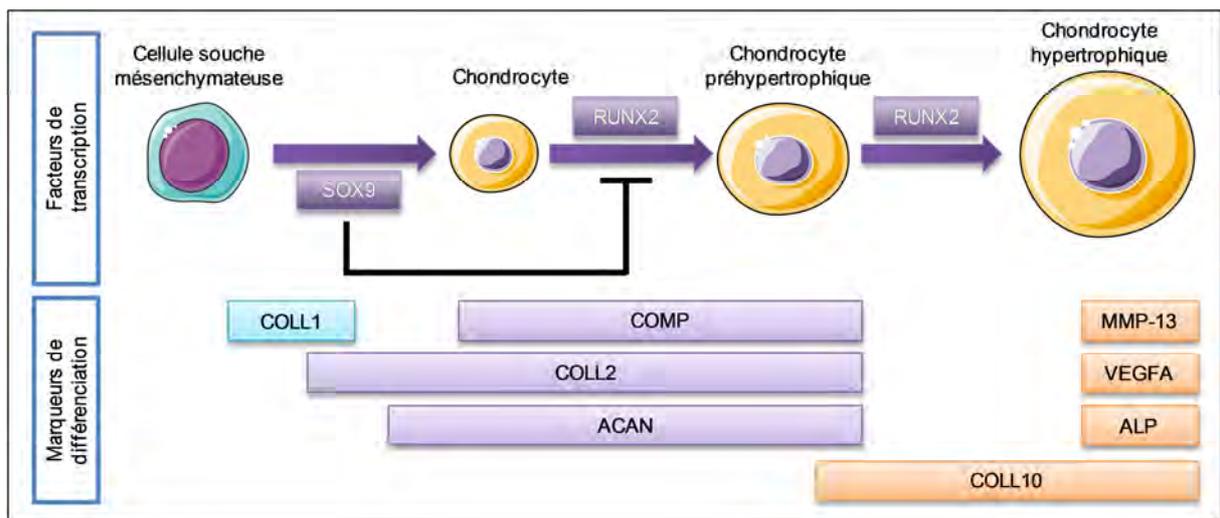


Figure 10 – Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation chondrocytaire

D. La différenciation adipocytaire

Il existe chez les mammifères deux types de tissus adipeux, blanc et brun.

Le tissu adipeux brun, abondant chez les nouveaux-nés et les mammifères hibernant (81), a pour fonction principale d'assurer la thermogénèse grâce à la lipolyse de ses cellules adipeuses. Les adipocytes de ce tissu contiennent un grand nombre de petites gouttelettes lipidiques et de mitochondries très riches en fer, ce qui lui confère sa couleur brune (82). Chez l'individu adulte, on retrouve du tissu adipeux brun au niveau du cou et de la partie supérieure de la poitrine (83).

Le tissu adipeux blanc constitue une importante réserve énergétique et représente, chez les individus sains et sans problème de sur-poids, jusqu'à 20% de la masse corporelle d'un homme et 25% chez la femme. Les adipocytes matures du tissu adipeux blanc contiennent une large vacuole lipidique qui couvre la majeure partie de leur cytoplasme. Sous l'action des hormones lipolytiques, les lipases cytoplasmiques de ces cellules sont transloquées à la surface de la vacuole lipidique où s'effectue la lipolyse des triglycérides (84). Les acides gras dérivés de ces triglycérides sont relargués dans la circulation sanguine jusqu'aux tissus périphériques, en particulier les muscles cardiaques et squelettiques, pour leur fournir une source d'énergie supplémentaire. Les triglycérides peuvent être également synthétisés par les enzymes lipogéniques des adipocytes durant des périodes d'apport calorique excessif, et incorporés à leur vacuole lipidique (85).

Une importante population de MSC réside dans le tissu adipeux blanc, et leur différenciation en adipocytes fait intervenir des facteurs de transcription spécifiques et de nombreuses voies de régulation (figure 11). *In vivo*, l'engagement de ces MSC dans la voie adipocytaire peut être provoqué par un apport énergétique excessif et une prise importante de glucose sur une longue période (86). Cet état métabolique semble générer des signaux qui induisent les MSC à se différencier en pré-adipocytes. Parmi les voies de signalisation régulant ces signaux, on a pu observer un rôle activateur des BMP 2 et 4 (87) mais un effet inhibiteur de la voie Hedgehog, l'expression de SHH (Sonic Hedgehog) induisant l'ostéoblastogénèse aux dépens de l'adipogénèse (88). La voie Wnt, en revanche, induit l'engagement des MSC dans la voie adipocytaire mais a un effet inhibiteur sur la différenciation terminale en adipocyte mature (89).

L'induction de l'adipogénèse induit rapidement l'expression des C/EBPs (CCAAT/enhancer-binding proteins) β et δ (90), des régulateurs précoces de l'adipogénèse

qui vont notamment se fixer aux promoteurs des gènes codant pour les facteurs de transcription-clés de la différenciation adipocytaire, C/EBP α et l'isoforme 2 de PPAR γ (peroxysome proliferator-activated receptor gamma), PPAR γ 2 (91). Ces deux facteurs de transcription sont tous deux engagés dans une boucle de rétrocontrôle positif, et induisent l'expression de gènes impliqués dans la sensibilité à l'insuline, la lipogénèse et la lipolyse, parmi lesquels ceux codant pour le transporteur de glucose GLUT4, la FABP4 (fatty acid binding protein, ou aP2) ou la LPL (lipoprotein lipase), ainsi que l'adiponectine et la leptine, sécrétées par les adipocytes (92).

PPAR γ 2 a une activité inhibitrice sur l'ostéoblastogenèse, en réprimant l'expression des facteurs de transcription DLX5, RUNX2 et OSX (93). En revanche, le marqueur ostéoblastique précoce MSX2 inhibe l'activité transcriptionnelle de PPAR γ 2 guidée par C/EBP α (94).

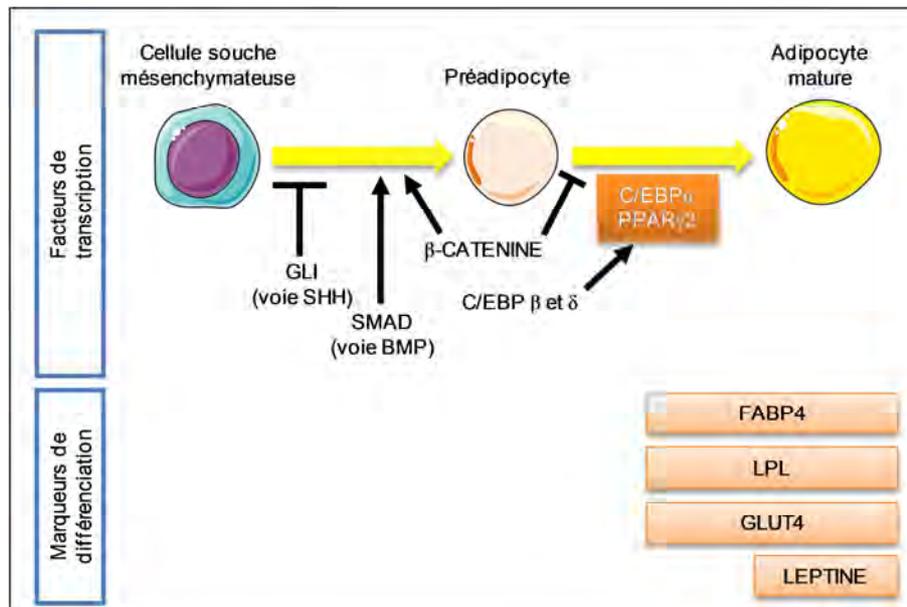


Figure 11 – Facteurs de transcription et marqueurs moléculaires de la différenciation adipocytaire

E. MicroARN et différenciation mésenchymateuse

1. Définition et biosynthèse des microARNs chez les mammifères

Les microARN, ou miRNA, sont de petits ARN (acides ribonucléiques) simple-brin non-codants propres aux cellules eucaryotes, possédant de 19 à 23 nucléotides (95). Ces régulateurs post-transcriptionnels sont capables d'éteindre l'expression de gènes spécifiques en s'appariant à une séquence complémentaire de l'ARN messager (ARNm) du gène cible,

entraînant une répression transcriptionnelle ou une dégradation de l'ARNm d'intérêt. On considère aujourd'hui que le génome humain comprend environ 2000 gènes à l'origine de la transcription de ces miRNA, et qu'ils sont liés aux processus de différenciation cellulaire, d'immunité innée, d'apoptose ou encore de tumorigénèse (96).

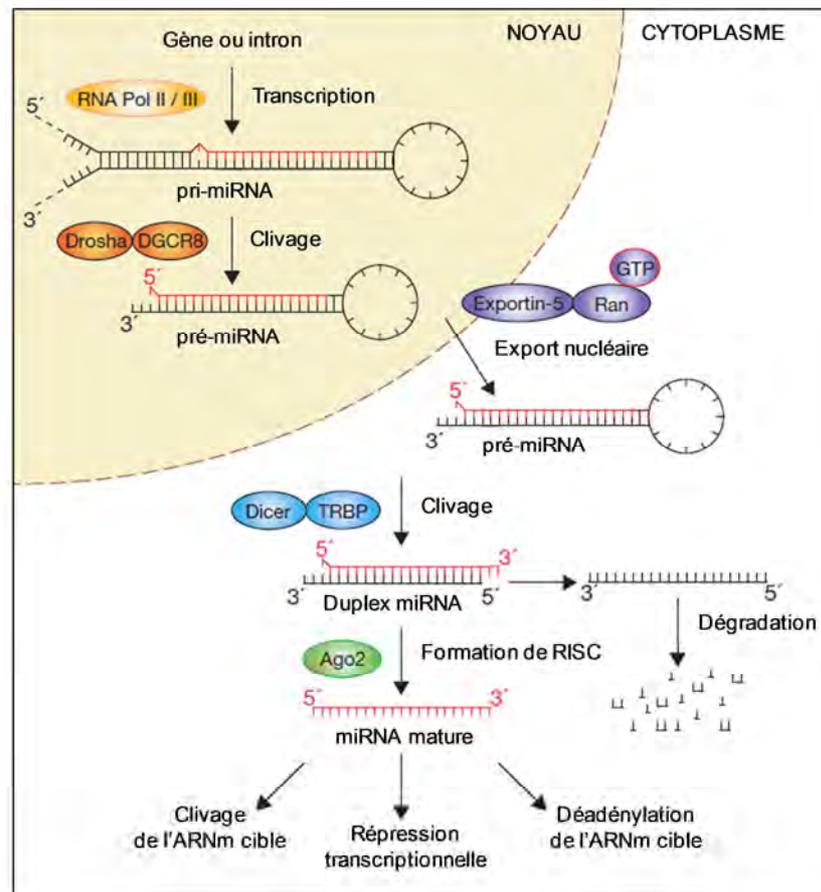


Figure 12 - Biosynthèse des microARN chez les mammifères (adapté de (97))

Les longs transcrits primaires des miRNA, les pri-miRNA, sont clivés dans le noyau par le complexe Microprocesseur formé de l'association de la ribonucléase III Droscha et de la protéine nucléaire DGCR8 (Di George Critical Region ou Pasha) (98). Dans le cas des miRNA dérivés des introns, ou mirtrons, cette étape peut être réalisée par épissage du transcrit sans nécessiter l'activité de Droscha (99). Le miRNA précurseur de 70 nucléotides, ou pré-miRNA, ainsi formé est ensuite exporté dans le cytoplasme de la cellule selon un mécanisme de transport actif GTP-dépendant par le complexe Exportine -5/Ran-GTP (100). La boucle terminale du pré-miRNA est alors clivée par la ribonucléase III Dicer, préalablement activée par un changement de conformation induit par la TRBP (Tar RNA binding protein) (101). Le produit de ce clivage est un duplex miRNA double-brin de 22 nucléotides comprenant deux nucléotides non appariés à chaque extrémité 3' (102). Un seul des deux brins de ce duplex, en

général celui dont la séquence est identique à celle de l'ARNm d'intérêt, sera chargé dans le complexe miRISC (miRNA-induced silencing complex) en interagissant avec une protéine de la famille Argonaute, le plus souvent Ago2 (103), le second brin étant dégradé par des nucléases (104) (figure 12). Les miRNA matures non traduits, des protéines du complexe RISC ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la répression transcriptionnelle et le renouvellement des ARNm s'accumulent dans des zones cytoplasmiques nommées « P-bodies » (processing bodies) (105).

Un complexe miRISC actif dans une cellule de mammifère est composé d'un miRNA mature associé à l'une des protéines Argonaute elle-même liée à des protéines de la famille GW182 (106). Ces protéines GW182 recrutent de nombreux effecteurs de répression transcriptionnelle comme la PABP (poly-A binding protein) (107) ou les complexes de déadénylation CCR4-NOT et PAN2-PAN3 (108).

Le mode d'action des miRNA implique leur liaison aux sites partiellement complémentaires du site 3'-UTR (3'-untranslated region) de leur ARNm-cible. Suite à la formation d'un duplexe miRNA-ARNm, la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm-cible serait médiée par le complexe miRISC soit par sa dégradation ou/et par l'inhibition de sa traduction. Les mécanismes de ce processus sont encore hautement débattus aujourd'hui (109).

2. MiRNA et différenciation ostéoblastique

De nombreuses études rapportent un rôle des miRNA dans la différenciation ostéoblastique des MSC. En voici quelques exemples.

En induisant l'ostéoblastogenèse dans un modèle de MSC murines par la BMP2, Li et collaborateurs ont montré que 25 miRNA étaient significativement régulés, dont 22 négativement. Par analyse prédictive, ils ont identifiés ces miRNA modulés comme ciblant de multiples voies de signalisation intervenant dans l'ostéogénèse, comme la voie Wnt, la signalisation BMP ou encore le FGF. A titre d'exemple, le miR-133 ciblerait préférentiellement RUNX2 et le miR-135 de nombreux composants de la voie BMP (110).

Le miR-206 a pour cible potentielle la connexine 43 (Cx43), une des protéines majeures constituant les jonctions intercellulaires communicantes des ostéoblastes. Une surexpression de ce miRNA dans des MSC murines inhibe en effet la différenciation ostéoblastique, alors qu'une inactivation du miR-206 stimule leur différenciation terminale en ostéocytes (111).

Schoolmesters et collaborateurs ont identifié en 2009 à l'aide d'une banque d'inhibiteurs de miRNA que les miR-148b, -27a et -489 jouaient un rôle important dans la différenciation des MSC humaines. D'après leurs données, une modulation de ces miRNA était suffisante pour déclencher la différenciation ostéoblastique de MSC *in vitro* sans ajout de facteurs externes (112).

Une étude récente a révélé que le miR-138 pouvait moduler la différenciation ostéoblastique de MSC dérivées de moelle osseuse humaine (113). Ce miRNA, dont l'une des cibles identifiées est la FAK (focal adhesion kinase), est sous-exprimé lors de l'ostéoblastogenèse, et son inhibition stimule l'expression de gènes ostéoblastiques et engendre une augmentation de leur activité phosphatase alcaline et de leur capacité à minéraliser la matrice organique.

3. MiRNA et différenciation chondrocytaire

Les miRNA régulent également le développement et l'homéostasie cartilagineuse (114), et des changements dans leur expression et leur fonction ont été associées à des pathologies affectant le cartilage articulaire comme l'ostéo-arthrite (115).

Une étude de 2010 menée par Han et collaborateurs s'est intéressée à l'expression de miRNA dans le modèle de chondrogenèse induite *in vitro* dans des MSC humaines (116). En utilisant la technique des microarrays, ils ont identifié quatre miRNA surexprimés lors de cette chondrogenèse, les miR-130b, -26b, -28 et -152 dont les cibles potentielles seraient des gènes codant pour des collagènes et d'autres protéines de structure de la matrice cartilagineuse, des protéines de la voie BMP ou encore des facteurs de croissance comme l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1).

Le miR-140 a été identifié comme étant surexprimé lors du développement du cartilage chez l'embryon de souris, inhibant ainsi l'histone déacétylase-4, un corépresseur de RUNX2 (117). L'équipe de Miyaki et collaborateurs a analysé l'expression du miR-140 dans des chondrocytes issus de cartilage articulaire sain et de patients atteints d'ostéo-arthrite (118). Les résultats de leur étude montrent que l'expression du miR-140 est significativement réduite dans les tissus ostéo-arthritiques. De plus, son expression est corrélée avec celle de COL2 et de SOX9 dans des MSC humaines différenciées *in vitro* dans la voie chondrocytaire, l'identifiant comme un possible nouveau régulateur de la chondrogenèse.

4. MiRNA et différenciation adipocytaire

Plusieurs études génomiques à haut-débit ont identifié des centaines de miRNA exprimés de manière différentielle durant la formation du tissu adipeux ou dans des états physiopathologiques tels que l'obésité ou le diabète (119). De nombreux miRNA sont ainsi impliqués dans la détermination des MSC vers la voie adipocytaire ainsi que dans la différenciation terminale des pré-adipocytes.

La voie de signalisation Wnt a un rôle crucial dans l'initiation de la différenciation adipocytaire des MSC (120), et les protéines de cette voie de régulation sont la cible de nombreux miRNA. Kennel et collaborateurs ont ainsi montré que les miR-200c/141 et 200b,a/429, homologues du miR-8 de la drosophile chez la souris, stimulent l'adipogenèse des MSC murines ST2 via l'inhibition de cette voie Wnt (121). Plus récemment, le miR-210 a été identifié comme ciblant potentiellement le Tcf712 (transcription factor 7-like 2, ou Tcf4), un des facteurs de transcription intervenant en aval de la voie Wnt (122). Il a été observé que la transfection d'analogues du miR-210 dans le modèle de pré-adipocytes 3T3-L1 stimule leur différenciation terminale en adipocytes matures (123).

La stimulation de l'adipogenèse par les miRNA peut également se réaliser au détriment des autres voies de différenciation mésenchymateuse. En effet, la cible principale du miR-204 et de son homologue miR-211 est le facteur de transcription RUNX2 : en inhibant son activité transcriptionnelle cruciale pour l'ostéoblastogenèse, ces miRNA stimulent la différenciation adipocytaire de MSC humaines et murines (124).

A l'inverse, certains miRNA ont un effet inhibiteur sur l'adipogenèse. A titre d'exemple chez l'homme, on peut citer le miR-27b, qui inhibe la différenciation adipocytaire de MSC dérivées du tissu adipeux en ciblant PPAR γ 2 (125).

2ème Partie :

Les tumeurs osseuses primitives

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

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

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

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

- Les tumeurs produisant du tissu osseux : l'ostéosarcome
- Les tumeurs produisant du cartilage : le chondrosarcome
- Les tumeurs produisant du tissu conjonctif : le fibrosarcome
- Les tumeurs d'origine mésenchymateuse peu différenciées : le sarcome d'Ewing
- Les tumeurs d'origine hématologique : le myélome multiple, certaines formes de lymphomes.

Les 2 principaux types de TOP malignes chez l'enfant sont l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing, qui constituent environ 90% de l'ensemble des tumeurs osseuses malignes pédiatriques (126).

Les tumeurs osseuses secondaires correspondent à des lésions métastatiques qui se sont propagées à partir d'autres organes. Si la majorité des cancers peuvent métastaser à l'os, certaines tumeurs sont plus ostéophiles telles que les tumeurs du sein, de la prostate, de la thyroïde, du poumon et du rein. Les métastases osseuses sont principalement composées de cellules d'origine épithéliale (carcinomes), alors que les tumeurs osseuses primitives (TOP) sont des sarcomes, c'est-à-dire des tumeurs non épithéliales mésenchymateuses.

Parmi toutes ces tumeurs, certaines sont purement ostéolytiques, d'autres purement ostéocondensantes, et certaines peuvent induire des lésions mixtes. De plus, il existe une grande hétérogénéité histologique au sein d'un même type tumoral. Pour toutes ces raisons, la classification des tumeurs osseuses est complexe.

I. Origine cellulaire des TOP

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

A. Ostéosarcomes et chondrosarcomes

Les OS et les CS dérivent du mésoderme et il semble que ces deux tumeurs soient directement issues des MSC (127) :

- Tout comme les ostéoblastes, les OS expriment RUNX2, ALP, OC et BSP (128).
- Tout comme les chondrocytes, les CS expriment SOX9, ACAN, COLL1, COLL2 et COLL10 (129).

Les OS et CS résulteraient ainsi d'une dérégulation du programme de différenciation des MSC (figure 13). Au sein de ces tumeurs, on peut retrouver différents degrés de différenciation, selon le niveau de spécialisation de la cellule affectée par la transformation tumorale (130).

L'OS est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales qui dérivent des MSC, des précurseurs ostéoblastiques ou des ostéoblastes (126). Le CS dérive quant à lui des cellules souches mésenchymateuses différenciées dans la voie chondrocytaire (131). Ces deux types tumoraux existent sous différents sous-types histologiques, présentant des degrés de différenciation variés qui peuvent être mis en parallèle avec les stades de différenciation de leurs progéniteurs mésenchymateux.

B. Sarcomes d'Ewing

Contrairement aux OS et CS (présentant différents niveaux de différenciation), les ES sont des tumeurs moins hétérogènes, composées de petites cellules rondes indifférenciées

avec peu de stroma. Leur origine demeure toutefois incertaine et fait encore l'objet de nombreux débats (figure 13).

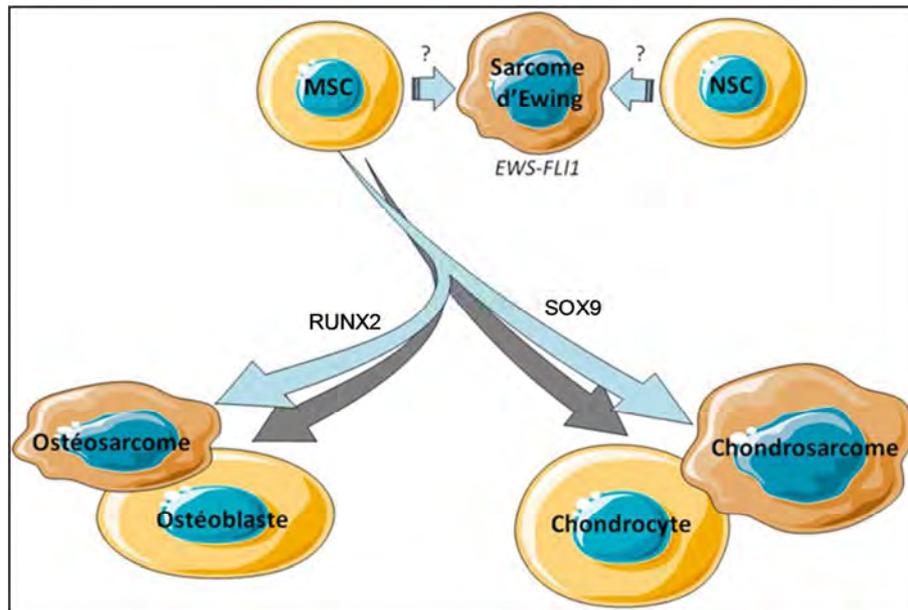


Figure 13 - Origine des ostéosarcomes, des chondrosarcomes et des sarcomes d'Ewing

Les ES sont caractérisés par une translocation chromosomique impliquant EWS et un gène de la famille ETS (132). L'implication phénotypique de la translocation retrouvée dans 85% des cas, EWS-FLI1 (133), est en faveur d'une origine neuroectodermique des ES, qui dériveraient des cellules souches neurales (NSC) (134). Ils ont ainsi été initialement inclus dans la famille des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET), et il est en effet possible *in vitro* de différencier des cellules d'ES dans la voie neuronale (135).

Cependant, compte-tenu de la localisation de ces tumeurs au niveau de l'os et de récents travaux sur EWS-FLI1, une seconde hypothèse avance que les ES ont une origine mésenchymateuse. En effet, il a été notamment prouvé qu'une expression forcée d'EWS-FLI1 dans des MSC de moelle osseuse de souris inhibait les processus d'ostéogenèse et d'adipogenèse (136). A l'inverse, une inhibition d'EWS-FLI1 dans des lignées d'ES leur procure un phénotype proche des MSC et les rend capables de se différencier dans les trois voies mésenchymateuses (137). De plus, l'injection en souris SCID de cellules stromales de moelle osseuse exprimant EWS-FLI1 provoque le développement de tumeurs semblables aux ES (138). Plus récemment encore, il a été montré que l'expression stable d'EWS-FLI1 dans des MSC pédiatriques humaines pouvait induire, dans des conditions de culture appropriées, un profil transcriptomique très proche de celui que présentent des cultures primaires d'ES (139). Les résultats de ces études indiquent ainsi que les ES dérivent probablement d'une transformation des MSC. La différenciation neuronale observée chez des cellules d'ES

pourrait par conséquent s'expliquer par l'origine embryonnaire neuro-ectodermique même des MSC (41).

II. Le chondrosarcome

A. Généralités

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les CS représentent un groupe hétérogène de néoplasmes ayant en commun la production de matrice cartilagineuse par les cellules tumorales (140). Ces tumeurs peuvent également présenter des zones myxoïdes et/ou des plages de calcification et d'ossification.

Les CS constituent le deuxième type de TOP maligne chez l'adulte après l'OS. Ils touchent en particulier des personnes entre 50 et 60 ans, et plus fréquemment les hommes avec un ratio de 1,5-2 :1 (141). En 2009, l'incidence annuelle des CS chez l'adulte a été estimée aux Etats-Unis à 1/200 000 patients (142). Les CS sont rares et plutôt agressifs chez l'enfant.

Ces tumeurs sont principalement localisées au niveau des ceintures pelviennes et scapulaires, des côtes, du sternum ou de la partie proximale des os longs. Plus rarement, elles peuvent également survenir dans les vertèbres, les os du crâne (1%) ou encore dans les petits os de la main et du pied (143,144).

B. Classification

Aujourd'hui, on considère deux grandes catégories de CS, selon leur origine :

- Les CS primaires, qui se développent à partir de l'os sain (figure 15).
- Les CS secondaires, qui dérivent d'une première tumeur cartilagineuse bénigne (figure 16).

1. Les chondrosarcomes primaires

1.1. Le chondrosarcome conventionnel central

Aussi appelé CS primaire central, ce sous-type couvre à lui seul 85% des CS (145). Cette tumeur est caractérisée par une formation anormale de cartilage hyalin à partir de l'intérieur de la cavité médullaire des os.

Les CS conventionnels centraux peuvent présenter trois grades histologiques différents, qui seront attribués lors du diagnostic afin de définir leur agressivité (146). Cette classification se base essentiellement sur des critères de morphologie cellulaire et de cellularité des tumeurs (figure 14) :

- Grade 1 (bas grade) : les tumeurs présentent d'importantes zones cartilagineuses, peu de cellularité et des noyaux de taille uniforme et riches en chromatine. On peut observer occasionnellement des cellules bi-nucléées.
- Grade 2 (grade intermédiaire) : les tumeurs sont plus cellularisées et comportent plus d'atypies nucléaires. Les noyaux contiennent davantage de chromatine et sont plus volumineux.
- Grade 3 (haut grade) : les tumeurs sont très fortement cellularisées et pléiomorphes avec un très grand nombre d'atypies nucléaires. De nombreuses mitoses peuvent être observées.

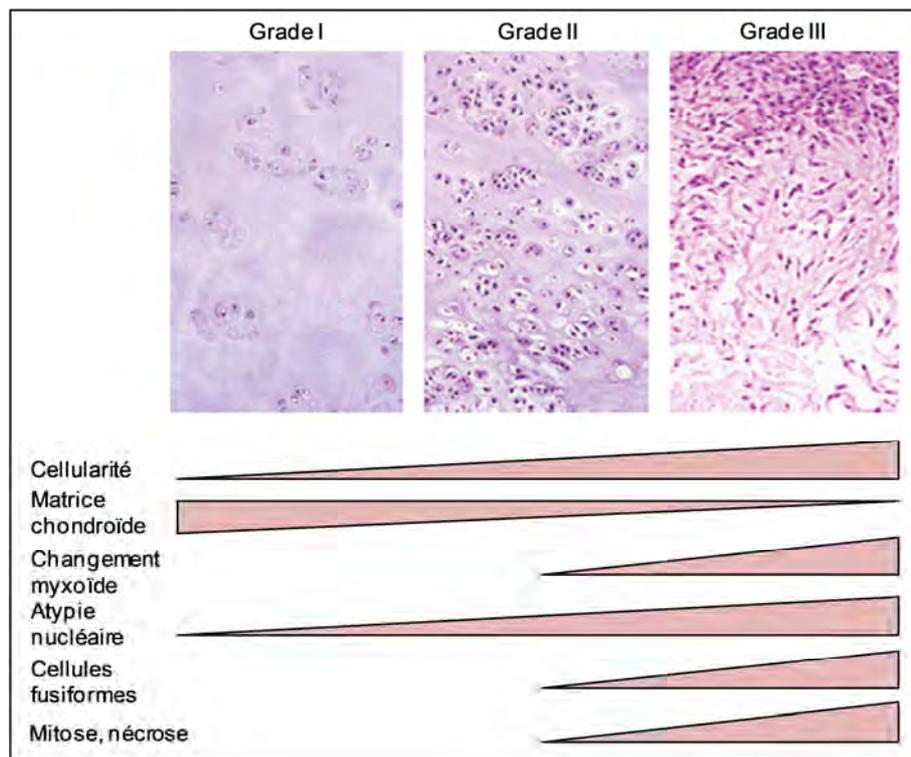


Figure 14 - Classification par grade histologique des CS conventionnels centraux (adapté de (147))

Le grade histologique des CS conventionnels centraux est l'indicateur le plus important pour prédire leur potentiel de récurrence locale et de métastase. En effet, on estime le taux de survie à cinq ans des patients atteints de CS conventionnel central de grade I à 88%, alors qu'il chute à une moyenne de 57% pour les patients touchés par les formes de grades II

et III (141). De plus, 70% des CS conventionnels centraux de grade III développent des métastases (146).

Le pronostic est généralement bon, mais en plus du grade histologique, la taille de la tumeur, l'âge des patients et la qualité de la résection chirurgicale sont autant de facteurs qui influencent le taux de récurrence locale (148,149). 13% de ces récurrences sont de grade supérieur à la tumeur d'origine, et une récurrence d'un CS de bas grade peut même engendrer une tumeur dédifférenciée, au pronostic bien plus sévère (145).

Rarement (moins de 2% des cas), le CS conventionnel peut se déclarer à la surface de l'os : on parle alors de CS périostéal ou juxtacortical (150). Il apparaît principalement le long du fémur et affecte des jeunes adultes de 20 à 40 ans, avec un bon pronostic. Les taux de récurrence locale et de métastase à cinq ans sont de 30 et 17% respectivement, et ces deux taux sont significativement diminués chez les patients traités par large résection chirurgicale (151).

1.2. Le chondrosarcome dédifférencié

Il représente 10% des cas répertoriés de CS. Ce sous-type atypique se caractérise par la présence de deux composants, séparés par une interface clairement définie (152) :

- Un compartiment tumoral cartilagineux s'apparentant souvent à un CS conventionnel central de bas grade.
- Un compartiment tumoral indifférencié fortement cellularisé, pouvant correspondre généralement à un ostéosarcome, un fibrosarcome ou un histiocytome fibreux malin.

Selon des études génétiques, ces deux composants auraient une origine monoclonale commune, mais se seraient par la suite séparés après avoir subi des altérations génétiques différentes (153).

D'un point de vue radiographique, la dédifférenciation est suggérée par une zone fortement démarquée de destruction osseuse agressive associée à une lésion cartilagineuse et à une masse extra-osseuse de tissu mou. Selon ces critères, les CS dédifférenciés sont classés de type 1 à 3 en fonction notamment de la gravité de la destruction osseuse engendrée par la tumeur (154).

La résection chirurgicale large est obligatoire pour les patients atteints de CS dédifférencié. Des essais cliniques ont été réalisés sur de larges cohortes de patients, mais la survie n'est pas significativement améliorée chez les patients ayant reçu un traitement de chimiothérapie combiné à la chirurgie par rapport à ceux traités uniquement par chirurgie

(155,156). La chimiothérapie est cependant généralement ajoutée au traitement lorsque le compartiment dédifférencié de la tumeur est chimiosensible. La radiothérapie peut dans certains cas être utilisée pour les sites difficiles d'accès pour la chirurgie et en soin palliatif (157).

Les CS dédifférenciés font partie des tumeurs osseuses primitives les plus malignes. En effet, le risque de récurrence locale après chirurgie peut aller jusqu'à 50%, et certains cas rapportent l'apparition de ces tumeurs 20 ans après la résection d'un CS primaire (158). Le taux de survie à cinq ans ne dépasse pas les 25% (155) et s'effondre dramatiquement lorsque des métastases sont détectées lors du diagnostic (159).

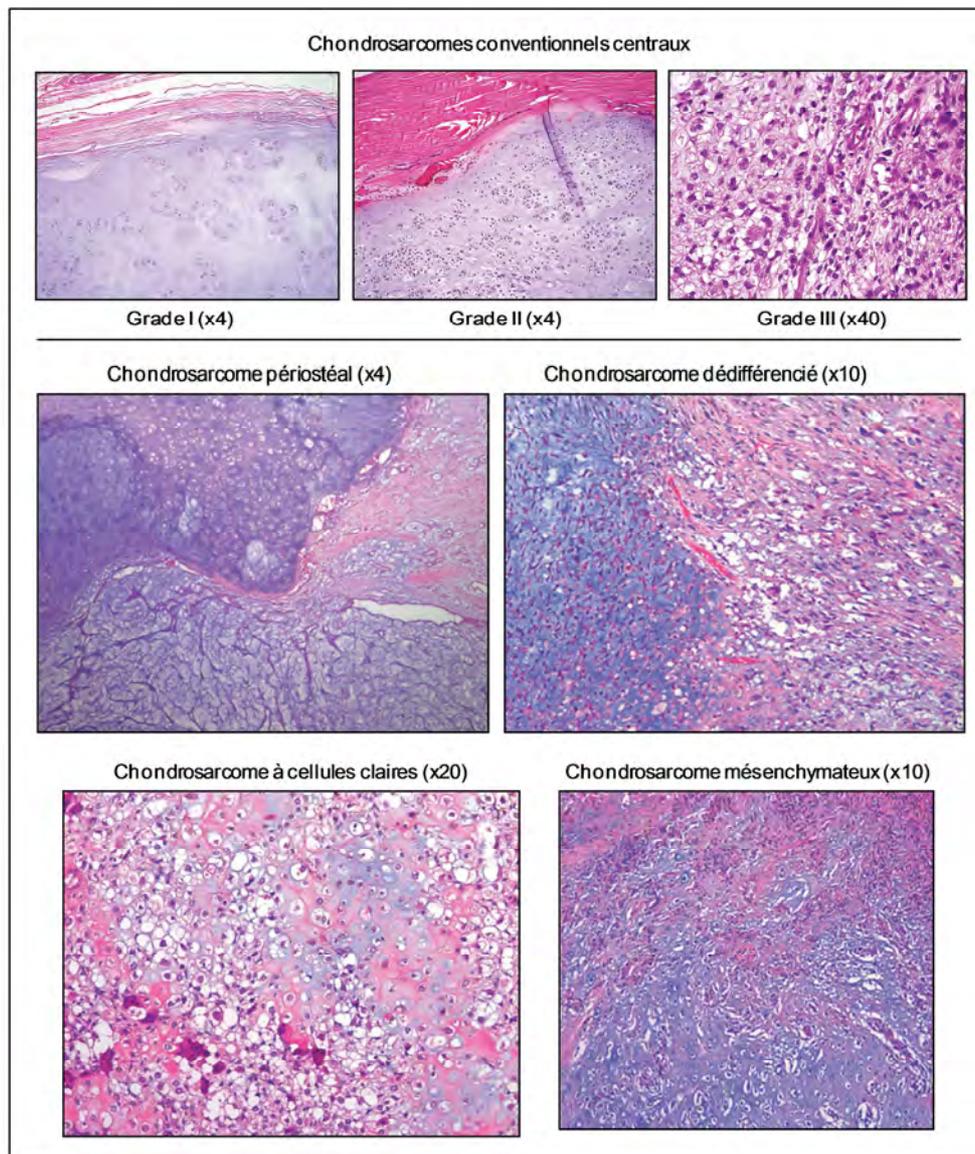


Figure 15 - Histologie des chondrosarcomes primaires (coloration hématoxyline/éosine, d'après (141,147))

1.3. Autres chondrosarcomes primaires rares

En dehors du CS dédifférencié, il existe d'autres formes rares de CS primaires.

Le CS à cellules claires (2%) est un variant de CS de bas grade (160). Il se caractérise histologiquement par la présence de cellules tumorales au cytoplasme vide et clair et de matrice cartilagineuse. Il se déclare principalement chez des hommes de 25 à 50 ans, avec une prédilection pour les épiphyses des os longs. Le pronostic est généralement bon après résection chirurgicale large, mais une chirurgie inadéquate peut conduire à l'apparition de récurrences et de métastases pulmonaires ou osseuses (161).

Le CS mésenchymateux (3%) est une lésion fortement maligne se déclarant dans l'os et les tissus mous de patients entre 20 et 30 ans, et plus particulièrement dans les os crâniofaciaux comme les os de la mâchoire ou encore dans les côtes, l'ilium et les vertèbres (162). Cette tumeur se caractérise par son aspect bimorphique composé de petites cellules rondes et indifférenciées ressemblant à des ES (163) plus ou moins mêlées à des plages de cartilage bien différencié. Le pronostic est défavorable et le rôle de la chimiothérapie dans le traitement est mal défini. Les CS mésenchymateux ont de plus une forte tendance à la récurrence locale et à engendrer des métastases (140).

2. Les chondrosarcomes secondaires

Les patients atteints de CS secondaire sont en général plus jeunes que ceux touchés par un CS primaire. Les CS secondaires sont principalement des tumeurs de bas grade, au pronostic similaire à celui des CS conventionnels (141). Le développement de CS à partir de tumeurs cartilagineuses bénignes dépend de nombreux facteurs tels que CDK4, IGF, HIF, MMP, SRC et AKT, déjà identifiés dans d'autres types de cancers (26).

2.1. Les chondrosarcomes dérivant des enchondromes

Les enchondromes sont des tumeurs bénignes se déclarant au centre de la métaphyse des os et caractérisées par la formation de cartilage hyalin mature. La plupart des enchondromes se manifestent chez des patients entre 30 et 40 ans. Ils sont localisés principalement dans les os longs des membres, et dans 50% des cas dans les os de la main et du pied. La transformation maligne d'un enchondrome solitaire est un évènement rare, et se produit dans moins d'1% des cas (164).

Bien que la majorité des enchondromes soient solitaires, certains patients présentent des enchondromes multiples sous la forme d'une pathologie nommée enchondromatose. Les

deux formes d'enchondromatose les plus répandues sont la maladie d'Ollier, caractérisée par des enchondromes multiples avec une asymétrie affectant particulièrement les os tubulaires des membres, et le syndrome de Maffucci, où ces lésions s'accompagnent d'hémangiomes cutanés, des tissus mous ou viscéraux. Les enchondromes se développant à proximité de la plaque de croissance, il a été supposé qu'ils résultaient d'un défaut dans la différenciation terminale des chondrocytes. Les enchondromes expriment en effet de manière constitutive les gènes codant pour les protéines de la voie Hedgehog, dont l'action inhibe ce processus de différenciation (165). Parmi les patients atteints d'enchondromatose, 8% présentent dans leurs tumeurs une mutation du gène *PTHRI* codant pour le récepteur à la PTHLH (166). Cette anomalie interrompt la boucle de rétrocontrôle IHH-PTHLH, causant ainsi l'activation constitutive de la voie Hedgehog. Dans les enchondromes qui ne comportent pas cette mutation, notamment la maladie d'Ollier et le syndrome de Maffucci, les causes génétiques ou épigénétiques de la pathologie n'ont pas encore été déterminées (167). Une étude récente montre cependant que la majorité des patients atteints par ses deux pathologies présente des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* codant pour les isocitrates déshydrogénases 1 et 2 (*IDH1* et 2) (168).

Les enchondromes peuvent évoluer en CS central secondaire, avec des taux de 30 à 50% chez les patients atteints de la maladie d'Ollier et jusqu'à 100% dans les cas de syndrome de Maffucci (141).

2.2. Les chondrosarcomes dérivant des ostéochondromes

Les ostéochondromes sont les lésions osseuses bénignes les plus communes et constituent 35% de toutes les tumeurs osseuses primaires bénignes. Elles ont la forme de projections osseuses se développant sur la surface de la région métaphysaire des os longs. Elles comportent une enveloppe externe cartilagineuse et une cavité médullaire en continuité avec celle de l'os qu'elles recouvrent (140). Ces tumeurs se développent par ossification endochondrale durant les 10 premières années de la vie et stoppent leur croissance lors de la fermeture des plaques de croissance à la puberté.

17% des patients atteints par cette pathologie possèdent plus d'une tumeur. L'ostéochondromatose multiple (MO) est un syndrome héréditaire autosomal dominant caractérisé par la présence d'un grand nombre d'ostéochondromes qui provoquent différentes difformités orthopédiques (169). Cette pathologie est causée par des mutations inactivatrices dans les gènes *EXT1* et *EXT2* codant pour les exostosines 1 et 2 (170), des enzymes

impliquées dans la biosynthèse de l'héparane-sulfate. Les protéoglycanes d'héparane-sulfate s'accumulent dans le cytoplasme des cellules et ne sont pas sécrétés dans la MEC. Cela provoque une diffusion anormale des ligands de la voie Hedgehog comme IHH, et pourrait causer une désorientation de l'axe de croissance des chondrocytes de la plaque de croissance et un défaut de l'ossification du péri-chondre, qui favoriseraient le développement d'ostéochondromes (171).

Des ostéochondromes peuvent engendrer des CS secondaires périphériques, avec une incidence de 27% dans les cas de MO (172).

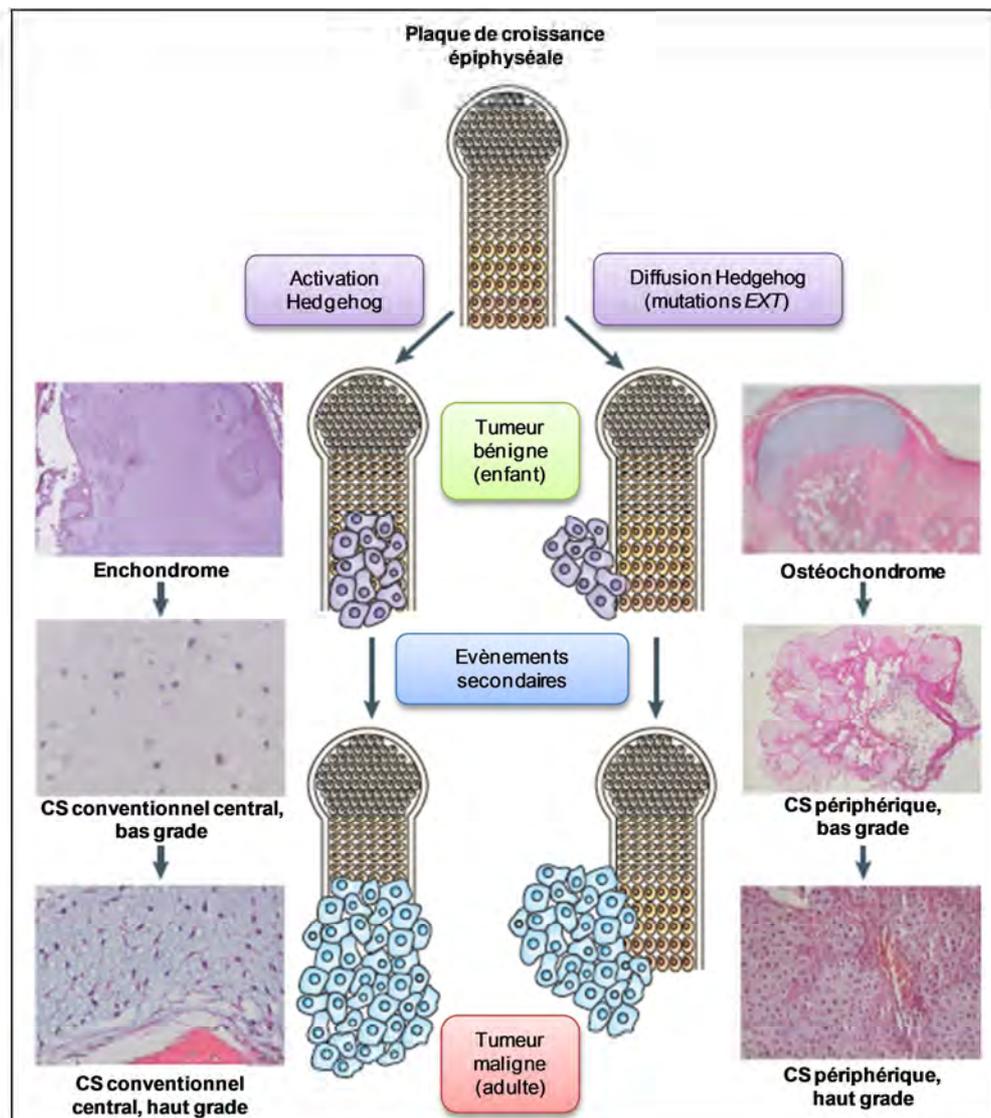


Figure 16 - Développement de CS secondaires à partir de tumeurs cartilagineuses bénignes (adapté de (26))

C. Diagnostic

Le diagnostic des tumeurs cartilagineuses est difficile en raison de la grande similitude entre les lésions bénignes et malignes. Le diagnostic est basé sur des critères cliniques, radiologiques et histologiques. Le CS se présente comme une tumeur douloureuse, localisée aux ceintures ou aux segments proximaux, envahissant les parties molles et dont la taille est supérieure à 5cm. Radiologiquement, c'est une tumeur hétérogène, à contours flous, entraînant une soufflure, un épaissement cortical, une réaction périostée, et induisant une hyperfixation scintigraphique (173).

D. Aspects génétiques

Les premières études cytogénétiques réalisées sur les CS ont révélé une grande variété d'aberrations chromosomiques. Selon les cas, les CS présentaient en effet des caryotypes faiblement réarrangés ou bien des caryotypes extrêmement complexes, aux remaniements multiples et possédant un nombre de chromosomes si important que des cas d'hexaploïdie ont même pu être référencés (174). Cependant, des résultats de Comparative Genomic Hybridization (CGH) semblent indiquer que le nombre et le type d'anomalies chromosomiques dans les CS dépend du sous-type tumoral ainsi que du grade, les CS de grade III montrant les profils les plus aberrants (175,176). Les profils cytogénétiques proches de la diploïdie et possédant peu de pertes d'hétérozygotie (LOH : loss of heterozygosity) sont plus typiques des CS centraux primaires de bas grade que des CS périphériques secondaires, indiquant que les mécanismes génétiques de la tumorigenèse des CS primaires ne font intervenir que peu d'altérations (177).

Les CS conventionnels centraux peuvent se développer à partir de lésions cartilagineuses bénignes comme les enchondromes, mais ils surviennent dans la majorité des cas *de novo* et selon des mécanismes encore méconnus. Des études récentes ont cependant identifié des mutations somatiques ponctuelles aux sites R132 d'*IDH1* (principalement R132C et R132H) et dans une moindre mesure R172 d'*IDH2* (principalement R172S) dans plus de 50% d'une cohorte de 40 CS primaires centraux et d'une cohorte de 23 CS dédifférenciés (178). Ces mutations ont également été référencées dans des cas d'enchondromatose (168) et de CS périostaux mais sont absentes dans d'autres tumeurs cartilagineuses (179) ainsi que dans les OS chondroblastiques (180). Elles sont également très fréquemment identifiées dans les gliomes, les leucémies et les cancers du colon (181).

Les enzymes IDH1 et 2, respectivement cytoplasmiques et mitochondriales, catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -KG) dans le cycle des acides tricarboxyliques de Krebs (TCA). Une mutation du site actif de ces enzymes modifie leurs propriétés et augmente leur affinité pour l' α -KG aux dépens de l'isocitrate : elles synthétisent alors un nouveau métabolite, le 2-hydroxyglutarate, exclusivement sous sa forme D (D2HG), en consommant un coenzyme réduit NADPH au lieu d'en produire (182) (figure 17). Cette perturbation du ratio NADP/NADPH dans des cellules présentant des mutations d'IDH1 provoqueraient ainsi d'importants dérèglements de différentes voies métaboliques, comme cela a pu être montré dans des gliomes (183). Le D2HG agit notamment comme un inhibiteur compétitif des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (2OGD), une classe d'enzymes intervenant dans de très nombreux processus biologiques, notamment la méthylation de l'ADN et des histones, la synthèse du collagène ainsi que la réponse à l'hypoxie (184). En effet, en inhibant sa voie classique de dégradation par le protéasome, le D2HG stabiliserait le facteur de transcription clé HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α), activant ainsi l'expression de ses gènes cibles (185). Cependant, l'expression anormale d'HIF-1 α n'est observée que dans les CS de haut grade (186) et peut donc difficilement être une conséquence d'un évènement précoce comme les mutations d'IDH1 et IDH2. Même si ces deux mutations semblent avoir un impact majeur sur la biologie des cellules touchées, leur rôle dans la tumorigenèse des CS n'est donc pas encore clairement établi.

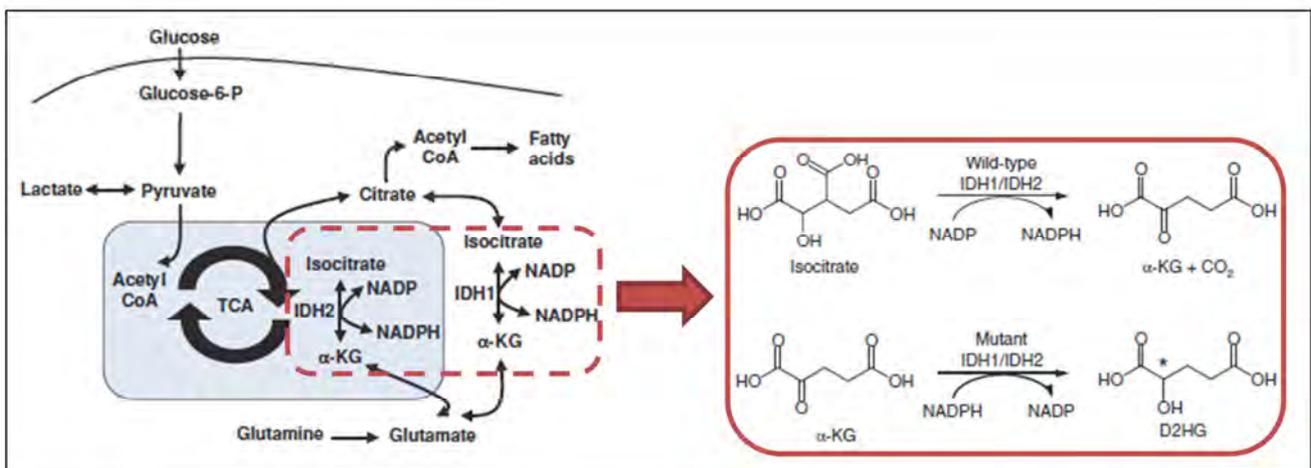


Figure 17 - Rôle des enzymes IDH1 et IDH2 dans le cycle des acides tricarboxyliques et conséquence de leur mutation sur le métabolisme (adapté de (184))

Bien que le rôle du facteur de transcription p53 dans la pathobiologie du CS conventionnel central demeure incertain, cette protéine est surexprimée dans une majorité des CS de haut grade (187). De plus, ces formes agressives présentent également souvent des altérations de la région chromosomique 17p1 portant le gène *TP53* voire des mutations de ce

gène, ce qui suggère que des anomalies de p53 seraient des événements tardifs impliqués dans la progression des CS (26).

Les aberrations génétiques les plus fréquentes dans les CS conventionnels centraux touchent les voies p53 et RB, dans 96% des cas pour les formes de haut grade (188). L'amplification de la région 12q13 et la perte de la région 9p21 font partie des principales anomalies (189). Ces régions contiennent en effet plusieurs gènes qui codent pour des protéines de la voie p53. La région 12q13 porte les gènes codant pour MDM2, un inhibiteur de p53, et la kinase cycline-dépendante (CDK4), qui régule le cycle cellulaire. La région 9p21 inclue le gène *CDKN2A*, qui code pour deux protéines distinctes assurant la liaison entre les voies RB et p53 : p16INK4A (p16) est capable d'induire le blocage du cycle cellulaire en phase G1 via l'inhibition des kinases CDK4 et 6, et p14ARF (p14) induit l'arrêt des phases G1 et G2 en empêchant la dégradation de p53 induite par MDM2 (figure 18). Chez les CS, la perte de l'expression de p16 corrèle en outre avec l'augmentation du grade histologique (190,191).

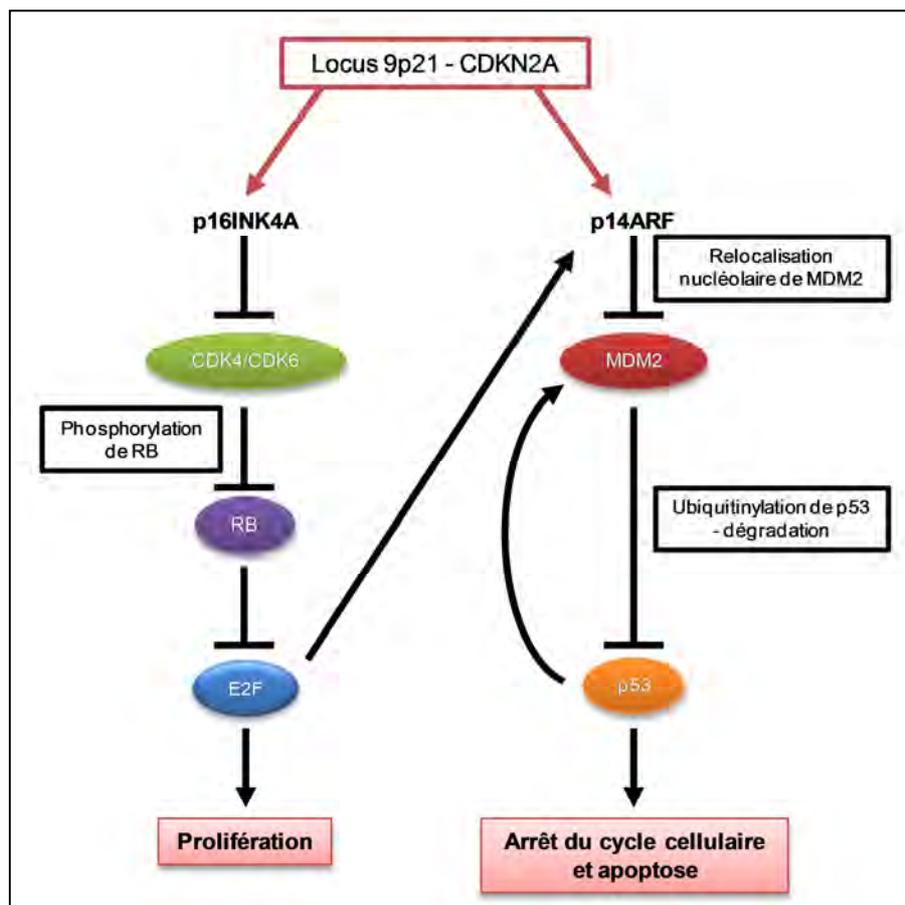


Figure 18 – Interconnexion des voies RB et p53 par les protéines p16INK4A et p14ARF (d'après (192))

Récemment, le séquençage complet de l'exome de 49 CS de différents grades et sous-types a permis de mettre au jour des mutations somatiques du gène *COL2A1* dans 44% des cas. D'après cette étude, les tumeurs de haut grade (central grades II et III et dédifférencié) sont plus susceptibles de présenter plusieurs mutations sur ce gène. De plus, aucune mutation de *COL2A1* n'a été détectée dans d'autres tumeurs cartilagineuses, des OS, des chordomes et des méningiomes, indiquant une possible hypermutabilité spécifique de ce gène dans les CS (193). Ces mutations de *COL2A1* provoqueraient des défauts dans le processus de maturation du *COLL2* via la production de chaînes α précurseurs ou pro-collagène aberrantes. Cela pourrait avoir un effet fondamental sur la synthèse de la matrice cartilagineuse et les voies de signalisation impliquées dans la différenciation chondrocytaire, et contribuerait ainsi à l'oncogenèse des CS (193).

E. Traitement

Le traitement principal des CS consiste en une large exérèse de la tumeur par chirurgie, en particulier pour les tumeurs de grade II et III. Les CS du pelvis et de la colonne vertébrale sont ainsi les plus difficiles à traiter en raison de la taille de la tumeur et de sa proximité avec des structures vitales telles que la vessie et la moelle épinière. Le risque de récurrences locales suite à des marges de résection insuffisantes est le plus élevé dans ce groupe de patients (194). En raison de leur faible potentiel métastatique et taux de récurrence locale, les CS de grade I peuvent être traités par curettage de la lésion à proximité de l'os, avec ou sans adjuvant local (phénol, cryothérapie). Le défaut osseux réalisé peut être reconstruit par allogreffe ou greffe d'os autologue, ou encore en utilisant du polyméthylméthacrylate (195). L'exérèse large demeure cependant le traitement le plus approprié dans le cas des CS de grade I présentant des critères cliniques et radiologiques d'agressivité (145).

La chimiothérapie n'est pas efficace pour traiter les CS, en particulier les sous-types conventionnels et à cellules claires. Des essais cliniques ont néanmoins été récemment conduits pour évaluer les effets d'un traitement successif de gemcitabine et de docetaxel dans des formes non résécables et des récurrences locales, mais la probabilité d'un taux de réponse de 20% au traitement n'était au final que de 14%, avec des effets partiels observés sur seulement 2 patients sur 25 (196). Un autre essai a été lancé en 2005 pour évaluer l'effet sur des CS de haut grade du Permetrexed disodium (2), un anti-folate multicible efficace notamment pour le traitement des carcinomes pulmonaires non à petites cellules, qui présentent de fréquentes délétions du gène *MTAP* codant pour la méthylthioadénosine

phosphorylase, une enzyme clé de la voie de synthèse *de novo* des purines (197). Les résultats de cette étude n'ont pas été publiés, mais les CS présentant souvent une délétion du locus 9p21 contenant à la fois les gènes *CDKN2A* et *MTAP* (198), ils sont donc des candidats potentiels pour cette nouvelle génération d'agents de chimiothérapie.

Les CS sont considérés comme radiorésistants. Si cette propriété est souvent attribuée à leur progression lente (145), elle pourrait aussi être liée à la perte de l'expression de p16. Une restauration de cette expression dans les CS serait donc un moyen d'améliorer leur radiosensibilité (199). Le blocage par siRNA (small interfering RNA) de gènes impliqués dans les voies apoptotiques (*BCL2*, *BCL2L1*, *XIAP*) est une autre méthode possible pour outrepasser la chimio- et radiorésistance intrinsèque des CS, comme cela a été prouvé *in vitro* dans les lignées établies JJ012 et SW1353 (200).

Plusieurs thérapies ciblées sont aujourd'hui en cours d'investigation :

- Des inhibiteurs d'IHH, comme le triparanol, sont capables de réduire la prolifération cellulaire et la croissance tumorale des CS. Cependant, leurs importants effets cytotoxiques en limitent actuellement les applications cliniques (165).
- L'activité de la PTHLH est importante dans les CS périphériques et centraux de haut grade (167). Son expression étant régulée par la protéine anti-apoptotique BCL-2 dans une boucle de rétrocontrôle (201), un blocage de l'un de ces deux marqueurs pourrait avoir des conséquences sur la prolifération des CS (202,203).
- L'angiogenèse tumorale est induite par l'hypoxie via une surexpression du facteur de transcription HIF-1 α , qui active à son tour l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques comme le VEGFA (204). Les CS de haut grade expriment HIF-1 α plus fortement que dans des chondrocytes normaux ou des tumeurs cartilagineuses bénignes, et la détection dans les tumeurs de sa forme nucléaire active constituerait un nouveau marqueur diagnostique de pronostic défavorable (205). Une stratégie antiangiogénique prometteuse a été réalisée en utilisant l'inhibiteur SU6668 des récepteurs à tyrosine kinase pour le VEGFA, le FGF et le PDGF (platelet-derived growth factor), avec un effet bénéfique sur le volume tumoral et la densité de néovascularisation *in vivo* (206).

F. Chondrosarcome et chimiorésistance

Comme énoncé précédemment, les CS sont considérés comme des tumeurs chimiorésistantes. L'origine de cette chimiorésistance est toutefois inconnue et sujette à de

nombreuses controverses, mais dépendrait à la fois de facteurs intrinsèques et extrinsèques (figure 19).

1. Causes intrinsèques de la chimiorésistance des CS

1.1. Multiple Drug Resistance

Les MRP (multidrug resistance protein) sont des protéines de la super-famille des transporteurs ABC (transporteurs à ATP binding cassette). Ces pompes à efflux transmembranaires ATP-dépendantes sont responsables du phénotype appelé Multiple Drug Resistance (MDR). Elles présentent en effet une affinité pour un large spectre de drogues, et confèrent ainsi à des cellules tumorales la capacité de résister à l'effet de nombreux agents anticancéreux (207).

Parmi ces protéines, la Pgp (P-glycoprotein) ou MDR1 (multidrug resistance protein 1), codée par le gène *ABCB1* ou *MDR1*, assure l'évacuation des petites molécules hydrophobes dans de nombreuses cellules à activité sécrétoire, telles que les cellules tubulaires du foie ou les cellules épithéliales de la vésicule biliaire (208). Elle est également exprimée au niveau osseux, dans la région hypertrophique de la plaque de croissance (209). Il a été prouvé qu'une surexpression du gène *MDR1* dans des cellules humaines en culture leur conférait une résistance à de nombreux agents anticancéreux (notamment la doxorubicine (DOX), le cyclophosphamide, la vincristine, le cisplatine (CIS) et le méthotrexate) ainsi qu'à d'autres molécules thérapeutiques hydrophobes (210). En 1997, Rosier et collaborateurs ont observé l'expression de la Pgp dans des biopsies de CS, proportionnellement au grade tumoral (209). Dans une étude ultérieure, il a été montré que les cellules de CS exprimant la Pgp accumulaient moins de DOX intracellulaire et étaient insensibles *in vitro* à ses effets cytotoxiques dans les concentrations thérapeutiques (211). Inversement, le blocage du gène *MDR1* par un siRNA a permis d'améliorer significativement la chimiosensibilité de lignées de CS, le phénomène étant amplifié en bloquant simultanément *MDR1* et les gènes antiapoptotiques *XIAP* ou *BCL2L1* (200).

Conjointement à la Pgp, les CS expriment d'autres transporteurs ABC jouant un rôle dans le phénomène de MDR. En effet, l'activité des pompes MRP1 (ou ABCC1) (212) et BCRP (ou ABCG2) (213) a été récemment observée dans plusieurs lignées de CS, à des niveaux toutefois très hétérogènes (214).

1.2. Dérégulation des voies apoptotiques

L'initiation de la mort cellulaire programmée ou apoptose passe par deux voies alternatives. Ces voies dites intrinsèques et extrinsèques mènent toutes deux à l'activation des caspases, qui clivent les substrats cellulaires et induisent les changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose (215).

La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs transmembranaires DR4/DR5 et CD95/Fas, qui sont activés par le TNF α , FasL ou TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Suite à ces interactions ligand-récepteur, le complexe DISC (death-inducing signaling complex) est assemblé et recrute les caspases initiateuses comme la caspase-8 qui vont activer les caspases effectrices telles que la caspase-3 (216).

De nombreux stress cellulaires comme des dommages à l'ADN ou des conditions hypoxiques activent en revanche la voie intrinsèque de l'apoptose. Le mécanisme central de cette voie alternative passe par des modifications du ratio entre les protéines pro- comme BAX, BAD ou PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) et anti-apoptotiques comme BCL-2 et BCL2L1/BCL-XL de la famille BCL-2 (217). Ces protéines agissent en stimulant ou en bloquant des changements de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Une augmentation de cette perméabilité provoque la libération de facteurs pro-apoptotiques, notamment le cytochrome C, qui vont activer les caspases effectrices 9 et 3 (216).

Certaines lignées de CS expriment les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et XIAP à des niveaux plus élevés que des chondrocytes sains *in vitro* (218). De plus, le blocage des protéines de la famille BCL-2 par l'inhibiteur ABT-737 (219) dans des lignées de chondrosarcome activerait les voies apoptotiques, les rendant plus sensibles au CIS et à la DOX (214). D'autres protéines antiapoptotiques joueraient un rôle dans la résistance aux drogues des CS. Par exemple, la survivine (BIRC5), une protéine de la famille des IAP (inhibitor of apoptosis protein) comme XIAP (220), est exprimée dans les CS *in vivo* et *in vitro*, et semble avoir un effet protecteur contre les effets cytotoxiques de la DOX dans la lignée SW1353 (221).

2. Causes extrinsèques de la chimiorésistance des CS

La majorité des études portant sur la chimiorésistance des CS a été réalisée sur des cellules en culture. Cependant, la chimiorésistance des CS pourrait également s'expliquer par des facteurs liés au microenvironnement tumoral : on parle d'EMDR (environment-mediated drug resistance) (222).

Les cellules tumorales des CS se développent au sein d'une abondante MEC, dont les composants et l'organisation altèrent la diffusion des molécules. Il est donc possible que la chimiorésistance des CS soit provoquée par la MEC cartilagineuse qu'elles produisent et qui constitue une barrière physique à la diffusion des drogues, qui ne pourraient plus atteindre les cellules tumorales. De plus, les CS étant des tumeurs à développement lent, elles répondraient moins efficacement à la majorité des drogues, qui ciblent les cellules à forte activité proliférative (145).

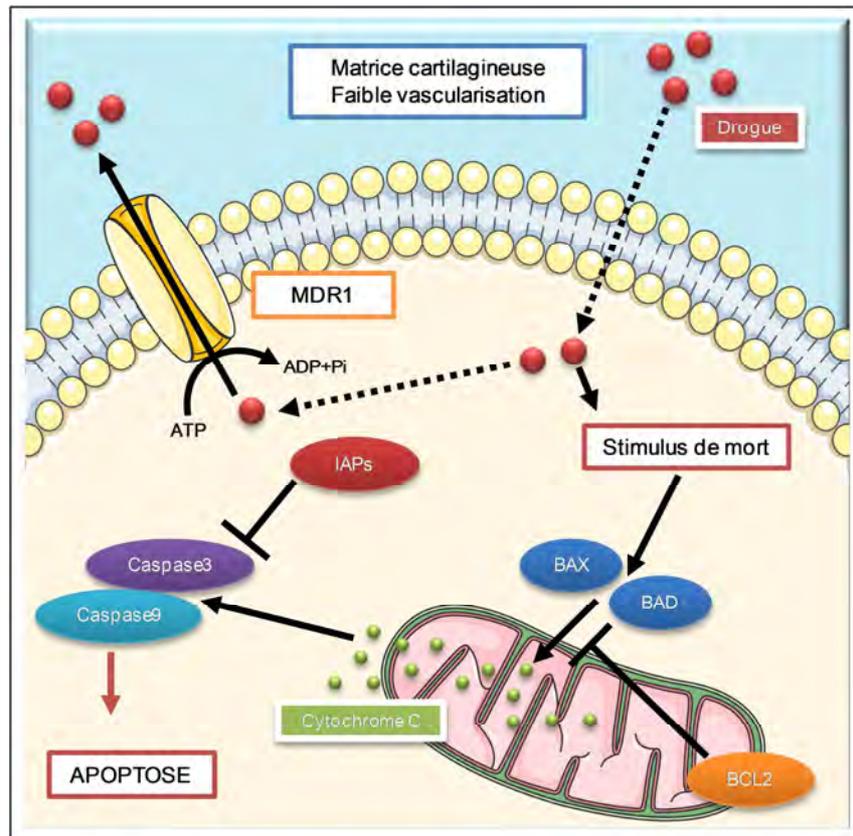


Figure 19 - Origines intrinsèques et extrinsèques possibles de la chimiorésistance des chondrosarcomes

Les CS sont des tumeurs faiblement vascularisées. En effet, si le tissu fibreux en périphérie des CS conventionnels centraux présente les signes d'une néoangiogenèse active avec ses capillaires matures entourant les nodules cartilagineux (223), on observe généralement très peu de vaisseaux au sein de la matrice cartilagineuse, en contact direct avec les cellules chondrocytaires tumorales (224). En revanche, les CS conventionnels centraux de haut grade mais surtout les CS dédifférenciés présentent une densité importante de microvaisseaux intracartilagineux (225). Dans ces formes agressives de CS, la voie de réponse à l'hypoxie médiée par le facteur de transcription HIF-1 α est en effet plus active (205), ce qui stimule l'expression de gènes pro-angiogéniques comme *VEGFA* (224). La faible vascularisation intracartilagineuse des CS pourrait constituer un autre obstacle pour les

agents de chimiothérapie ciblant les cellules tumorales. En considérant cette hypothèse, les CS de haut grade, plus vascularisés que des formes moins agressives, seraient donc potentiellement de meilleurs répondeurs à de nouveaux traitements chimiothérapeutiques.

III. L'ostéosarcome

A. Epidémiologie

L'OS constitue la TOP maligne la plus fréquente, avec 4,8 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 20 ans aux Etats-Unis (226) et 3,6 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 15 ans en France (227). Elle représente la moitié des cas de TOP diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes).

L'OS survient généralement dans une population jeune. 75% des OS sont en effet diagnostiqués entre 8 et 25 ans (avec une médiane d'âge de 18 ans), à une fréquence légèrement plus élevée chez les garçons que chez les filles (228). Les OS sont souvent diagnostiqués au décours d'une fracture pathologique. Un second pic d'incidence est observé autour de 50 ans, correspondant aux OS se développant au cours de la maladie de Paget ou aux ostéosarcomes secondaires à une radiothérapie (figure 20).

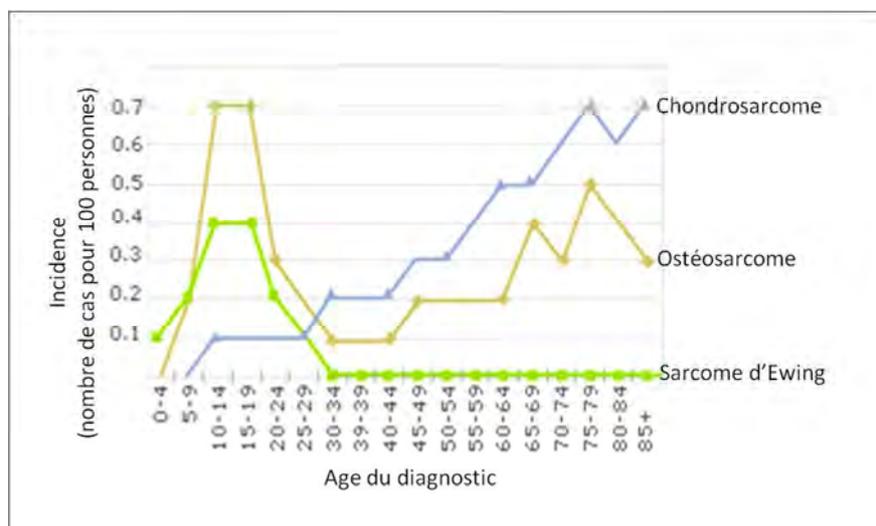


Figure 16 - Incidence des tumeurs osseuses primitives malignes en fonction de l'âge (adapté de (126))

B. Localisations

Dans 90% des cas, l'OS se développe au niveau des métaphyses des os longs. Il est principalement localisé au niveau du genou : extrémité inférieure du fémur (40%) et extrémité

supérieure du tibia (15%), puis à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14%), soit les sites correspondant aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Il existe des atteintes diaphysaires et épiphysaires ainsi qu'au niveau des os plats ou des os courts (au niveau du tronc et du crâne), mais elles sont néanmoins beaucoup plus rares.

Le site métastatique préférentiel est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient. La présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients. Plus rarement, des métastases peuvent être retrouvées au niveau des os ou de tissus mous comme le foie ou le pancréas (229,230).

C. Caractéristiques et classification histologique

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

Ces tumeurs pouvant produire plusieurs types de MEC et présenter des degrés de différenciation différents, leurs propriétés histologiques peuvent varier très fortement, pas seulement d'un cas à l'autre mais également d'une zone à l'autre dans le même cas. De nouvelles classifications prennent en compte ces éléments et classifient les différents sous-types d'OS selon leur aspect histologique prédominant mais aussi selon leur localisation anatomique et parfois leur grade histologique (231).

Plus classiquement, on distingue trois grandes catégories d'OS selon leur localisation :

- Les OS centraux ou intramédullaires, les plus fréquents, regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité (figure 21).
- Les OS de surface ou juxtacorticaux.
- Les OS intracorticaux, extrêmement rares.

1. Les ostéosarcomes centraux

1.1. L'ostéosarcome conventionnel

Les OS conventionnels se présentent comme des tumeurs dures ou charnues centrées au niveau des métaphyses et souvent de grande taille. Ces lésions atteignent souvent le cortex de l'os et sont associées à une masse de tissu mou. S'ils se développent principalement au niveau des os longs des membres, leur incidence à apparaître dans les os du crâne, du bassin et dans la colonne vertébrale est plus faible mais augmente avec l'âge.

Histologiquement, l'OS conventionnel se présente comme une tumeur anaplasique très pléiomorphe, avec une grande variété de morphologies cellulaires (fusiformes, ovoïdes, cellules claires, cellules géantes mono- ou multi-nucléées, etc). Le diagnostic est essentiellement basé sur l'identification de l'ostéoïde, une matière intercellulaire dense et amorphe, d'épaisseur variable et qui apparaît rosée en coloration hématoxyline/éosine. Contrairement aux surfaces collagéniques non osseuses qui ont tendance à se présenter comme linéaires et fibrillaires, l'ostéoïde apparaît plutôt sous forme de lignes courbes avec une arborisation et quelques lacunes. Cette matrice osseuse immature possède également une prédisposition à se déposer sur l'os trabéculaire sain pré-existant (126).

50% des OS conventionnels sont dits ostéoblastiques, en raison de leur capacité à synthétiser de la matrice osseuse sous forme d'ostéoïde ou d'os ectopique. Il existe cependant des OS qui produisent de la matrice chondroïde, principalement du cartilage hyalin de haut grade associé et mélangé aléatoirement avec des éléments non chondroïdes. Ces tumeurs représentent 25% des cas d'OS conventionnels et sont identifiés en tant qu'OS chondroblastiques. Dans les mêmes proportions, les OS fibroblastiques se présentent comme des sarcomes malins de haut grade avec ou sans cartilage et une faible quantité de matrice osseuse. D'aspect général, ces tumeurs sont assez proches des fibrosarcomes (232).

1.2. L'ostéosarcome télangiectasique

Ce sous-type d'OS intramédullaire ne représente que 4% de tous les cas d'OS. Il se déclare généralement chez les individus entre 20 et 30 ans avec une prédominance pour les hommes. Cette tumeur purement ostéolytique se caractérise par de larges espaces hémorragiques, avec ou sans cloison. D'étiologie inconnue, elle a néanmoins été dans certains cas associée à la maladie de Paget (233) ou au rétinoblastome (234).

1.3. L'ostéosarcome à petites cellules

Ne constituant qu'1 à 2% des OS, ce variant histologique présente des propriétés d'OS mais aussi d'ES. Ses cellules sont en effet de petite taille, avec un noyau rond et hyperchromatique possédant très peu des caractéristiques pléiomorphes des OS. De plus, elles présentent dans la plupart des cas des caractéristiques moléculaires des ES telles que l'expression membranaire de CD99 et la présence de la translocation chromosomique spécifique entre les chromosomes 11 et 22 (231).

En raison de ses similitudes avec les ES, le diagnostic de ces tumeurs est très délicat, et une attention toute particulière doit être appliquée à la discrimination entre la matrice osseuse et les dépôts de fibrine visibles parmi les cellules d'ES.

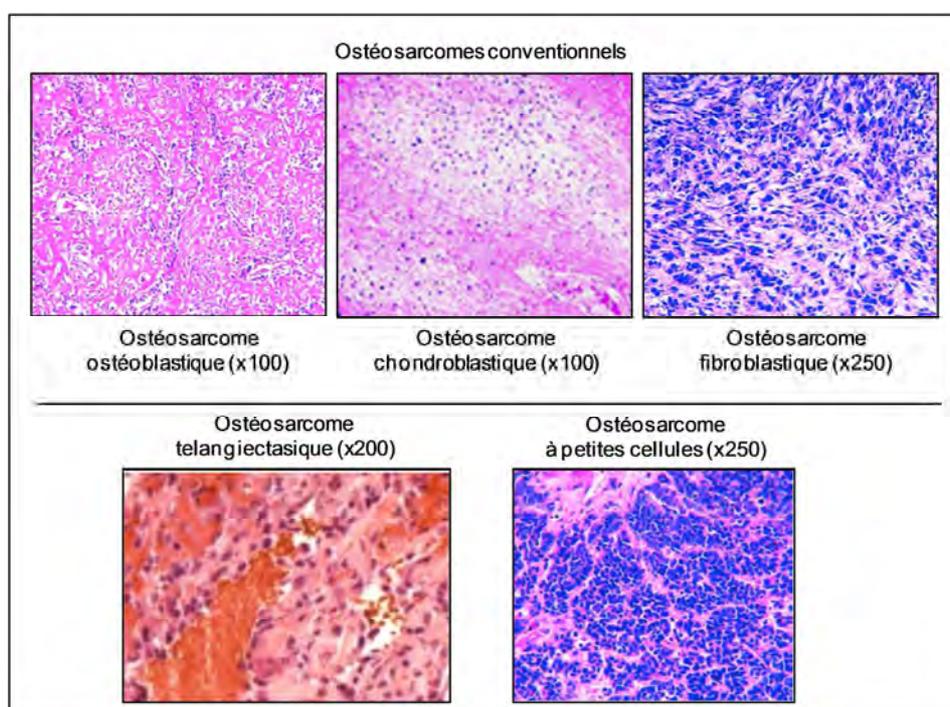


Figure 17 - Histologie des ostéosarcomes centraux (hématoxyline/éosine, d'après (231,235))

2. Les ostéosarcomes de surface

Les OS de surface ou juxtacorticaux sont des OS dont les épacentres se situent à l'extérieur du cortex de l'os sous-jacent. Ils surviennent généralement à proximité du périoste ou du cortex de l'os avec une implication minimale de la cavité médullaire. Contrairement aux sous-types conventionnels, ces lésions touchent principalement des individus entre 30 et 40 ans.

Il existe deux grands types d'OS de surface :

- L'OS parostéal est un ostéosarcome bien différencié qui se développe à la surface d'une pièce osseuse, le fémur le plus fréquemment. Il correspond à moins d'un cas sur 20, et son pic d'incidence survient presque dix ans après celui de l'OS conventionnel. Les OS parostéaux présentent généralement un grade histologique faible, mais les formes dédifférenciés sont localement plus agressives.
- L'OS périosté, beaucoup moins commun que l'OS parostéal, se développe entre le cortex et le périoste de l'os. Principalement localisé au niveau des diaphyses fémorale ou tibiale, cet OS produit une MEC essentiellement cartilagineuse. Le grade histologique de ces tumeurs se situe à l'intermédiaire entre le grade I des OS parostéaux et les hauts grades des OS conventionnels.

Si la majorité des OS de surface sont des tumeurs peu agressives, 10% des cas présentent des grades histologiques élevés. Dans les deux cas, ces formes d'OS ont une propension pour la récurrence locale et une capacité très limitée à métastaser.

D. Diagnostic

La principale manifestation clinique de l'OS est la douleur, qui apparaît en premier lieu au site tumoral puis se propage aux articulations voisines. Plus tardivement, une masse sensible à la palpation apparaît et peut gêner selon sa taille la mobilité de l'articulation. A un stade plus tardif, des signes inflammatoires cutanés et une stase veineuse deviennent visibles.

La majeure partie du diagnostic repose sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie et sur l'imagerie médicale :

- La radiographie conventionnelle révèle les lésions ostéolytiques ou ostéocondensantes.
- La scintigraphie osseuse permet la visualisation de lésions multiples.
- L'imagerie en coupe de type résonance magnétique (IRM) ou tomographie par émission de positrons (TEP) sont très utiles pour déterminer la nature de la tumeur, son extension locale et la présence de métastases, notamment dans les poumons.

E. Etiologie

1. Ostéosarcome et croissance

L'âge de survenue au moment de la poussée de croissance pubertaire, la localisation souvent métaphysaire de ces tumeurs et l'incidence élevée des OS chez les chiens de grande taille (236) suggèrent un lien entre la croissance osseuse et la survenue de ces tumeurs. L'OS se développe en effet plus fréquemment chez des sujets de grande taille, et à l'inverse une plus faible incidence a été mise en évidence dans les populations asiatiques et afro-américaines (237).

2. Pathologies prédisposant à l'ostéosarcome

Si les causes exactes de survenue d'un OS restent inconnues, certaines prédispositions peuvent être impliquées dans la pathogenèse et la résistance des OS (238) :

- Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine. Elle apparaît habituellement avant l'âge de 5 ans et est liée à une mutation des 2 allèles du gène *RBI*. La survenue d'un second cancer (OS dans la moitié des cas) est fréquente chez ces patients, pour qui les OS s'observent 100 fois plus que dans la population normale (239).
- Le syndrome de Li-Fraumeni est une anomalie innée de l'un des allèles du gène *TP53*, où l'enfant développe de multiples tumeurs aussi bien sarcomateuses que carcinomateuses, et notamment des OS (240).
- Le syndrome de Rothmund-Thomson est lié à une mutation sur le chromosome 8. Il se caractérise principalement par des troubles cutanés, des anomalies osseuses congénitales et un risque accru d'apparition d'OS (241).
- La maladie de Paget est une pathologie chronique qui associe des anomalies de l'architecture de l'os à une fibrose de la moelle. Les patients atteints peuvent développer un OS suite à une modification pathologique du processus de remodelage osseux (242).

3. Anomalies cytogénétiques fréquentes

Les OS se développent en général de façon sporadique et sont caractérisés par des caryotypes complexes présentant de multiples réarrangements (translocations, amplifications ou délétions). Une étude récente a par ailleurs identifié le mécanisme nommé chromotrypsie,

un évènement chromosomique aboutissant à leur fragmentation suivi de leur réassemblage anarchique, dans plusieurs OS (243).

Des approches génomiques ont identifié un certain nombre d'altérations génétiques touchant des molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et liées à la pathogenèse de l'OS (244). Le plus fréquemment, les OS présentent les anomalies suivantes (245):

- Des mutations des gènes *TP53* (environ 50% des patients) ou *RBI* (70% des cas). Il a d'ailleurs été prouvé qu'une délétion de ces deux gènes dans des ostéoblastes murins induisait le développement d'OS chez l'animal (246).
- L'amplification de *MDM2* et de *CDK4*.
- L'inactivation de p16INK4A et de p14ARF suite à la délétion du gène *CDKN2A*.
- La délétion du gène *TWIST* impliqué dans le développement embryonnaire (247).
- La surexpression de l'oncogène *c-MYC*, qui code pour un facteur de transcription et de régulation du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN (248).

Le manque de données sur les mécanismes moléculaires d'oncogenèse des OS rend plus difficile le diagnostic ainsi que le développement d'approches thérapeutiques ciblées. Toutefois, la présence de ces altérations génétiques a pu être corrélée à l'agressivité des tumeurs et à la survie des patients (248).

F. Traitement

1. Voies thérapeutiques classiques

Le traitement de l'OS est généralement réalisé en 3 phases :

- 3 mois de chimiothérapie néoadjuvante
- Résection chirurgicale de la tumeur
- 6 mois de chimiothérapie adjuvante

La radiothérapie se révèle quand à elle une technique peu efficace dans ce type de tumeur.

Quand seul un traitement local est effectué, la dissémination métastatique apparaît dans plus de 80 % des cas. L'approche multidisciplinaire associant chimiothérapie et chirurgie a permis depuis le début des années 1980 une amélioration considérable du pronostic. Avec

les stratégies thérapeutiques actuelles, la survie des patients à 5 ans est de 60 à 70 % mais chute à 30 % lorsque des métastases pulmonaires sont présentes lors du diagnostic.

La conservation du membre après la chirurgie est possible chez la grande majorité des patients (> 90 %), mais l'amputation reste la seule solution en cas de tumeur trop volumineuse et invasion des tissus mous avoisinants (249). La reconstruction après OS du genou se fait le plus souvent par l'apposition d'une endoprothèse.

En France, l'OS est pris en charge par plusieurs agents de chimiothérapie (figure 22) aux cibles et effets variés (250), les plus utilisés étant :

- Des agents alkylants, comme le cisplatine (251) et l'ifosfamide, analogue structurel du cyclophosphamide (252). Ces agents électrophiles permettent le remplacement d'un proton de l'ADN par un radical alkyl. Cette modification peut engendrer des altérations biochimiques des bases, des défauts de liaisons entre les bases ou des liaisons inter/intrabins. Si la désorganisation de l'ADN est trop importante, elle aboutira à l'apoptose des cellules. La résistance à ce type d'agent réside dans une accélération des processus de détoxification dans les cellules tumorales.
- Des agents intercalants, comme la doxorubicine/adriamycine (253). Ces cytotoxiques ont des structures chimiques composées de plusieurs noyaux aromatiques condensés capables de s'insérer et de provoquer des distorsions de l'ADN. Cette modification conformationnelle empêche la progression des ARN et ADN polymérase, et inhibe de ce fait la réplication et la transcription de l'ADN. Ces agents exercent également leur action en générant des radicaux libres ou encore en se liant aux ADN topoisomérases II, entraînant des cassures mono et bicaténares.
- Des antimétabolites, comme le méthotrexate. Ces molécules sont des analogues structurels des acides nucléiques dont le ribose a été modifié ; ils sont alors inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques. Ces molécules n'agissent pas directement sur l'ADN des cellules mais indirectement en amont. Dans le cas du méthotrexate, il agit en tant qu'inhibiteur de la dihydrofolate réductase, enzyme clé de la voie de biosynthèse *de novo* des acides nucléiques via l'acide folique, mais aussi de la thymidilate synthétase (254).
- Des inhibiteurs des topoisomérases, des enzymes assurant l'enroulement ou le déenroulement de l'ADN en créant des coupures transitoires de l'un ou des deux

brins de l'ADN puis des ligations. Ces drogues, parmi lesquelles l'étoposide/vépiside (255), stabilisent le complexe de clivage, empêchant ainsi l'étape de ligation et provoquant une coupure définitive des brins d'ADN qui conduit à l'apoptose des cellules.

La combinaison des molécules de chimiothérapie, les doses et la fréquence des injections dépendent de l'âge du patient et des données histologiques de la biopsie qui déterminent la nature et le grade de l'OS. Au moment de l'exérèse chirurgicale, la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie pré-opératoire est déterminée par l'appréciation de la nécrose tumorale qui quantifie le pourcentage moyen de cellules viables sur la pièce de résection : cette évaluation est le grade de Huvos (256). Un patient est considéré comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose est observée sur la pièce de résection. La chimiothérapie post-opératoire est ensuite adaptée en fonction de la qualité de la réponse histologique : un bon répondeur recevra le même traitement qu'en pré-opératoire alors qu'il sera modifié pour un mauvais répondeur.

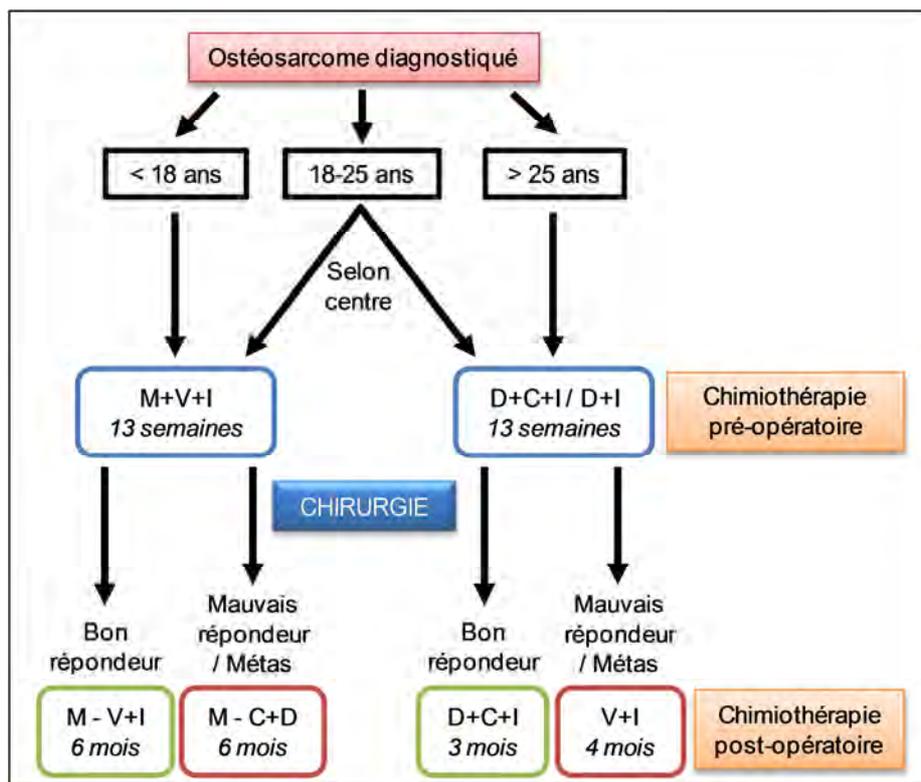


Figure 22 – Protocoles de chimiothérapie utilisés pour le traitement des OS en France
 M : Méthotrexate, V : Vépiside, I : Ifosfamide, C : Cisplatine, D : Doxorubicine, Métas : Métastases
 (d'après le service d'oncopédiatrie du CHU de Nantes)

2. Thérapies de différenciation

Depuis quelques années, les OS sont de plus en plus abordés comme une pathologie de la différenciation mésenchymateuse. Ils résulteraient en effet de dérèglements du programme de différenciation ostéoblastique des MSC, qui acquerraient alors un phénotype tumoral osseux (257). Selon cette hypothèse, les ostéoblastes pourraient subir à différents stades de leur maturité des évènements telles que des altérations dans les voies p53 et RB (figure 18) qui entraîneraient la tumorigenèse d'OS, ce qui déterminerait directement le degré de différenciation des tumeurs ainsi formées (figure 23). Les thérapies visant à promouvoir la différenciation ou à contourner les défauts de différenciation ouvrent ainsi de nouveaux horizons en tant que traitements adjuvants aux protocoles chimiothérapeutiques classiques qui ciblent avant tout les aspects prolifératifs des tumeurs ostéosarcomateuses.

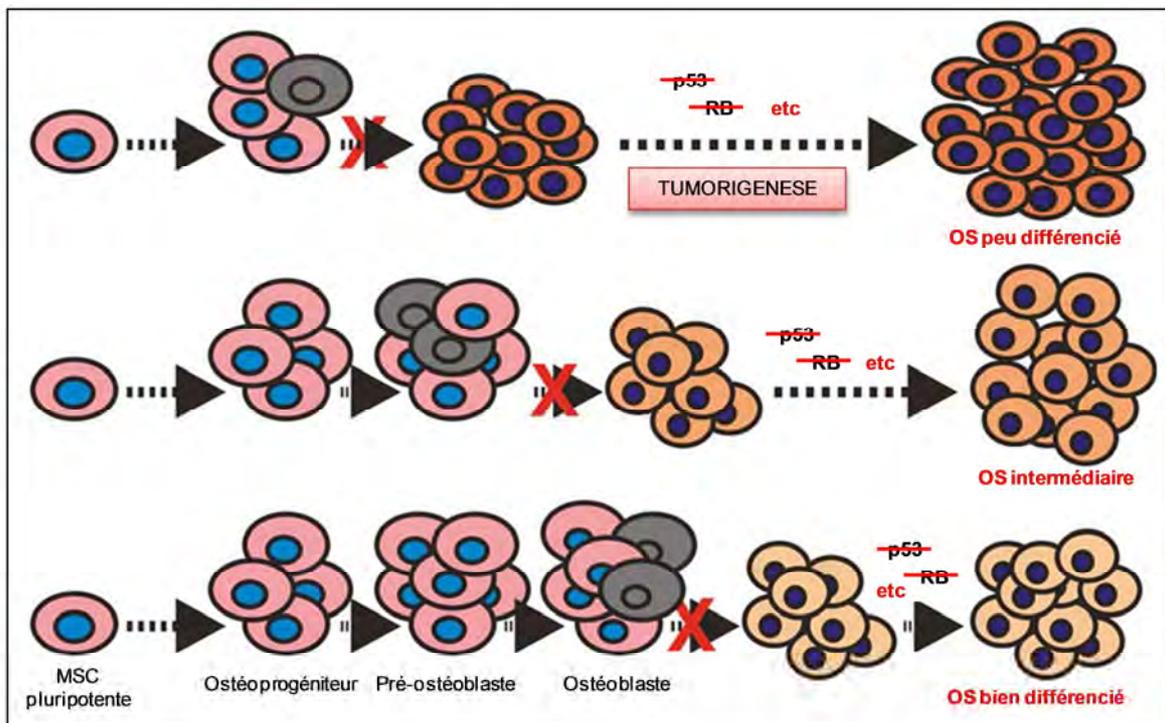


Figure 23 - Maturité des ostéoblastes et tumorigenèse des ostéosarcomes (adapté de (130)). Selon ce modèle, les évènements génétiques engendrant le développement des ostéosarcomes, comme des anomalies touchant les voies MDM2 / p53 et p16 / RB (figure 18), pourraient survenir selon les cas à des stades précoces ou tardifs de l'ostéoblastogenèse et donc produire des tumeurs plus ou moins différenciées.

Plusieurs études font état de conséquences positives sur la tumorigénicité de modèles d'OS suite à des modifications de leur état de différenciation :

- En 2000, Manara et collaborateurs ont induit par transfection l'expression de l'ALP dans des cellules d'OS humain U2OS, une lignée considérée comme peu

différenciée (258) (tableau 1). Cette augmentation du taux basal d'ALP a eu un effet important sur les capacités tumorigènes et métastatiques chez l'animal, qui ont chuté significativement par rapport au modèle U2OS non modifié (259). Des résultats similaires ont également été obtenus par surexpression d'OSTX dans un modèle d'OS murin, accompagnés d'une diminution significative de l'ostéolyse tumorale (260).

- Les protéines de la famille NF κ B sont impliquées dans de nombreux procédés biologiques dont le remodelage osseux, et un dérèglement de leur activité est observé dans de nombreux processus de tumorigenèse (261). L'inhibition de cette voie dans la lignée humaine d'ostéosarcome SaOS2 réduirait la prolifération cellulaire et stimulerait ses capacités de différenciation ostéoblastique via une induction de l'expression des BMP4 et 7 (262).
- L'hormone PTHLH est capable d'induire *in vitro* la différenciation ostéoblastique des cellules de la lignée MG63, via une augmentation de leur potentiel de minéralisation et de l'expression d'ALP et de COLL1. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation PTHLH a pour conséquence d'éteindre l'expression de ces deux marqueurs, ce qui suggère que la différenciation cellulaire médiée par la PTHLH est essentiellement due à l'activation par l'hormone de la voie des MAP kinases (263). Cependant, la PTHLH est connue pour être exprimée dans de nombreux cancers, et joue notamment un rôle fondamental dans le développement du cancer du sein et son processus métastatique (264). Dans un environnement osseux, il intervient dans l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes, augmentant ainsi le relargage de facteurs de croissance et de cytokines comme le TGF- β , qui stimulent sa production et par conséquent ses effets autocrines sur la prolifération tumorale, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose, favorisant donc le développement de métastases osseuses (265). Pour ces raisons, des applications thérapeutiques de la différenciation ostéoblastique médiée par PTHLH sont en l'état actuel très peu envisageables.
- Les agonistes de récepteurs nucléaires comme les récepteurs à l'acide rétinoïque ont montré des effets antiprolifératifs et stimulateurs de la différenciation dans plusieurs types de cellules tumorales (266). L'un d'entre eux, RXR (9-cis retinoic acid receptor), est indispensable à l'activité des récepteurs de la famille des PPAR comme PPAR γ (267), un facteur de transcription-clé des voies de différenciation mésenchymateuses. Depuis une dizaine d'années, des études réalisées avec des

agonistes de PPAR γ suggèrent des effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs de ces agents sur les cellules d'OS, accompagnés d'une expression accrue de l'ALP et d'une augmentation de leur minéralisation *in vitro* (268,269). Plus récemment, il a été montré qu'une surexpression de PPAR γ 2 et de récepteurs à l'acide rétinoïque inhibait la prolifération tumorale chez l'animal de lignées humaines d'OS (270).

- Un autre récepteur nucléaire présente un certain potentiel pour de nouvelles thérapies de l'OS, le récepteur à l'œstrogène. En effet, des ligands de ce récepteur, comme le tamoxifène, le raloxifène et le 17- β œstradiol, seraient capables d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules tumorales U2OS. En outre, l'activité proliférative ralentie de ces cellules est associée à une augmentation des marqueurs ostéoblastiques (271).

G. MicroARN et ostéosarcome

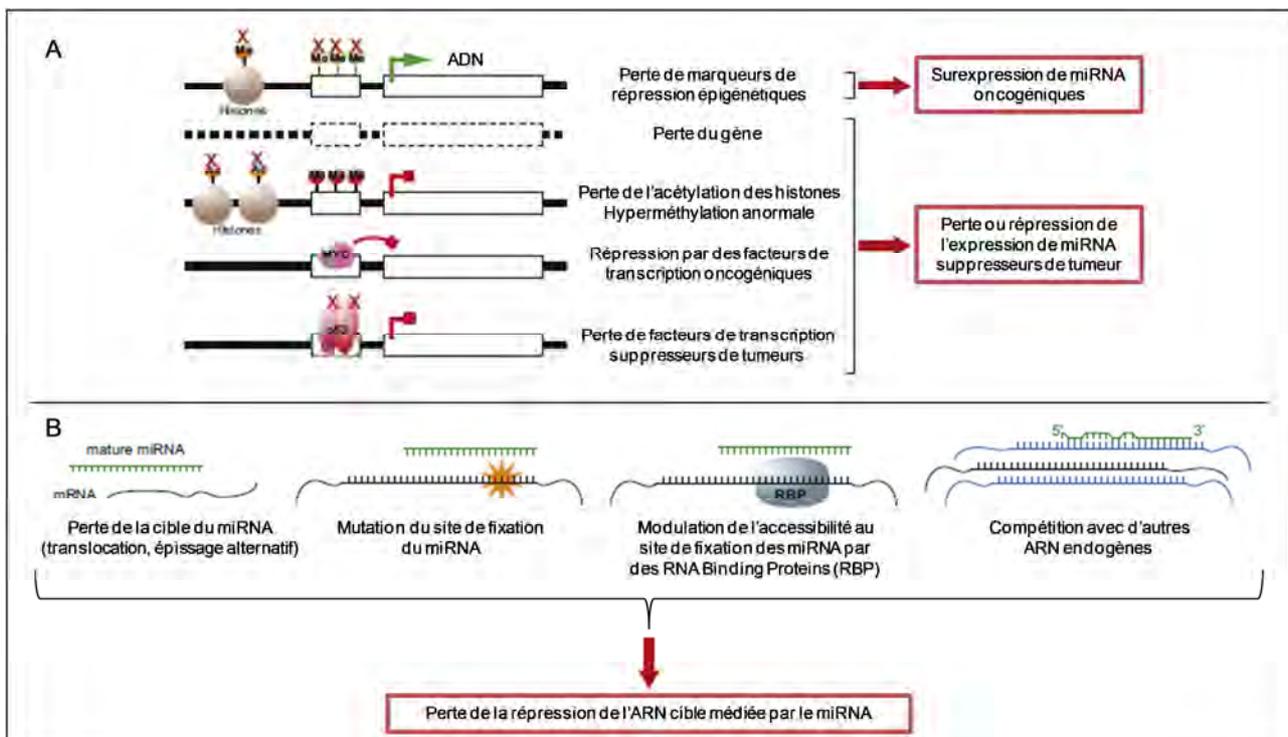


Figure 18 – Dérégulation des microARN dans les cancers (adapté de (273))

A. Mécanismes moléculaires à l'origine de la dérégulation des miRNA oncogéniques et suppresseurs de tumeur.

B. Mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique par les miRNA

Dans la très grande majorité des cancers chez l'homme, on observe une dérégulation des voies de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique médiée par les miRNA. Les miRNA dits suppresseurs de tumeur, ciblant des oncogènes, perdent en effet leur fonction dans les cellules tumorales, ce qui a pour conséquence une expression anormale du gène cible

qui contribue à la formation tumorale en induisant la prolifération cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse et une inhibition des mécanismes de mort cellulaire. En revanche, les cellules tumorales surexpriment des miRNA oncogéniques qui répriment l'expression de gènes suppresseurs de tumeur ou de gènes-clés de la différenciation cellulaire, favorisant ainsi un processus de tumorigenèse (272). Cette dérégulation peut avoir des origines génétiques, épigénétiques ou transcriptionnelles, mais peut aussi être la conséquence de mécanismes d'échappement tumoraux à la régulation médiée par les miRNA (figure 24).

Dans le cas des OS, plusieurs études font état d'une dérégulation de nombreux miRNA, et ont identifié des signatures d'expression aberrantes dans des échantillons de patient par rapport à de l'os sain ainsi que dans les lignées cellulaires de référence par rapport à des ostéoblastes (274,275). Les miRNA reconnaissant de multiples cibles impliquées dans une très grande variété de processus biologiques, des modifications dans leur expression ont des conséquences importantes sur les propriétés tumorales des OS mais représentent également un nouveau champ d'investigation thérapeutique.

1. Tumorigenèse

Si les fonctions biologiques des miRNA dans le développement des OS sont encore largement méconnues, plusieurs d'entre eux ont été identifiés depuis la dernière décennie comme ayant un rôle d'oncogène dans ces pathologies. A titre d'exemple, une étude récente a montré que le miR-21 était significativement surexprimé dans des échantillons d'OS, et induisait l'invasion et la migration de la lignée d'OS humaine MG63 via la régulation négative du gène suppresseur de tumeur *RECK* (276). Ce miRNA oncogénique est anormalement surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines, et induit la croissance tumorale, la migration, l'invasion et le développement de métastases notamment en régulant négativement l'expression de gènes suppresseurs de tumeur tels que *PTEN* et *PDCD4* (277).

A l'inverse, il existe de nombreux miRNA agissant en tant que suppresseurs de tumeurs chez les OS. Parmi eux, le miR-119a-3p, qui ciblerait notamment des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'oncogène *MET*, la voie de la rapamycine et le facteur de transcription *STAT3*, est sous-exprimé *in vitro* et *in vivo* dans les OS par rapport à des ostéoblastes humains (278). De manière similaire, une surexpression des miR-125b (279) et 143 (280), ciblant respectivement *STAT3* et *BCL2*, a diminué de façon importante la prolifération de lignées d'OS *in vitro* et a empêché la formation de tumeur par injection chez l'animal.

Cependant, la complexité des mécanismes de régulation de ces miRNA suppresseurs de tumeur peut représenter un frein pour une utilisation thérapeutique. En effet, une boucle de rétrocontrôle impliquant les 4 miRNA du locus 14q32, l'oncogène *MYC* et le cluster miR-17-92 a été identifiée dans la lignée SaOS2 (281). Selon ce modèle, l'effet pro-apoptotique de l'expression des miRNA du cluster 14q32 est fortement atténué dans les cas d'une surexpression de *MYC*, une des anomalies les plus fréquemment identifiées dans les OS.

2. Potentiel métastatique

La formation de métastases pulmonaires chez les patients atteints d'OS est le principal indicateur de mauvais pronostic. Dans ce contexte, les miRNA pourraient représenter une nouvelle approche thérapeutique pour endiguer ce fort potentiel métastatique caractéristique des OS.

Le miR-143, déjà reconnu dans une étude antérieure pour ses propriétés anti-tumorigènes chez l'OS, est ainsi capable d'inhiber la formation de métastases pulmonaires dans un modèle murin d'OS métastatique, sans toutefois affecter la croissance de la tumeur primaire. Cette action, qui se traduit *in vitro* par une diminution de l'invasion cellulaire, serait corrélée à une répression du gène codant pour la métalloprotéinase MMP13 (282).

D'autres miRNA ont été en revanche identifiés comme ayant des effets pro-métastatiques chez les OS. Le miR-20a inhibe notamment l'expression du récepteur membranaire FAS, ce qui provoque un court-circuit de la voie apoptotique médiée par l'interaction de ce récepteur avec le ligand FASL au niveau du tissu pulmonaire, facilitant ainsi le développement métastatique (283). Dans une étude menée sur la lignée 143B HOS, le miR-93 a été identifié comme étant pro-métastatique et inducteur de prolifération cellulaire (284).

De tels travaux illustrent l'implication des miRNA dans le développement métastatique des OS, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent méconnus.

3. Réponse aux traitements

Les OS présentent selon les cas des réponses variées aux traitements chimiothérapeutiques, et leurs mécanismes de chimiorésistance sont assez mal connus. Des études récentes ont identifié plusieurs miRNA dont l'action module la réponse au traitement des OS.

Le criblage des miRNA dans des modèles de xéno greffe d'OS traités avec de la doxorubicine, du cisplatine ou de l'ifosfamide, a permis d'identifier une forte expression du miR-140 dans les trois cas, suggérant un rôle de ce miRNA dans la chimiorésistance des OS. *In vitro*, la surexpression du miR-140 a induit une résistance au méthotrexate et au 5-fluorouracil (5-FU) ainsi qu'un effet anti-prolifératif important dans la lignée U2OS mais de manière beaucoup moins efficace dans des cellules présentant des mutations de *TP53* (285). Cette étude suggère donc que le miR-140 induit la chimiorésistance en réduisant la prolifération des OS. Un autre miRNA, le miR-34, a lui aussi été identifié comme affectant l'expression génique selon le statut p53, mais contrairement au miR-140, le miR-34 augmente la chimiosensitivité des OS. Ce miRNA affecte directement des cibles de la voie p53, telles que *BCL2*, *CDK6* et *E2F3*, et engendre par conséquent des blocages du cycle cellulaire et un déclenchement des voies apoptotiques (286).

Pour dépasser l'actuelle stagnation des taux de survie des patients et proposer des traitements de plus en plus personnalisés, il est nécessaire aujourd'hui de pouvoir anticiper la réponse au traitement avant la chimiothérapie, et les microRNA pourraient représenter de nouveaux marqueurs prédictifs. Dans ce contexte, quatre miRNA (miR-92a, 99b, 193a-5p et 422a) ont été identifiés comme surexprimés dans de bons répondeurs humains et murins à l'ifosfamide, cette surexpression s'accompagnant d'une répression du miR-132. Ce profil constituerait donc une signature prédictive de la réponse à l'ifosfamide, permettant de différencier les tumeurs les plus sensibles à cet agent de celles pour lesquelles un autre traitement devra être envisagé (287).

4. Voies thérapeutiques potentielles

L'implication des miRNA dans le développement et la progression des cancers a conduit à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ces approches incluent le blocage de la surexpression de miRNA oncogéniques par des oligonucléotides anti-sens, ou bien la restauration de l'expression de miRNA suppresseurs de tumeurs par des miRNA "mimics", des oligonucléotides de synthèse identiques au miRNA d'intérêt (272). Le miRNA thérapeutique pourrait être introduit dans l'organisme via le système circulatoire ou directement injecté dans le corps (cavité péritonéale, poumon) voire directement au site tumoral (288). De façon alternative, il pourrait également être implanté dans des cellules souches ou progénitrices qui seraient par la suite transplantées chez le patient (289).

	Exemples de microRNA impliqués		Lignées tumorales	Différenciation		
	Sur-expression	Sous-expression		Ostéo	Chondro	Adipo
OS	miR-21 (276), miR-20a (283), miR-93 (284), miR-140 (285), miR-132 (287), miR-135b, 150, 542-5p et 652 (274), miR-151-3p et 191 (278) ...	miR-119a-3p, 127-3p et 376c (278), miR-125b (279), miR-143 (280), miR-31, 100, 137, 154, 221, 299-5p, 329, 335, 337-3p, 377, 382, 410, 432... (275)	HOS (258) HOS-143B (258) HOS-MNNG (258) MG63 (258) SaOS2 (258) U2OS (258) OSA (258) OSRGA (290) OHS (258)	+	-	+
CS	miR-96, 181a, 183 (291)	miR-10b, 23b, 27b, 100, 134, 136, 186, 222, 335, 376a, 377, 454, 495, 497, 505, 660... (291)	SW1353 OUMS27 CAL-78 SRC BCSCH03 BCSCH56		-	+/-
ES	miR-9 (292,293), miR-15b (294,295), miR- 17/20a/106a/93 (294,295), miR-20b (293), miR- 93/106a/106b (293-295), miR-103/107 (294,295), miR-150 (292,293)... (296)	miR-21 (292,294,295), miR-22 (294,295), miR-27a/27b (294,295), miR-31 (293,295), miR-100 (294,295), miR-125b (292,294,295), miR-145 (292,294,295)... (296)	TC71 SKNMC (137) A673 (137) STAET1 SKES1 TC32 EW24 (137) RDES			-

Tableau 1 - Exemples de microRNA dérégulés dans les tumeurs osseuses primitives malignes et capacités de différenciation des lignées dérivées de ces pathologies (ostéo, différenciation ostéoblastique ; chondro, différenciation chondrocytaire ; adipo, différenciation adipocytaire ; case blanche, non connu). Les données relatives à la différenciation des lignées de chondrosarcome sont directement issues des résultats de cette thèse.

Des travaux récents ont identifié un nombre important de dérégulations des miRNA dans les ES et dans les CS, et ces résultats ouvrent également de nouveaux champs d'investigation dans l'étude de ces cancers (tableau 1). Cependant, la compréhension du rôle des miRNA dans l'OS et les autres TOP malignes restant limitée, il n'est pas encore possible de dire s'ils pourront être directement utilisés pour le traitement des patients atteints de ces

malignités. De plus, d'importantes études de sécurité et de toxicité sont indispensables avant de pouvoir considérer une application clinique des miRNA chez l'homme.

3^{ème} Partie :

Objectifs de la thèse

Le tissu osseux est un tissu en perpétuel renouvellement et est le siège de processus biologiques complexes faisant intervenir de nombreux types cellulaires. Des dérèglements de leur métabolisme dus à des anomalies génétiques de natures variées peuvent conduire à un processus de tumorigenèse, aboutissant au développement des tumeurs osseuses primitives dites malignes : les ostéosarcomes, les chondrosarcomes et les sarcomes d'Ewing. La formation de ces sarcomes résulterait d'une altération des voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses, mais chaque grand type tumoral possède ses propres caractéristiques histologiques, génétiques et épidémiologiques.

Le problème principal que posent les tumeurs osseuses primitives pour leur prise en charge clinique est leur grande hétérogénéité. D'un patient à un autre, pour la même pathologie, les tumeurs peuvent en effet se déclarer sur des localisations distinctes, présenter différents aspects et des niveaux d'agressivité variables. En lien avec cette diversité, les indicateurs de bon et de mauvais pronostic sont nombreux, et il est souvent difficile pour les cliniciens de décider du protocole le plus approprié, en raison de la grande variabilité des réponses individuelles aux traitements. Cependant, les études menées sur de grandes cohortes de patient indiquent que l'agressivité de ces tumeurs est directement liée à leur degré de différenciation. Dans le cas des ostéosarcomes, les formes les plus différenciées seraient ainsi les plus simples à traiter, grâce à leurs capacités prolifératrices et métastatiques réduites. La situation est différente pour les chondrosarcomes, car si les formes les plus agressives et peu différenciées sont difficiles à traiter, les formes de plus bas grade engagées dans la voie de différenciation des chondrocytes et produisant une quantité importante de matrice cartilagineuse sont également largement chimiorésistantes.

L'objectif général de la présente thèse était d'étudier et de mieux comprendre le lien entre le degré de différenciation des tumeurs osseuses primitives et leur développement : propriétés tumorales liées notamment à des anomalies de la prolifération et de l'apoptose, capacité à résister aux traitements classiques de chimiothérapie. Cependant, il s'agit de pathologies rares et peu de lignées tumorales ou de modèles animaux existent, ce qui réduit fortement les études dans ce domaine.

Dans un premier temps, j'ai donc participé à un projet visant à mettre au point de nouveaux modèles cellulaires et animaux de tumeurs osseuses primitives malignes à partir de biopsie de patients. J'ai ainsi pu établir des modèles de chondrosarcome en culture et chez la souris dont les propriétés génétiques et phénotypiques ont été par la suite entièrement caractérisées, en lien avec les données cliniques des patients. Ces nouveaux modèles ont alors été utilisés afin de mieux comprendre la cause de la chimiorésistance de ces tumeurs, en

explorant notamment le rôle de la différenciation chondrocytaire et donc de l'environnement cartilagineux qui les caractérise.

En second lieu, je me suis intéressé au lien entre le degré de différenciation des ostéosarcomes conventionnels et leur développement. Pour cela, j'ai utilisé un microRNA, le miR-152, pour potentiellement stimuler la différenciation de modèles d'ostéosarcomes dans la voie ostéoblastique via l'inhibition de la voie adipocytaire. Ce travail, encore préliminaire, avait pour but de prouver qu'il était possible, par le biais des microRNA, d'induire la différenciation d'ostéosarcomes *in vitro* et chez l'animal, avec pour conséquence une diminution de leur prolifération et donc de leurs capacités tumorigènes. Cette étude pourrait ainsi fournir des arguments supplémentaires en faveur du potentiel « thérapeutique » des microRNA pour traiter les tumeurs osseuses primitives malignes.

RESULTATS

1^{ère} Partie :

Différenciation des chondrosarcomes
et chimiorésistance

I. Le projet Bone Cell Supplier

A. Introduction

Pour les besoins de l'étude suivante, nous avons utilisé de nouvelles lignées cellulaires obtenues à partir de biopsies humaines de CS. Ces modèles cellulaires ont été mis au point dans le cadre d'un plus vaste projet, nommé Bone Cell Supplier (BCS, OSEO/ANVAR).

Les OS, CS et ES réunis affectent chaque année environ 300 nouveaux patients en France. Ces trois types tumoraux présentent comme exposé précédemment une très forte hétérogénéité, tant au niveau génétique (réarrangements chromosomiques, mutations, délétion ou amplification de gènes) que phénotypique (grades tumoraux, expression de marqueurs moléculaires, capacité à développer des métastases osseuses), ce qui engendre une grande variabilité dans la réponse aux traitements actuels (chimiothérapie, radiothérapie, exérèse totale de la tumeur) et dans le taux de survie à cinq ans d'un patient à un autre. L'étude de ces cancers ne peut donc pas se restreindre à un seul modèle préclinique et nécessite l'analyse d'un certain nombre de variants, allant par exemple des formes les moins agressives aux formes les plus difficiles à traiter. Cependant, à l'heure actuelle, seul un nombre très limité de lignées tumorales osseuses est proposé par les grandes banques de cellules, ce qui limite considérablement la recherche dans ce domaine.

Dans cette optique, le projet BCS, initié en 2007 avec le partenariat des pôles ostéoarticulaires et oncopédiatriques du CHU de Nantes, a été conjointement mis en place par trois structures :

- l'Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCg) du CHU de Nantes, spécialisée dans la culture de cellules de grade clinique (agrée AFSAPS).
- le Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et thérapie des tumeurs osseuses primitives (LPRO, INSERM U957, rattaché à la Faculté de Médecine de Nantes).
- la société privée Atlantic Bone Screen (ABS), spécialisée dans la prestation de services dans l'étude des pathologies ostéo-articulaires.

L'objectif de ce projet était d'établir un nombre important de lignées tumorales osseuses à partir de biopsies osseuses de patients atteints par une des trois TOP. Ces nouvelles lignées, accompagnées de données cliniques détaillées sur chaque patient et de données de caractérisation génétique et phénotypique, permettraient d'élargir le nombre de modèles

disponibles mais pourraient également être utilisées pour des tests précliniques plus représentatifs de ces pathologies, qui tiendraient compte de leur caractère hétérogène.

B. Méthodologie

Des biopsies de patients du CHU de Nantes atteints de pathologies tumorales osseuses ont été récupérées. Dès réception à l'UTCG, les biopsies étaient dilacérées mécaniquement en salle blanche avant d'être congelées dans du sérum et conservées dans l'azote liquide. Après confirmation du diagnostic, la mise en culture des fragments de ces biopsies dans les locaux de l'UTCG a été réalisée uniquement avec consentement éclairé du patient et si sa sérologie ne mettait pas en évidence de risque pour le manipulateur de contracter des pathologies virulentes comme l'hépatite B.

Une fois 25 passages atteints, les cellules en culture étaient considérées comme immortalisées, donc tumorales, et transférées au LPRO pour les étapes de caractérisation génétique et phénotypique. Le rôle d'ABS dans ce processus était de mettre au point des modèles murins à partir des nouvelles lignées afin d'en évaluer le potentiel tumorigène (figure 25).

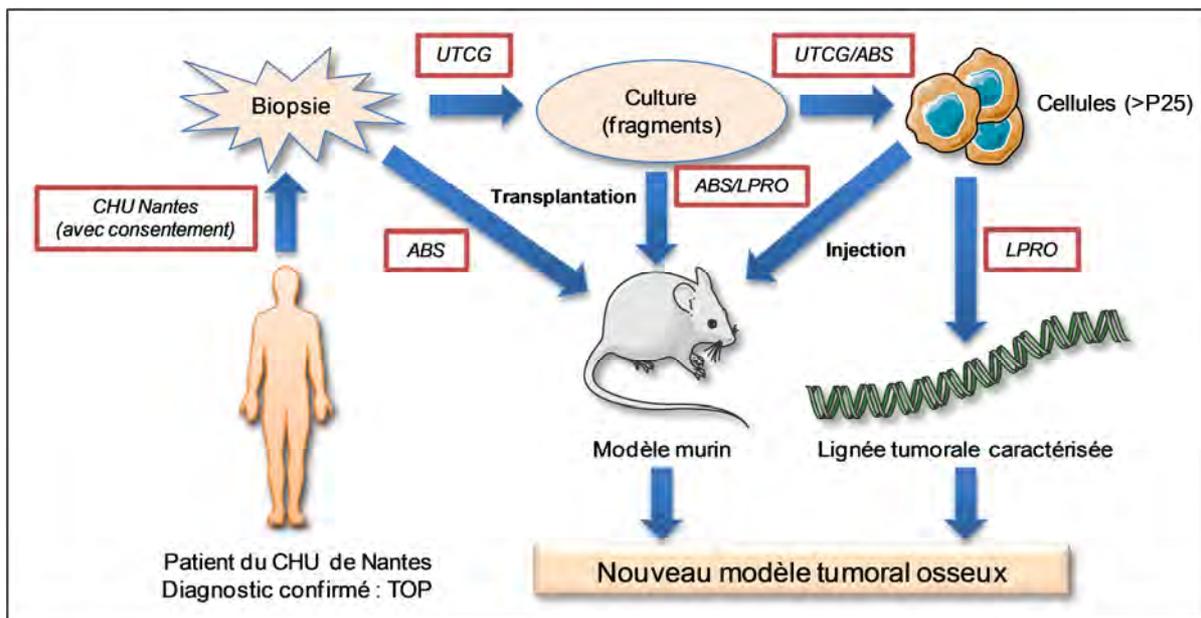


Figure 19 - Méthodologie appliquée pour l'établissement de modèles tumoraux osseux dans le cadre du projet BCS

A l'issue de la phase I du projet BCS, les conditions de culture des biopsies ont été définies, et une première lignée tumorale stable a pu être établie à partir d'une biopsie de chondrosarcome différencié, la lignée BCSC03. L'objectif de la phase II du projet BCS

était d'appliquer ces méthodes pour établir davantage de lignées de tumeurs osseuses (2 à 7) caractérisées et utilisables à l'issue des 18 mois du projet.

Pour réaliser la caractérisation des lignées obtenues à partir de biopsies tumorales osseuses, nous avons envisagé trois grands aspects :

- Par des études cytogénétiques, les anomalies génétiques les plus fréquemment rencontrées dans chaque type de TOP seraient recherchées, et la correspondance entre les lignées et leur biopsie d'origine seraient confirmées par génotypage des séquences microsatellites STR. Au cours du projet, nous avons également décidé de réaliser les caryotypes des lignées établies, indice de leur instabilité génétique et donc de leur caractère tumoral.
- La réponse à quatre agents de chimiothérapie de référence utilisés pour le traitement des OS (méthotrexate, MAF, CIS, DOX) seraient mesurées *in vitro*, dans l'optique d'identifier des chimiorésistances spécifiques à chaque sous-type de TOP.
- Le phénotype de ces cellules serait déterminé par l'analyse de l'expression de marqueurs caractéristiques, en rapport avec les voies de différenciation mésenchymateuses.

II. Article scientifique

New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance.

Monderer D., Luseau A., Bellec A., David E., Ponsolle S., Saiagh S., Bercegeay S., Piloquet P., Denis M.G., Lodé L., Rédini F., Biger M., Heymann D., Heymann M.-F., Le Bot R., Gouin F., Blanchard F.

Laboratory Investigation, 2013 Oct;93(10):1100-14. doi : 10.1038/labinvest.2013.101.
Epub 2013 Aug 19.

Résumé

Les chondrosarcomes sont des tumeurs faiblement vascularisées formatrices de cartilage. Ils représentent la seconde tumeur osseuse primitive maligne de l'adulte après l'ostéosarcome, mais contrairement à eux sont résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie, la résection chirurgicale restant la seule option thérapeutique. Peu de lignées cellulaires et de modèles animaux sont disponibles, et les mécanismes responsables de leur chimiorésistance demeurent largement méconnus.

Notre objectif était d'établir de nouveaux modèles tumoraux en culture et chez l'animal à partir de biopsies humaines de chondrosarcome afin d'étudier leur chimiorésistance.

Entre 2007 et 2012, 10 biopsies de chondrosarcomes ont été collectées et utilisées pour de la culture cellulaire et des transplantations en souris Nude. Seules une biopsie transplantée et une lignée cellulaire injectée se sont implantées avec succès et ont conduit à des chondrosarcomes conventionnels centraux de haut grade similaires aux biopsies d'origine. En culture, deux lignées cellulaires stables ont été obtenues, l'une à partir d'une biopsie de chondrosarcome dédifférencié et l'autre d'un chondrosarcome conventionnel central de grade III. Leur caractérisation génétique a révélé des caryotypes triploïdes, des mutations d'*IDH1*, *IDH2* et *TP53*, ainsi que des délétions de *CDKN2A* et/ou des amplifications de *MDM2*. Ces lignées cellulaires exprimaient des marqueurs membranaires mésenchymateux (CD44, 73, 90 et 105), et étaient capables de produire une matrice cartilagineuse hyaline lorsqu'elles étaient cultivées sous forme de culots chondrogéniques en 3 dimensions (3D). En utilisant une approche par RT-PCR quantitative à haut-débit, nous avons observé que les lignées cellulaires cultivées en monocouche avaient perdu l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement du cartilage (*COL2A1*, *COMP*, *ACAN*) mais restauraient cette expression dans les cultures 3D chondrogéniques. Les cellules de chondrosarcome en monocouche étaient

sensibles à plusieurs agents de chimiothérapie mais devenaient résistantes à de faibles doses de mafosfamide et de doxorubicine lorsqu'elles étaient cultivées en culots 3D chondrogéniques, avec en parallèle une altération de l'accumulation de la drogue au niveau du noyau des cellules.

Nos résultats indiquent que la matrice cartilagineuse produite par les cellules de chondrosarcome pourrait empêcher la diffusion de plusieurs drogues et contribuerait ainsi à la chimiorésistance. Par conséquent, les culots cellulaires chondrogéniques en 3D constituent un modèle plus pertinent pour étudier les mécanismes de chimiorésistance du chondrosarcome et pourrait représenter une alternative intéressante à l'expérimentation animale.

III. Compléments de discussion

A. Matrice cartilagineuse et chimiorésistance

1. Le modèle de chondrogenèse *in vitro*

Il est connu depuis longtemps que la mise en culture de cellules issues de certains tissus biologiques à l'organisation spatiale complexe altère leurs propriétés physiologiques. En particulier, il a été observé dès 1977 que les chondrocytes du cartilage articulaire, une fois cultivés en monocouche, ne produisent plus de COLL2 mais davantage de COLL1. Ce changement phénotypique a des conséquences importantes sur leur morphologie, et les cellules adoptent une forme beaucoup plus aplatie que dans leur environnement d'origine (297). Des travaux réalisés quelques années plus tard montrent que des chondrocytes dédifférenciés après culture en monocouche peuvent retrouver leur phénotype cartilagineux après inclusion dans du gel d'agarose (298), qui constitue pour ces cellules un microenvironnement de substitution pour remplacer le cartilage articulaire. Un environnement en trois dimensions semble donc être indispensable au bon déroulement de la chondrogenèse, car il permettrait la conservation de la morphologie des chondrocytes et par conséquent de leur fonction, favorisant ainsi la production des protéines de structure de la MEC cartilagineuse.

Le modèle de différenciation chondrocytaire *in vitro* des MSC que nous avons utilisé pour cette étude est basé sur ce principe, la configuration 3D étant assurée par une culture des cellules en micromasses de haute densité dans un milieu induisant la chondrogenèse, constitué principalement de DMEM sans sérum, de TGF- β 3, de dexaméthasone et d'insuline (299). Au bout de 24h, les interactions cellulaires entre les MSC sont suffisamment fortes pour permettre de former un tissu compact, et l'expression de gènes spécifiques de la MEC cartilagineuse, tels *COL2A1*, *COMP* et *ACAN*, est visible à partir de 7 jours (300). Dans le présent article, nous avons prouvé que ce modèle était utilisable pour redifférencier les cellules de CS en culture. En parallèle, nous avons également pu observer que cette technique ne permettait pas d'obtenir de la matrice cartilagineuse à partir de cellules d'OS de la lignée HOS, ce qui constitue un indice du clivage important entre les voies de différenciation aboutissant à la génération des cellules d'OS et de CS. Toutefois, pour des raisons encore mal définies, cette technique n'est pas utilisable pour toutes les lignées de CS. Etant donné que des culots cellulaires de CS réalisés avec les lignées humaines CAL78, OUMS27, SW1353 et

la lignée de rat SRC se sont dissociés de façon précoce ou lors des étapes finales du procédé (données non montrées), il est possible que son efficacité soit liée à la capacité des cellules à interagir entre elles pour former une micromasse résistante aux tensions mécaniques résultant des changements de milieu et des lavages.

Si ce modèle a permis d'induire efficacement la différenciation chondrocytaire de nos 2 lignées de CS, il possède néanmoins certaines limites. Classiquement, ce type de culture se réalise dans des tubes coniques en polypropylène de 15mL, induisant ainsi la formation d'un tissu cartilagineux sphérique. Cependant, des analyses histologiques de sphéroïdes de MSC différenciées dans la voie chondrocytaire en utilisant cette méthode ont montré que ces tissus étaient très hétérogènes, mettant en évidence trois zones distinctes (301) :

- Leur périphérie est constituée de MSC aplaties et indifférenciées.
- Les cellules de la couche plus interne présentent une morphologie circulaire similaire aux chondrocytes, et sont incluses dans une MEC riche en COL2, en ACAN et en GAG sulfatés.
- Le noyau central des sphéroïdes est très peu différencié.

Pour améliorer le modèle et induire la différenciation chondrocytaire dans l'ensemble des cellules de la micromasse, Murdoch et collaborateurs ont eu l'idée de cultiver des MSC dans le même milieu chondrogénique mais sur un support perméable associé à une membrane microporeuse. Les micromasses qui en ont résulté se sont développées de façon appositionnelle, ce qui a grandement facilité les échanges de nutriments, de gaz et de facteurs de croissance. Le tissu formé, qui a adopté une morphologie de disque plat, était donc bien plus homogène, cette configuration favorisant la formation et le dépôt de matrice cartilagineuse (302).

Il est également possible d'augmenter l'efficacité de la différenciation chondrocytaire de sphéroïdes de MSC en combinant cette méthode à des conditions hypoxiques. En effet, la culture sous hypoxie de culots 3D chondrogéniques de MSC augmente fortement la chondrogenèse par rapport à des conditions normoxiques, en induisant davantage l'expression des trois gènes-clés *COL2A1*, *COMP* et *ACAN* (303). Cette synergie entre l'hypoxie et un environnement chondrogénique en 3D constitue en effet la configuration la plus proche de l'état physiologique des chondrocytes du cartilage hyalin, et est donc la plus adaptée pour obtenir des cellules véritablement différenciées dans la voie chondrocytaire.

Le cartilage hyalin étant très faiblement vascularisé, l'essentiel de son apport en oxygène est assuré par le liquide synovial. En conséquence, la tension en oxygène dans le cartilage suit un gradient de concentration, allant de plus de 10% d'oxygène dans les parties externes superficielles à moins d'1% dans les couches les plus internes. Dans le cas de notre étude, la différenciation chondrocytaire en culots 3D a été réalisée en normoxie. On peut donc supposer que la distribution en oxygène dans les culots cellulaires chondrogéniques les plus cartilagineux comme les culots de MSC est similaire à celle observée dans le cartilage, avec une hypoxie importante dans la couche interne. Pour définir précisément l'incidence de l'hypoxie sur la différenciation chondrocytaire dans notre modèle 3D, il serait par exemple possible par immunohistochimie d'analyser la répartition du facteur de transcription hypoxique HIF-1 α selon la localisation des cellules au sein des culots chondrogéniques.

2. Le cartilage comme barrière physique à la diffusion des drogues

La MEC cartilagineuse des CS serait capable d'altérer la diffusion passive de molécules de faible poids moléculaire, et jouerait ainsi un rôle majeur dans leur résistance à la chimiothérapie. En 2006, il a notamment été montré que des cellules de fibroblaste HT1080 mises en culture dans un gel de collagène en présence de DOX accumulaient moins de drogues dans leur noyau que des cellules cultivées en conditions standard. Les auteurs de cette étude ont pu prouver que ce défaut d'accumulation intranucléaire de la DOX était dû au réseau de fibres de collagène constituant l'environnement extracellulaire artificiel, qui ralentirait fortement la diffusion de la drogue (304).

Les résultats rapportés dans la présente étude mettent en évidence un effet de la matrice cartilagineuse sur la diffusion de la DOX et du mafosfamide (MAF), mais n'affectaient pas la diffusion du CIS. Des trois molécules, le CIS présente la meilleure affinité avec l'eau, et sera donc la moins retenue par les molécules hydrophobes présentes dans la matrice cartilagineuse, qui ralentira ainsi beaucoup moins sa diffusion que celle de la DOX et du MAF, moins hydrophiles. Il semblerait donc que les propriétés physicochimiques représentent un facteur important à prendre en compte dans le choix de potentiels agents thérapeutiques pour traiter les CS, qui doivent être capables de diffuser à travers la MEC cartilagineuse du microenvironnement tumoral. De nombreux tests devront toutefois être réalisés avant de pouvoir conclure quant aux mécanismes de chimiorésistance des CS, qui feraient intervenir en plus de cette protection fournie par le cartilage des protéines connues

pour induire l'expulsion de drogues comme MDR1 ou des facteurs anti-apoptotiques comme BCL-2 (214).

B. Résultats complémentaires du projet BCS

1. Recherche de marqueurs moléculaires discriminants dans les lignées d'OS, de CS et d'ES.

Nous avons réalisé un criblage des lignées de référence d'OS, de CS et d'ES disponibles au laboratoire pour plusieurs marqueurs ostéoblastiques, chondrocytaires, souche et pour le transcrit de fusion EWS-FLI1, afin de déterminer quels gènes étaient les plus susceptibles d'être exprimés dans chaque type de TOP. L'expression de ces marqueurs a également été réalisée sur des lignées de carcinome et des fibroblastes humains (tableau 2).

Il est à noter que la liste des marqueurs de différenciation ostéoblastique, chondrocytaire et de souchitude utilisés pour cette analyse n'est pas exhaustive et ne contient pas tous les gènes clés référencés, comme par exemple OCT4 pour les cellules souches. Elle reflète en réalité les résultats d'une étude antérieure réalisée au laboratoire sur un plus grand panel de lignées tumorales osseuses et une liste de gènes plus complète, qui nous a permis de définir lesquels permettaient de mieux discriminer les lignées d'ES des deux autres principaux types de lignées de TOP malignes. Lors de cette étude préliminaire, l'expression de ces marqueurs de différenciation a également été vérifiée dans des MSC natives ou différenciées ainsi que dans des cultures d'ostéoblastes et de chondrocytes. Il a ainsi été démontré que même si les lignées tumorales osseuses expriment certains marqueurs de différenciation mésenchymateuse, le niveau d'expression atteint est significativement inférieur à celui observé dans des cellules osseuses ou cartilagineuses saines ainsi que dans des MSC différenciées dans les voies ostéoblastiques ou chondrocytaires.

Cette constatation a également été faite pour les marqueurs adipogéniques, avec de fortes expressions de PPAR γ observées dans les lignées d'OS, de CS et d'ES. En revanche, ces lignées tumorales osseuses n'expriment pas d'autres marqueurs de l'adipogenèse très fortement exprimés dans des adipocytes, comme LPL et FABP4. Ces résultats corrélerent avec le faible engagement adipocytaire des lignées de CS analysées dans l'article, qui contiennent même en conditions de culture standard de petites gouttelettes lipidiques mais ne sont pas capables de se différencier en adipocytes matures.

Il aurait été également intéressant de comparer l'expression de ces marqueurs dans les lignées et les MSC avec d'autres types de cellules souches comme des iPS (cellules pluripotentes induites) ou des ES (cellules souches embryonnaires), mais l'unité ne dispose pas encore des autorisations requises par la réglementation pour manipuler ce type de lignées.

RT-qPCR		Marqueurs moléculaires													
		Ostéoblastiques				Chondrocytaires				Souche				Sarcome d'Ewing	
		OC	BSP	COL1-A1	RUNX2/CBFA1	ACAN	COL2-A1	COL10-A1	SOX9	ID-2	SOX2	NANOG	C-MYC	EWS-FLI1	
Echantillons	Chondrosarcomes	SW1353	0,22	0,38	1,11	2,30	1,00	1,00	1,00	1,00	0,14	0,01	0,22	0,31	0,00
		CAL78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		OUMS27	-	-	-	1,00	0,00	0,00	0,00	1,31	-	-	-	-	-
	Ostéosarcomes	SaOS2	1,00	0,17	1,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,02	0,21	0,02	0,03	1,35	0,00
		MG63	1,00	0,26	1,57	0,10	0,00	49,46	0,00	0,39	0,13	0,01	0,09	1,88	0,00
		U2OS	0,16	1,00	0,01	1,00	0,00	16,31	0,01	1,36	0,02	0,08	0,27	0,05	0,00
		HOS	0,13	0,16	0,02	0,81	0,00	11,16	0,00	1,02	0,02	0,03	0,15	0,03	0,00
	Sarcomes d'Ewing	STAET1	0,30	1,06	0,09	0,15	0,00	543,07	0,00	0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
		SKES1	0,36	4,51	0,00	0,02	0,00	3,84	0,00	0,00	0,41	0,64	0,56	1,09	0,37
		A673	0,32	0,08	0,23	0,04	0,00	55,46	0,00	0,40	0,29	1,00	0,26	0,52	1,71
	Carcinomes	A375	0,67	0,31	0,00	0,03	1,31	28,51	0,04	0,00	0,03	0,09	0,05	0,14	0,00
		DU145	0,19	0,09	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,09	0,37	0,00
		Hela	0,38	0,22	0,00	0,02	0,00	5,35	0,00	0,00	0,00	0,02	0,12	1,00	0,00
		MCF7	0,34	2,25	0,00	0,03	0,00	11,89	0,05	0,01	0,35	0,11	0,45	0,05	0,00
		MDAMB	0,44	13,38	0,00	1,14	0,00	2,89	0,28	1,34	0,00	0,13	1,50	1,93	0,00
	Fibroblaste	Fibroblaste	0,60	0,06	1,66	0,12	2,45	1,06	0,09	0,01	1,04	0,05	0,03	0,72	0,00

Tableau 2- Profils d'expression des lignées cellulaires du laboratoire pour les marqueurs moléculaires mésenchymateux, souche et pour EWS-FLI1 (valeurs numériques : niveaux d'expression relative par rapport à un contrôle interne ; gris : non exprimé ; jaune : faiblement exprimé ; orange : moyennement exprimé ; ocre : fortement exprimé)

A la lumière de ces résultats, les marqueurs de référence des OS, des CS et des cellules souches ne permettent pas de discriminer des cellules tumorales en culture de cellules non tumorales comme des fibroblastes. De plus, ces marqueurs ne différencient pas les OS des CS. En revanche, la spécificité du marqueur de référence des ES, le transcrit de fusion EWS-FLI1, a été confirmée, et pourrait être utilisée pour identifier de façon précoce la présence de cellules tumorales dans les cultures dérivées de biopsies d'ES. Dans le cas des OS et des CS,

ces analyses apporteraient uniquement des informations sur le phénotype des lignées établies en culture, mais seraient insuffisantes pour conclure quant à leur nature tumorale osseuse.

2. Culture cellulaire

Depuis 2007, 13 biopsies d'OS, 10 biopsies de CS (tableau 1 de l'article) et 4 biopsies d'ES ont été au total mises en culture à l'UTCG ou dans les locaux d'ABS. En dehors des TOP ont également été cultivés une biopsie de métastase osseuse récupérée chez un patient atteint d'un carcinome endocrine, ainsi qu'une biopsie de synoviosarcome et de rhabdomyosarcome alvéolaire (tableau 3). Au final, à l'exception des cellules issues des biopsies de chondrosarcome BCSC03, BCSC34 et BCSC56, aucune culture n'a dépassé les 25 passages requis pour conclure à l'établissement d'une lignée tumorale immortalisée. La caractérisation de ces trois cultures, détaillées dans l'article, a par la suite prouvé leur nature cancéreuse.

La majorité des cultures se sont avérées non productives pour 3 raisons :

- Absence de cellules.
- Faible capacité d'amplification des cellules (faible nombre de passages sur une longue période).
- Epuisement de la capacité d'amplification des cellules (nombre de cellules récoltées identique, inférieur ou faiblement supérieur à celui des cellulesensemencées au fil des derniers passages).

Pour résoudre ces problèmes, de nouvelles conditions de culture ont été essayées sur certains échantillons :

- Deux biopsies d'OS n'ont pas été mises en culture directement mais après digestion enzymatique à la collagénase A.
- Des fragments de biopsie d'ES et d'OS ont été mis en culture après coating au COLL1, pour améliorer l'adhérence des cellules au plastique de la plaque de culture. Dans le cas de la biopsie d'OS, deux milieux de culture différents ont ainsi été testés en utilisant ce protocole.

Ces tests n'ont cependant abouti à aucune amélioration dans l'obtention d'une lignée tumorale, les cellules ne montrant qu'une faible capacité d'amplification, qui a en outre diminué au cours du temps.

	Sexe	Age	Diagnostique confirmé	Sous-type histologique (historique)	Localisation	Grade histologique	Métastase	Survie (mois)	Passages	Xénotransgreffe souris Nude (incidence)
BCSOS04	F	61,4	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	omoplate	haut	Poumon	14,7 - décédé	14	N/A
BCSOS08	M	20,2	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	haut	Poumon	39,5 - décédé	5	Néant (0/4)
BCSOS10	M	15,5	OSTEOSARCOME	fibroblastique avec différenciation chondroblastique	tibia	haut	Non	>38,6	19	N/A
BCSOS11	M	72,0	OSTEOSARCOME	fusiforme pléiomorphe indifférencié	humérus	III	Poumon	2 - décédé	3-12	Fusiforme pléiomorphe indifférencié (3/10)
BCSOS12	F	18,7	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	haut	Poumon	> 35,6	17	N/A
BCSPM13	M	60,7	Pilomatixome	N/A	fémur	bas	Cutanées	Oui (NC)	N/A	N/A
BCSOS14	M	11,6	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	haut	Poumon	> 33,7	10	N/A
BCSOS15	M	47,9	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	os coxal	haut	Non	> 32,9	1	N/A
BCSOS17	M	17,6	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	haut	Non	> 32,4	5	N/A
BCSOS20	M	19,5	OSTEOSARCOME	parostéal	humérus	bas	Non	> 29,8	N/A	N/A
BCSAD21	M	NC	Adamantinome	N/A	NC	N/A	Non	NC	N/A	N/A
BCSOS23	M	18	OSTEOSARCOME	chondroblastique	os iliaque	NC	Poumon	> 26,5	8	Néant (0/2)
BCSEC24	M	50	Métastase osseuse de carcinome endocrine	N/A	NC	N/A	N/A	NC	6	N/A
BCSOS25	M	78	OSTEOSARCOME	ostéoblastique (Paget)	scapula	NK	Poumon	9,1 - décédé	5	N/A
BCSEW27	M	16	SARCOME D'EWING		paroi thoracique	N/A	Sacrum	> 25,1	1	Néant (0/2)
BCSOS28	F	21	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	NC	Vagin	> 24,2	15	N/A
BCSOS31	M	15	OSTEOSARCOME	télangiectasique	fémur	haut	Poumon	16,9 - décédé	N/A	N/A
BCSCO32	M	NC	Chordome	N/A	NC	N/A	NC	NC	N/A	N/A
BCSEW33	M	14	SARCOME D'EWING (EWS-FL11 type 2)	N/A	fémur	N/A	Poumon	> 20,5	4	N/A
BCSOS35	M	9	OSTEOSARCOME	chondroblastique	fémur	haut	Poumon	> 17,3	8	N/A
BCSEW41	M	12	SARCOME D'EWING	N/A	humérus	N/A	Non	> 14,9	N/A	N/A
BCSEW42	M	16	SARCOME D'EWING	N/A	hanche	N/A	Non	> 10,6	N/A	N/A
BCSSY44	M	68	Synoviosarcome (SS18(Ex10)-SSX2(Ex6))	N/A	NC	III	NC	NC	4	N/A
BCSEW47	M	18	SARCOME D'EWING (EWS-FEV)	N/A	sacrum	N/A	Non	> 7,9	2	N/A
BCSOS49	M	17	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fibula	haut	Poumon	> 7,9	18	N/A
BCSRM50	M	19	Rhabdomyosarcome Alvéolaire	N/A	région temporale	N/A	Non	> 4	10	N/A
BCSOS51	M	61	OSTEOSARCOME	fibroblastique	fémur	haut	Poumon	> 4	N/A	N/A
BCSOS52	M	19	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	bas	Non	> 3,7	N/A	N/A
BCSOS53	F	16	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	haut	Poumon	> 2,8	N/A	N/A
BCSOS54	M	10	OSTEOSARCOME	ostéoblastique	fémur	NC	Poumon	> 2,3	N/A	N/A
BCSEW55	M	22	SARCOME D'EWING	N/A	NC	N/A	NC	> 5	2	N/A
BCSEW57	F	15	SARCOME D'EWING	N/A	humérus	N/A	Non	> 2	N/A	N/A
BCSOS58	M	11	OSTEOSARCOME	télangiectasique	NC	haut	NC	NC	N/A	N/A

Tableau 3 – Données cliniques relatives aux patients prenant part au projet BCS (hormis les CS), résultat des cultures et des transplantations chez l'animal (N/A : non applicable ; NC : non connu)

L'hypothèse principale permettant d'expliquer cette baisse de la prolifération des cultures de biopsie est l'épuisement des cellules tumorales au cours du temps par rapport à des cellules stromales fibroblastiques, non immortalisées. En effet, en partant d'une biopsie d'ES exprimant fortement le transcrite de fusion caractéristique EWS-FLI1 par rapport à la lignée de référence SKES1, l'expression de ce marqueur n'était pas retrouvée chez les cellules obtenues par culture directe (figure 26) ou suite à une digestion enzymatique de la biopsie, qui n'ont donc pas pu être définies comme tumorales.

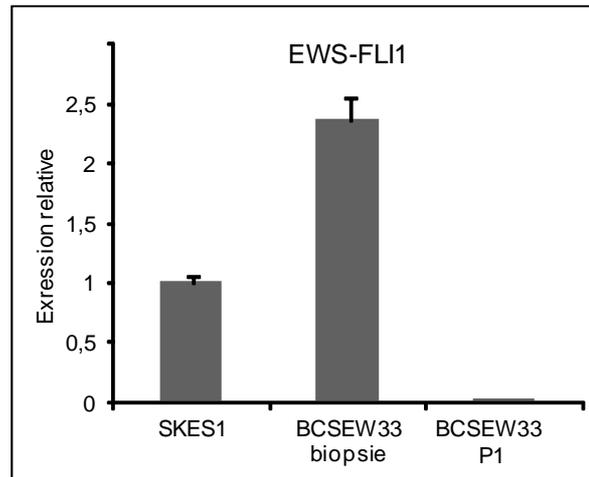


Figure 26 – Perte de l'expression d'EWS-FLI1 dans les cellules dérivées de la mise en culture de la biopsie BCSEW33

3. Modèles animaux

La mise en culture directe des biopsies d'OS, de CS et d'ES est un procédé possédant beaucoup de limites, avec un taux de réussite assez faible. Une autre approche a ainsi été envisagée pour l'établissement de lignées à partir de biopsies humaines. Selon ce protocole, les biopsies humaines seraient en premier lieu transplantées en site ectopique (sous-cutané) chez l'animal, et les tumeurs résultantes seraient ensuite mises en culture dans le but d'obtenir des cellules tumorales humaines correspondant à la biopsie d'origine.

Le potentiel tumorigène de fragments de 5 biopsies a ainsi été évalué par transplantation sous-cutanée chez des souris immunodéprimées :

- 3 OS : BCSOS08, 11 et 23
- 4 CS : BCSCH01, BCSCH03, BCSCH34, BCSCH56
- 1 EW : BCSEW27

Après 4 à 5 mois, des tumeurs transplantables ont pu être obtenues chez les animaux transplantés avec des fragments BCSOS11 et CH01, avec des incidences respectives de 3/10

et 4/5 et des profils histologiques représentatifs de leur pathologie d'origine (figure 27). Dans le cas de la biopsie BCSOS11, la xénogreffe sous-cutanée résultante porte les caractéristiques de l'OS indifférencié de type fusiforme et pléiomorphe de grade III du patient, avec une très forte cellularité et une grande diversité de morphologie des cellules tumorales.

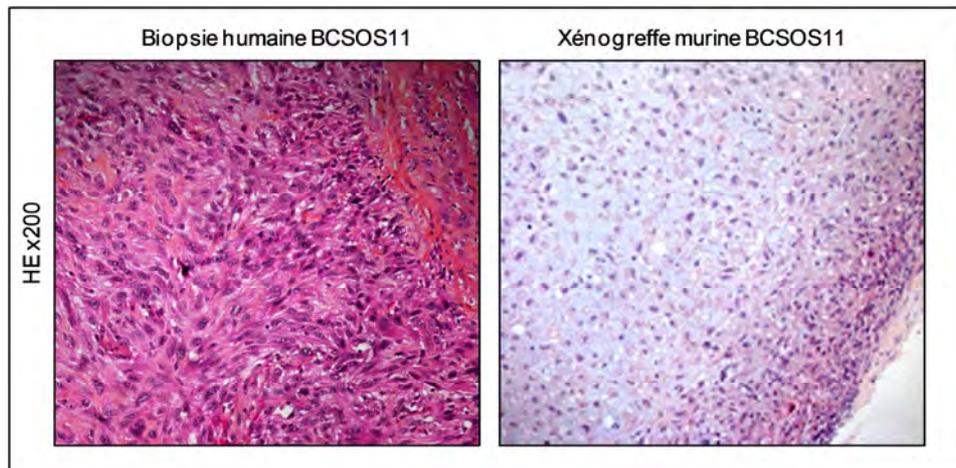


Figure 27 - Histologie de la tumeur humaine BCSOS11 et de sa xénogreffe murine (HE = hématoxyline/éosine)

Ces tumeurs ont été par la suite mises en culture après digestion enzymatique à la collagénase A, et le suivi des cellules tumorales humaines a été réalisé au moyen de deux méthodes différentes :

- Par cytométrie en flux, l'expression du marqueur mésenchymateux CD44 humain a été analysée dans les cultures grâce à un anticorps fluorescent ne faisant pas de réaction croisée avec le CD44 murin
- Par PCR quantitative sur ADN génomique, des amorces ciblant le gène murin codant pour RANK-L ont été utilisés pour identifier les cellules de souris, en parallèle avec le ciblage des séquences répétées de type ALU, présentes en grand nombre dans le génome humain (305).

Les cellules isolées à partir de la xénogreffe BCSOS11 étaient majoritairement murines, avec une détection forte du gène murin *Rank-L* et comprenaient très peu de séquences ALU. De plus, elles n'émettaient aucun signal de fluorescence en cytométrie en flux en réponse au marquage CD44 humain. Cette culture a par conséquent été stoppée rapidement (figure 28.A).

En revanche, les premiers passages de la culture de la xénogreffe BCSC01 étaient encourageants en raison d'une balance ALU/RANK-L murin en faveur d'une population majoritairement humaine, corrélée à une forte expression du marqueur CD44 humain.

Malheureusement, la positivité des cellules pour ce marqueur en cytométrie en flux a décliné à partir du passage 6, jusqu'à n'être plus significativement visible au passage 9 (figure 28.B). Le CD44 humain n'étant pas détecté dans des lignées murines comme la lignée d'OS POS-1 et exprimé stablement au cours du temps dans la totalité des lignées humaines d'OS et de CS disponibles au laboratoire (figure 3b de l'article), nous avons donc conclu à un épuisement progressif des cellules humaines au détriment des cellules murines dans la culture de la xénogreffe BCSCH01. L'expression d'autres marqueurs membranaires mésenchymateux dans cette lignée n'a toutefois pas été vérifiée.

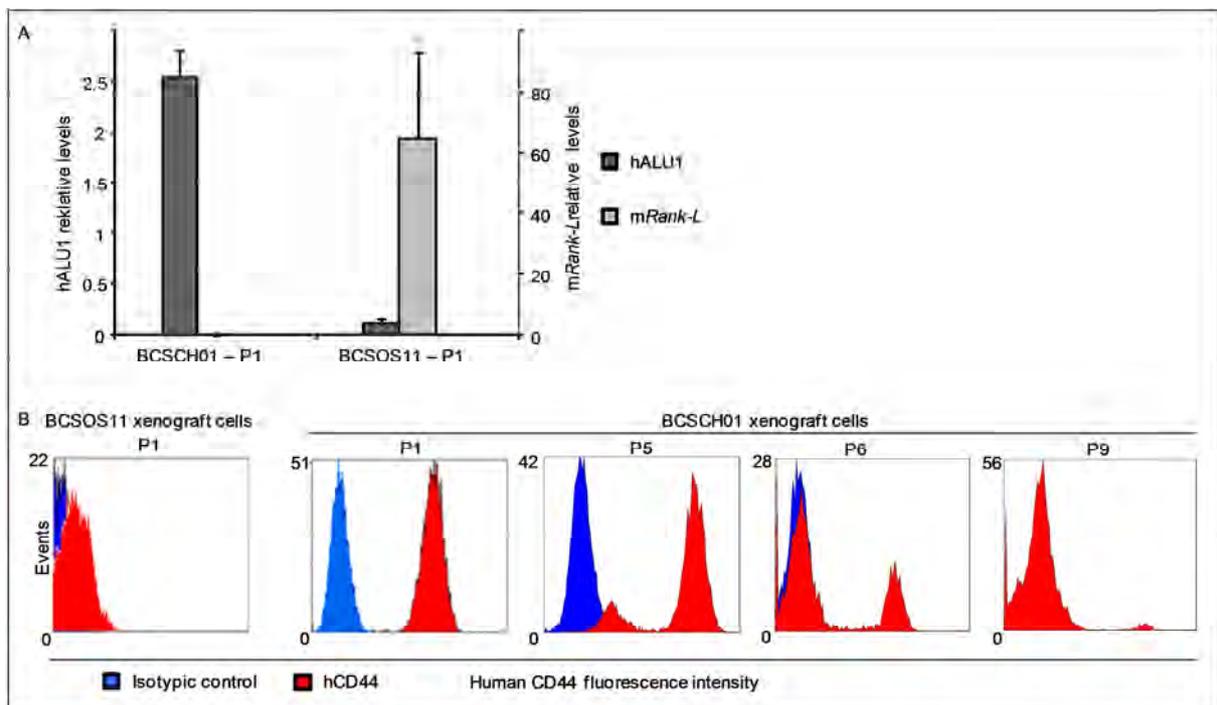


Figure 28 - Suivi des cultures de xénogreffe murine BCSOS11 et BCSCH01
A. Présence de séquences ALU humaines et du gène *Rank-L* murin dans les passages précoces (P1) des cultures BCSOS11 et BCSCH01
B. Expression du marqueur membranaire CD44 humain dans les cultures BCSOS11 et BCSCH01 (bleu : contrôle isotypique ; rouge : cellules marquées avec un anticorps anti-CD44 humain)

Ainsi, la mise en culture de xénogreffes murines obtenues par transplantation de biopsies humaines en souris Nude n'a pas permis l'obtention de lignées tumorales stables, en raison d'une prolifération rapide des cellules fibroblastiques murines résiduelles, au détriment des cellules tumorales humaines qui se sont rapidement épuisées.

4. Conclusions

A l'issue des projets BCS-1 et 2, seules trois cultures de biopsies de CS ont rempli toutes les conditions préalables à leur établissement en tant que lignées tumorales, toutes les

autres s'étant rapidement épuisées en culture. Le choix des conditions standard de culture n'était donc pas optimal pour le développement de cellules tumorales osseuses, confirmant la difficulté rencontrée actuellement par les équipes de recherche pour mettre au point de nouveaux modèles d'études des TOP. L'environnement des TOP chez les patients est en effet très complexe et fait intervenir de nombreux facteurs qui ne peuvent pas être facilement récapitulés en culture cellulaire ou chez l'animal, comme en témoignent les résultats peu probants des transplantations sous-cutanées de biopsie en souris Nude.

Pour ces raisons, le projet BCS ne fut pas reconduit pour une troisième phase après la clotûre de BCS-2 fin 2010. Cependant, ce projet aura permis de collecter un grand nombre d'échantillons provenant de patients atteints de différentes pathologies et sous-types tumoraux, utilisables pour des études ultérieures à haut-débit. De plus, en tenant compte des données rassemblées durant les quatre années d'existence de BCS, il sera possible d'élaborer de nouvelles stratégies plus adaptées à l'établissement de lignées tumorales osseuses, qui demeure un point critique pour l'avancée de la recherche sur ces pathologies.

2^{ème} Partie :

**Effets du miR-152 sur le développement
de l'ostéosarcome**

I. Introduction

Des études récentes indiquent que les miRNA agissent comme des signaux régulateurs du maintien du statut souche, de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes. Notamment, de nombreux miRNA impliqués dans la régulation des voies de différenciation adipocytaire, chondrocytaire et ostéoblastique des MSC ont été identifiés ces dernières années, enrichissant ainsi la complexité du contrôle de ces processus dans des conditions physiologiques mais aussi pathologiques (306). Des signatures d'expression de miRNA spécifiques ont en effet été mises en évidence dans des lignées et des échantillons humains d'OS, avec de multiples cibles impliquées dans des processus biologiques variés tels que les mécanismes de tumorigenèse, le développement métastatique et la résistance aux traitements (307).

Dans ce contexte et dans le cadre du programme MoDICSMe (Région Centre/FEDER) coordonné par M. Jean-Christophe Pagès (INSERM U966, Tours, France), l'équipe de M. Luc Sensébé (STROMALab, UMR5273, UPS/CNRS/EFS, INSERM U1031, Toulouse, France) a réalisé un criblage « microarray » sur des MSC cultivées dans des conditions ostéoblastiques pendant 21 jours. Parmi les miRNA les plus surexprimés durant ce processus d'ostéoblastogenèse, les chercheurs de cette unité ont ainsi identifié le miR-152.

Les miRNA de la famille miR-148/152 sont connus pour être exprimés différemment dans les cellules souches, et en particulier dans des MSC engagées dans des processus de différenciation. Le miR-148a est ainsi sous-exprimé dans les MSC par rapport à des cellules souches embryonnaires et à des MSC différenciées dans la voie ostéoblastique (308), de même que le miR-148b est surexprimé durant les phases précoces de l'ostéoblastogenèse des MSC (112), la surexpression du miR-152 ayant été en revanche observée dans des MSC différenciées *in vitro* en chondrocytes (116). Cette famille de miRNA est également connue pour son rôle d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs dans de nombreux types de cancers (309), le miR-152 étant sous-exprimé dans les carcinomes hépatocellulaires (310), ainsi que dans les tumeurs et lignées issues de cancers gastrointestinaux (311) et de carcinomes ovariens (312). Parmi les cibles prédites des miRNA de la famille miR-148/152, on retrouve notamment l'oncogène *DNMT1*, dérégulé dans un grand nombre de cancers (313), le gène suppresseur de tumeur *PTEN* (314), mais aussi des gènes impliqués dans la mobilité et la prolifération cellulaire, comme *PXR*, *CAND1*, *IGF-1R* et *IRS1* (309). Plus spécifiquement, le miR-152 a été identifié comme suppresseur de tumeurs

dans les cancers de l'endomètre via le blocage des trois gènes protumoraux *MET*, *E2F3* et *RICTOR* (315), et réduirait la migration et l'invasion de lignées de cancer de la prostate en inhibant l'expression du TGF α (316).

La cible principale du miR-152 identifiée par l'équipe de M. Luc Sensébé est le gène *PPARGC1A* (peroxysome proliferator-activator receptor gamma, coactivator 1 α). *PPARGC1A*, ou PGC-1 α , fait partie de la famille des coactivateurs du facteur de transcription clé de la différenciation adipocytaire, PPAR γ . Ces protéines sont des régulateurs importants de plusieurs voies métaboliques, telles que la phosphorylation oxydative, la glycolyse et les voies de biosynthèse des lipides (317). Depuis quelques années, des études ont identifié plusieurs liens entre l'action de ces coactivateurs et les dérèglements métaboliques liés à de nombreux processus tumoraux. En raison de son rôle dans l'homéostasie énergétique et dans la réduction du stress oxydatif induit par les ROS (reactive oxygen species)(318), PGC-1 α rend en effet les cellules tumorales plus résistantes aux mécanismes de mort cellulaire. De plus, l'activation par PGC-1 α de voies anaboliques telles que la lipogenèse *de novo* et la voie des pentoses phosphate (319) favorise la croissance tumorale en générant de la biomasse. Cependant, des études font état d'effets antitumoraux de ce coactivateur, dont le rôle dans les mécanismes de tumorigenèse est donc encore sujet à controverses (320). Dans des conditions physiologiques, PGC-1 α est également connu pour activer l'expression de *COL2A1* dépendante de SOX9 durant la différenciation chondrocytaire des MSC (321), et pour être sous-exprimé chez les adipocytes dans des conditions hypoxiques (322).

D'après les premiers résultats des travaux menés dans le cadre du programme MoDICS_{SoMe}, une surexpression du miR-152 induite par transduction lentivirale dans des MSC humaines provoquerait, dans des conditions ostéogéniques en présence de l'inducteur BMP4, une diminution de l'expression des facteurs de transcription RUNX2 et SOX9, mais une augmentation de l'expression d'ALP et du facteur de transcription OSTX, ainsi que du récepteur hormonal PTHR1. Les cellules d'OS MG63 surexprimant le miR-152 voyaient également leurs taux basaux d'ALPL et de RUNX2 augmentés, phénomène amplifié par l'ajout de BMP4 dans le milieu de culture. De plus, dans des conditions ostéogéniques, cette surexpression du miR-152 activait leur capacité à synthétiser de la matrice minéralisée. Une diminution de l'expression de *PPARGC1A* a été en outre observée dans les MSC et les cellules MG63 surexprimant le miR-152. Ces premières données ont donc mis en évidence un rôle du miR-152 dans le processus d'ostéoblastogenèse, qui passerait notamment par une inhibition de l'expression du coactivateur *PPARGC1A*.

L'objectif de l'étude préliminaire présentée ici était de déterminer l'effet du miR-152 sur les propriétés des OS et notamment sur leur capacité de différenciation dans la voie ostéoblastique. En réalisant un modèle murin à partir de lignées d'OS modifiées au moyen de vecteurs lentiviraux, nous pouvions ainsi évaluer l'impact d'une surexpression du miR-152 sur le développement tumoral d'OS via une potentielle induction de leur différenciation ostéoblastique, qui serait liée à une inhibition de la coactivation par PPARGC1A de la voie adipocytaire régulée par PPAR γ .

II. Matériel et méthodes

A. Culture cellulaire

Les lignées humaines d'OS MNNG-HOS (ATCC® CRL-1547™, ici nommée HOS), MG63 (MG-63, ATCC® CRL-1427™) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium ; Lonza, Bazel, Suisse) complété avec 1% de pénicilline/streptomycine (P/S, 100U/mL ; Lonza) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Lonza). La lignée OSRGA, qui dérive d'un modèle d'OS de rat induit à l'origine par irradiation (323), a été maintenue en culture dans les mêmes conditions.

B. Transduction lentivirale in vitro

Le lenti-miR-152 a été conçu dans l'unité de M. Jean-Christophe Pagès et fourni gracieusement par l'équipe de M. Luc Sensébé. Cette construction permettait la coexpression du miR-152 avec la protéine fluorescente rouge (RFP). Des cultures de cellules d'OS proches de la confluence (70%) ont été incubées avec cette production lentivirale à une multiplicité d'infection de 20. Après 24h, les milieux de culture ont été changés, et les cellules maintenues en culture jusqu'à confluence. Dès le second passage, les cellules transduites ont été sélectionnées avec de la puromycine à 5 μ g/mL, et l'efficacité de la transduction a été vérifiée par cytométrie en flux (FC500 ; Beckman-Coulter Inc., Brea, CA, USA) par rapport à des cellules non transduites. Le lenti-miR-shLacZ-GFP déjà décrit (324) a été utilisé pour des transductions contrôle, dans les mêmes conditions mais sans l'étape de sélection à la puromycine, la construction lentivirale n'induisant pas de résistance à cet antibiotique.

C. RT-PCR quantitative (RT-qPCR)

1. Extraction des ARN

Les ARN totaux des lignées cellulaires ont été extraits en utilisant le réactif TriReagent® (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Le même protocole a été utilisé pour les fragments de tumeurs murines après une première étape de broyage mécanique à l'Ultra Turrax Disperser DI25 (IMLAB sarl, Lille, France).

2. Reverse-Transcription

L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 1µg d'ARN total, en utilisant le kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Le protocole spécifique appliqué pour synthétiser de l'ADNc à partir des miR-152 présents dans les ARN totaux ainsi que les séquences des amorces « stem loop » utilisées pour cibler le miR-152 humain (hsa-miR-152) et le petit ARN nucléaire contrôle U6B (hsa-U6B) sont indiquées dans les tableaux 4.A et 4.B.

A	Volume pour une réaction (µL)
ARN total 25ng/µL	4
500nM stem-loop amorce RT	1
dNTPs mix 10mM*	1
5X first-strand buffer*	2
DTT 0,1M*	1
RNase OUT 40U/µL*	0,44
Multiscribe R Transcriptase 50U/µL**	0,66
Volume final	10,1

*Invitrogen™ Life Technologies, Paisley, UK ; **Applied Biosystems® Life Technologies

III. B

ARN cible	Séquence des amorces
hsa-miR-152	5'- gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgaaccaagttc -3'
hsa-U6B	5'- gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgaacaaaata -3'

Tableau 4 – Réaction de Reverse-Transcription spécifiques du miR-152 et du contrôle U6B
A. Protocole de synthèse d'ADNc spécifiques de petits ARN à partir d'ARN totaux.
B. Séquences des amorces « stem-loop » ciblant le miR-152 et U6B.

Les réactions de Reverse-Transcription spécifiques du miR-152 et d'U6B ont été réalisées dans le thermocycleur CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), selon les étapes suivantes :

1. 16°C, 30mn
 2. 20°C, 30s
 3. 42°C, 30s
 4. 50°C, 1s
- (répétition 39 fois des étapes 2 à 4)
5. 85°C, 5mn

1. RT-qPCR

Le mélange réactionnel contenait 10ng d'ADNc, 200 à 300nM d'amorces (tableau 6) et du SYBR Green PCR MasterMix (Bio-Rad). Les réactions de PCR ont été réalisées dans le thermocycleur CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), avec CYC1 (cytochrome c-1) et HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) comme gènes de référence.

Dans le cas des préparations d'ADNc de miR-152 et d'U6B, un protocole spécifique de RT-PCR quantitative a été utilisé (tableaux 5.A et 5.B).

A	Volume pour une réaction (µL)
ADNc (équivalent 1ng d'ARN)	5
Amorce sens 1,5µM	1
Amorce anti-sens 0,7µM (universelle)	1
SYBR Green PCR MasterMix	12,5
H2O RNase-free	5,5
Volume final	25

IV. B

Amorce	Séquence
miR-152 sens	5'- gcatcctcagtgcattgaca -3'
U6B sens	5'- cgcaaggatgacacgcaa-3'
Anti-sens	5' - gtcagggtccgaggt -3'

Tableau 5 – Réaction de RT-qPCR spécifiques du miR-152 et du contrôle U6B
A. Protocole de RT-qPCR utilisé pour les ADNc de miR-152 et d'U6B.
B. Séquences des amorces sens spécifiques et de l'amorce anti-sens universelle utilisées pour les RT-qPCR du miR-152 et d'U6B.

Gène cible	Amorces pour RT-PCR quantitative
BSP	Sens : 5'- cgaatacacgggcgtcaatg -3' Anti-sens : 5'- gtagctgtactcatcttcataggc -3'
CSF-1	Sens : 5'- gttttagaccaggaacagttgaa -3' Anti-sens : 5'- cgcatggtgtcctccattat -3'
COL1A1	Sens : 5'- ctggacctaagggtgctgct -3' Anti-sens : 5'- gctccagcctctccatcttt -3'
COL2A1	Sens : 5'- tgggtgtaatggcgagaag -3' Anti-sens : 5'- cccagtctctccacgttcac -3'
COL10A1	Sens : 5'- caccttctgactgctcatc -3' Anti-sens : 5'- ggcagcatattctcagatgga -3'
FABP4	Sens : 5'- ccttataaaataactgagatttcttca -3' Anti-sens : 5'- ggacacccccatctaaggtt -3'
MET	Sens : 5'- tctgcctgcaatctacaagg -3' Anti-sens : 5'- attattcctccgaaatccaaagt -3'
MMP13	Sens : 5'- cctggacaagtagttccaaagg -3' Anti-sens : 5'- gccggtgtaggttagatagga -3'
OC	Sens : 5'- ggcgctacctgtatcaatgg -3' Anti-sens : 5'- tcagccaactcgtcacagtc -3'
OPG	Sens : 5'- cagctcacaagaacagactttcc -3' Anti-sens : 5'- tcgaaggtgaggttagcatgct -3'
OSTX	Sens : 5'- ggctcagctctctccatctg -3' Anti-sens : 5'- ggggactggagccatagtg -3'
PPARG	Sens : 5'- gacctgaaactcaagagtacaaa -3' Anti-sens : 5'- tgaggcttattgtagagctgagtc -3'
PPARGCA1	Sens : 5'- ccaaaggatgcgctctcgtca -3' Anti-sens : 5'- cggtgtctgtagtggcttgact -3'
RANKL	Sens : 5'- tcgttgatcacagcacatca -3' Anti-sens : 5'- tatgggaaccagatgggatgct -3'
RUNX2	Sens : 5'- gcctaggcgcatttcaga -3' Anti-sens : 5'- gctcttctactgagagtggagg -3'
SMAD2	Sens : 5'- ggcaattgaaaactgcgaat -3' Anti-sens : 5'- gtcggggcactaataactgga -3'
SOST	Sens : 5'- agctggagaacaacaagacca -3' Anti-sens : 5'- agctgtactcggacacgtctt -3'
SOX2	Sens : 5'- gtatcaggagttgtcaaggcagag -3' Anti-sens : 5'- tcttagtcttaagaggcagcaaac -3'
TGFB2	Sens : 5'- ccaaagggtacaatgccaac -3' Anti-sens : 5'- cagatgcttctggattatggtatt -3'
VEGFA	Sens : 5'- ccttctgctctacctccac -3' Anti-sens : 5'- ccacttctgatgattctgc -3'

Tableau 6 – Séquences des amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR quantitatives

D. Analyse bioinformatique

Les cibles potentielles du miR-152 humain ont été prédites en compilant les données fournies par les bases de données TargetScan (<http://www.targetscan.org>) et microRNA.org (<http://www.microRNA.org>), constituant ainsi une liste finale de 700 gènes. Les procédés biologiques dans lesquels l'ensemble de ces gènes est impliqué ont été identifiés avec DAVID v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

E. Suivi de la prolifération de cellules en culture

Pendant 10 jours, le nombre de cellules récupéré après chaque passage et le nombre de cellules ré-ensemencées ont été déterminés dans les cultures HOS miR152 et HOS shLacZ par dénombrement sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan et utilisés pour réaliser une courbe de croissance. Les temps de dénombrement (dT) ont été calculés en utilisant la formule $dT = t * \ln(2) / (\ln(N_f) - \ln(N_0))$, avec t la durée de la culture en jours, N_f le nombre final de cellules obtenues et N_0 le nombre initial (réensemencé au passage précédent).

F. Test de chimiosensibilité in vitro

Des cellules HOS miR152 et HOS shLacZ ont été mises en culture en plaque 96 puits (N=3) et exposées pendant 72h à des concentrations croissantes de DOX (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), CIS (Sigma-Aldrich) ou MAF (Baxter, Deerfield, IL, USA). Le nombre de cellules viables a été déterminé avec le test de viabilité WST-1 (Roche Applied Science, Bazel, Suisse) en utilisant un lecteur de microplaques TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne), et les valeurs des IC50 ont été estimées pour chaque agent de chimiothérapie testé.

G. Différenciation ostéoblastique

Des cellules HOS miR152 et shLacZ ont été ensemencées en plaque 24 puits avec une densité de 20 000 cellules par puits. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu α -MEM (Gibco® Life-Technologies, Paisley, UK) complétement avec 2% de SVF (Hyclone Perbio, Bezons, France), 1% de P/S, 100nM de dexaméthasone (Sigma-Aldrich), 10nM de vitamine D3 (Roche Diagnostics), 50 μ g/mL d'acide ascorbique et 10mM de β -glycérophosphate (Sigma-Aldrich). Le milieu a été changé deux fois durant les 7 jours de culture, à l'issue desquels les puits ont été lavés au PBS (Phosphate Buffered Saline, Lonza) puis congelés à sec à -20°C. Les ARN totaux ont été par la suite extraits selon le protocole décrit précédemment.

H. Induction de développement tumoral chez la souris

Nude

Tous les animaux destinés à l'expérimentation ont été hébergés dans un environnement à l'écart des pathogènes en accord avec les indications institutionnelles du Comité Ethique pour l'Expérimentation Animale de la région Pays de la Loire (CEEA Pays de la Loire n°06) et sous la supervision de personnel autorisé.

Après anesthésie par inhalation d'un mélange d'air et d'isoflurane (2%, 0,2 L/min), des souris Nude âgées de 4 semaines ont subi une injection intramusculaire paratibiale gauche de 2×10^6 cellules HOS shLacZ ou HOS miR152 (deux groupes, 8 souris par groupe). Les animaux ont été suivis pendant environ un mois, et deux diamètres perpendiculaires, un grand diamètre L et un petit diamètre l, ont été mesurés avec un pied à coulisse manuel au niveau des tumeurs formées. Le volume tumoral a été ensuite calculé avec la formule $(l^2 \times L)/2$. Les animaux ont été sacrifiés lorsque le volume tumoral moyen de chaque groupe atteignait 1500 mm^3 . Lors du sacrifice, les nodules métastatiques visibles au niveau du poumon ont été dénombrés pour chaque animal, et des fragments de tumeur issus de plusieurs souris de chaque groupe ont été récupérés dans du formol 4% pour analyse histologique et congelés à sec dans de l'azote liquide pour extraction d'ARN selon le protocole préalablement décrit. Cette manipulation a été réalisée deux fois, de façon indépendante. Les volumes tumoraux mesurés 20 et 33 jours après l'injection des cellules chez les souris ont été utilisés pour calculer un volume tumoral relatif, correspondant au ratio entre les volumes à J33 et J20.

L'architecture osseuse a été analysée sur des tibias naïfs et porteurs de tumeur en utilisant le micro-scanner haute résolution SkyScan-1072 X-ray micro-computed tomographic system (SkyScan, Kartuizersweg, Belgique). Les tibias ont été scannés une fois fixés, et les reconstructions 3D ont été réalisées avec le logiciel ANT (SkyScan).

I. Histologie

1. Préparation des échantillons

Après plus d'une semaine de fixation, les pattes des animaux des groupes shLacZ et miR152 ont été décalcifiées dans un « KOS Microwave Histostation » (Milestone[®], Kalamazoo, MI, USA) contenant une solution de PBS contenant 4,13% d'EDTA et 0,2% de paraformaldéhyde. A la fin du cycle de décalcification, les échantillons ont été déshydratés puis inclus en blocs de paraffine. Les coupes de $3 \mu\text{m}$ d'épaisseur utilisées pour les différentes

analyses histologiques ont été réalisées avec un microtome Leica® RM2255. Toutes les acquisitions (colorations et immunohistochimie) ont été obtenues à l'aide du scanner de lames Nanozoomer 2.ORS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japon).

2. Colorations histologiques

Les colorations ont été réalisées grâce à l'automate à coloration HMS 740 (Microm® Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Allemagne), qui permet le déparaffinage et la réhydratation des échantillons par des bains successifs d'éthanol et de xylène.

- TRAP (révélation des ostéoclastes en rouge foncé)

Après déparaffinage, les lames ont été colorées pendant 90 min à 37°C dans la solution indiquée ci-dessous (pour 60 ml) :

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

Une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer a ensuite été réalisée dans l'automate à coloration, et le montage des échantillons entre lame et lamelle a été réalisé avec le milieu non-aqueux Pertex (Histolab®, Göteborg, Suède).

- Trichrome de Masson (révélation des fibres de collagène de l'os décalcifié en vert)

Cette coloration a été réalisée après déparaffinage dans l'automate à coloration, par succession de bains d'hématoxyline de Groat, de Fuch sine Ponceau, d'Orange G molybdique et de Vert lumière. Après réhydratation des lames, le montage a été réalisé en milieu non-aqueux.

- Rouge Sirius (révélation des fibres de collagène de type I en rouge)

Après déparaffinage, les lames ont été colorées à température ambiante dans une solution de rouge Sirius pendant 1h. Après un bain rapide d'eau acétifiée et un bref rinçage des lames à l'eau bi-distillée, une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer a été réalisée, suivie du montage en milieu non-aqueux.

3. Immunohistochimie

Toutes les colorations immunohistochimiques suivent le même principe. Après blocage des peroxydases endogènes par de l'H₂O₂ à 3% et saturation des sites aspécifiques, une première incubation des tissus sur lame avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, les lames sont mises en présence avec un anticorps secondaire biotinylé. Le signal est ensuite amplifié par la liaison à la biotine portée par l'anticorps secondaire d'une streptavidine couplée à une peroxydase (Dako, Glostrup, Danemark). La révélation est finalement réalisée avec le substrat chromogène de la HRP, la diaminobenzidine (DAB ; Dako). Après contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer, le montage entre lame et lamelle est réalisé en milieu de montage non-aqueux. Ces étapes de fixation d'anticorps et de révélation sont entrecoupées de séries de 3 lavages de 5min dans des solutions de TBS (Tris-Buffered Saline) + 0,05% Tween. Les concentrations et les temps d'incubation des anticorps utilisés pour chaque coloration immunohistochimique sont détaillés dans le tableau 7.

Immunomarquage	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Caspase 3 active	« Cleaved Caspase 3 Rabbit Monoclonal Antibody » (9664*) ; 1/400 ; incubation la nuit, 4°C	« Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated » (E0432 ; Dako) ; 1/300 ; 30min à 37°C
Ki67	« Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen » (M7240 ; Dako) ; 1/100 ; incubation la nuit, 4°C	« Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins / Biotinylated » (E0433 ; Dako) ; 1/200 ; 30min à 37°C

*Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, US

Tableau 7 – Anticorps utilisés pour les colorations immunohistochimiques Caspase 3 active et Ki67

4. Analyses histologiques

L'estimation du pourcentage moyen de matrice collagénique dans les coupes colorées au rouge Sirius, ainsi que du pourcentage moyen de cellules apoptotiques (positives pour la Caspase 3 active) et de nécrose (zone dépourvue de noyaux) a été réalisée visuellement sur chaque échantillon, avec l'attribution d'un score :

- Score de 1 : 0 à 10%
- Score de 2 : 10 à 20%
- Score de 3 : 20 à 30%
- Score de 4 : plus de 40%

Une lame représentative d'un échantillon donné a ainsi été scannée, et un score a été attribué à plusieurs champs d'une même lame afin d'obtenir un score moyen. Les résultats ont ensuite été regroupés par groupe pour analyse statistique.

Le pourcentage de cellules positives pour Ki67 (marqueur des cellules en prolifération) par rapport aux cellules totales a été estimé sur une lame représentative de chaque échantillon par un programme de quantification via le logiciel ImageJ sur plusieurs champs, et le pourcentage moyen par échantillon a ensuite été calculé.

J. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés par le test t de Student grâce au logiciel Prism3. Ils sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM et sont considérés significatifs quand la p-value est inférieure à 0,05 (***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05), la barre horizontale apparaissant sur les histogrammes avec nuage de points correspondant à la valeur moyenne.

III. Résultats

A. Induction de la surexpression du miR-152 dans des lignées d'OS

Trois lignées d'OS de référence, deux humaines et une de rat, ont été transduites dans les mêmes conditions avec le lenti-miR-152, puis sélectionnées pour leur résistance à la puromycine. Suite à la sélection, le pourcentage de cellules transduites, exprimant donc la RFP, a été déterminé dans les trois cultures par cytométrie en flux (figure 29.A). Avec 99,06% de cellules positives pour la RFP, les cellules HOS montraient la meilleure efficacité de transduction/sélection, très légèrement supérieure à celle de la culture de MG63 (environ 97% de cellules positives). Cependant, la transduction du lenti-miR-152 dans les cellules OSRGA a été beaucoup moins efficace, avec moins de 90% de positivité pour la RFP et une moyenne de fluorescence presque 10 fois plus faible que dans les cultures de MG63 et HOS.

Les cellules HOS transduites avec le lenti-miR-152 (HOS miR152) surexprimaient significativement le miR-152 par rapport aux HOS transduites avec le vecteur lentiviral contrôle HOS shLacZ (figure 29.B). En revanche, cette différence d'expression du miR-152 par rapport aux cellules contrôle est beaucoup moins marquée pour MG63 et OSRGA miR152.

Les résultats de cytométrie en flux et de RT-qPCR réalisées sur les cultures transduites nous ont ainsi conduits à privilégier les cellules HOS miR152 pour cette étude, qui présentaient la meilleure surexpression du miR-152.

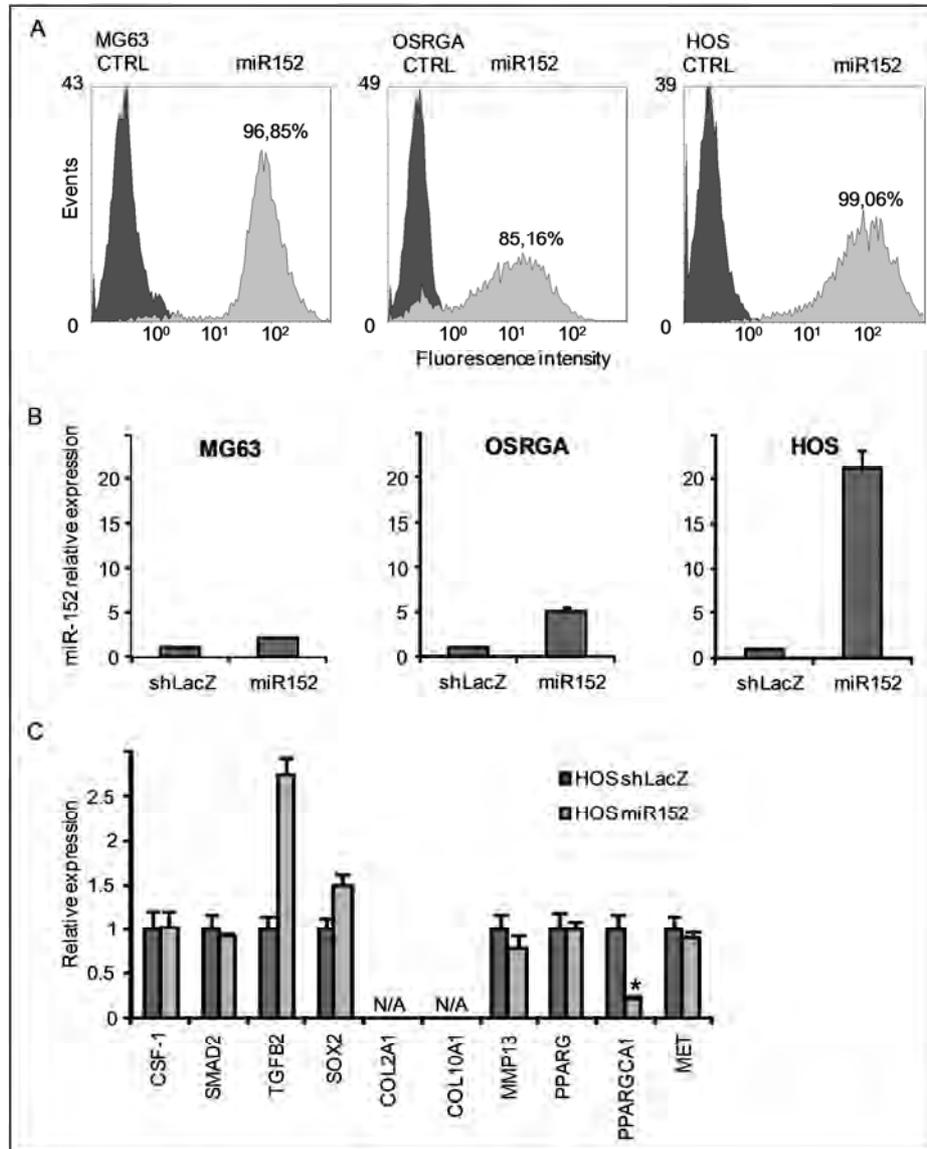


Figure 29 – Surexpression du miR-152 dans une lignée d'ostéosarcome

A. Estimation de l'efficacité de transduction du vecteur lentiviral lenti-miR-152 dans les lignées MG63, OSRGA et HOS par cytométrie en flux (noir : contrôle non transduit ; gris : signal RFP émis par les cellules transduites).

B. Analyse par RT-qPCR de l'expression du miR-152 dans les cellules MG63, OSRGA et HOS transduites par rapport à leur contrôle shLacZ.

C. Analyse par RT-qPCR de l'expression de cibles potentielles du miR-152 dans les cellules HOS miR152 par rapport aux cellules contrôle HOS shLacZ (N/A : non analysable).

B. Identification des cibles principales du miR-152 dans la lignée HOS miR152

Parmi les 700 cibles prédites du miR-152, la majorité était impliquée dans des voies de régulation de la transcription des gènes, mais aussi dans la mort cellulaire ou le développement de la vascularisation. L'analyse DAVID a cependant révélé quelques groupes de cibles jouant un rôle dans des mécanismes de différenciation cellulaire ou dans la régulation des processus d'ossification ou de synthèse des acides gras (tableau 8).

Biological process	Number of genes (examples)	p-value
Regulation of transcription	157 (E2F3, FOSB, MDM4, SMAD2, SOX5, BMP3, IGF1, PPARG, PPARGC1A, WNT1...)	4.5E-09
Cell death	40 (BCL2L2, CDKN1B, FGF2, PTEN, KIT, TGFB2, TNFRSF1B, ATXN1...)	2.4E-02
Vasculature development	25 (DICER1, FGF2, FOXF1, TGFA, TGFB2, ROBO1...)	5.0E-05
Positive regulation of cell differentiation	21 (POU4F2, SMAD2, SMAD5, TGIF2, NEUROD1, PPARG, PPARG, ROBO1, ROBO2, TGFB2...)	6.7E-04
Skeletal system development	18 (SMAD5, SOX5, ACVR2B, BMP3, COL2A1, FBN1, IGF1, MMP13, NOG...)	1.2E-01
Negative regulation of cell differentiation	16 (ABCA1, CDK6, IGF1, NOG, PPARG, PSEN1...)	2.3E-02
TGF-beta signaling pathway	11 (SMAD2, SMAD5, ACVR1, ACVR2B, GDF6, NOG, ROCK1, TGFB2...)	1.9E-03
Regulation of ossification	7 (SMAD5, ACVR1, ACVR2B, CSF1, CDK6, IL6ST, TGFB2)	8.4E-02
Regulation of fatty acid metabolism process	6 (SCAP, STRADB, PPARG, PPARGC1A, PRKAA1, PRKAA2)	4.4E-02

Tableau 8 – Identification des processus biologiques impliquant des cibles du miR-152 chez l'homme par analyse d'enrichissement fonctionnel (DAVID)

Afin d'identifier les cibles principales du miR-152 *in vitro*, l'expression de 10 de ces cibles potentielles impliquées dans le développement du tissu osseux (*CSF-1*, *SMAD2*, *TGFB2*, *SOX2*, *COL2A1*, *COL10A1*, *MMP13*), dans la régulation de l'adipogenèse (*PPARG*, *PPARGC1A*) ou dans la tumorigenèse (*MET*) a été déterminée dans les cellules HOS miR152 par rapport aux cellules HOS shLacZ (figure 29.C). La seule diminution significative de l'expression génique induite par la surexpression du miR-152 a été observée sur *PPARGC1A*, les 9 autres cibles analysées présentant des niveaux d'expression similaire voire supérieurs dans les cellules HOS-miR152 par rapport aux cellules contrôles.

C. Effet du miR-152 sur le phénotype de la lignée HOS en culture

Le miR-152 ciblant de nombreux gènes impliqués notamment dans la régulation transcriptionnelle et la mort cellulaire, sa surexpression dans une lignée tumorale pourrait avoir des répercussions sur ses propriétés.

Des dénombrements successifs pendant 10 jours de culture n'ont pas montré de différence de vitesse de prolifération des cellules HOS miR152 par rapport aux shLacZ, avec des temps de doublement assez proches (0,86 jours pour HOS miR152 contre 0,96 jours pour HOS shLacZ ; figure 30.A). De plus, les HOS surexprimant le miR-152 sont tout aussi sensibles que les HOS contrôles à trois agents de chimiothérapie, la DOX, le MAF et le CIS, et présentent des valeurs d'IC50 comparables (figure 30.C).

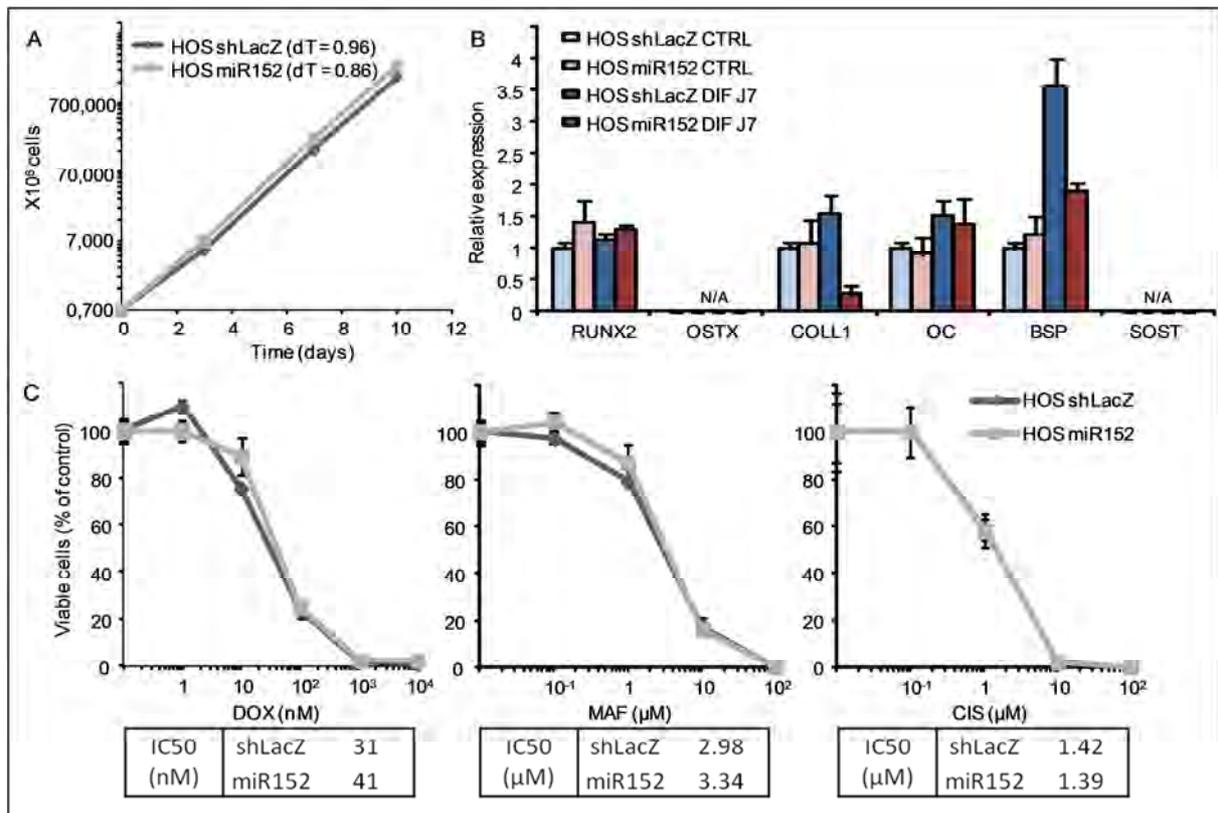


Figure 30 - Impact de la surexpression du miR-152 sur les HOS en culture

- A.** Suivi de la croissance des cultures HOS shLacZ et miR152 sur 10 jours (d_T : temps de doublement).
B. Analyse par RT-qPCR de l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique dans les cellules HOS miR152 et shLacZ (CTRL : conditions de culture standard ; DIF J7 : après une semaine de culture en présence d'inducteurs d'ostéoblastogenèse ; N/A : non analysable).
C. Evaluation par test de viabilité WST-1 de la sensibilité des cultures HOS shLacZ et miR152 à trois agents de chimiothérapie (DOX : doxorubicine ; MAF : mafosfamide ; CIS : cisplatine).

Après une semaine de culture en présence d'inducteurs de la différenciation ostéoblastique (dexaméthasone, vitamine D3, acide ascorbique et β -glycérophosphate), l'expression de marqueurs caractéristiques des phases précoce et tardive de l'ostéoblastogenèse a été déterminée par RT-qPCR dans les cellules HOS shLacZ et miR-152, en comparaison avec des cellules témoins cultivées dans des conditions standard (figure 30.B). Nous avons pu observer que la différenciation des HOS shLacZ pendant 7 jours a induit l'expression de COLL1, d'OC et de BSP. Cependant, aucun des marqueurs de différenciation analysés n'a été significativement surexprimé dans les HOS miR152 par rapport aux HOS shLacZ dans les conditions de différenciation testées. Il faut noter également une absence d'expression d'OSTX, un facteur de transcription-clé de l'ostéogénèse, et de SOST, un marqueur des ostéocytes. Nous avons également recherché à mettre en évidence la production de matrice minéralisée par les HOS shLacZ et miR152 mais aucune condition de culture n'a permis d'observer cette caractéristique fondamentale de l'ostéogénèse (résultats non montrés). En comparaison, les MSC ou les cellules OSRGA (tableau annexe 1) étaient capables de produire une matrice minéralisée (révélée au rouge Alizarine) en 21 jours de culture en milieu ostéogénique.

D. Développement du modèle murin HOS miR152

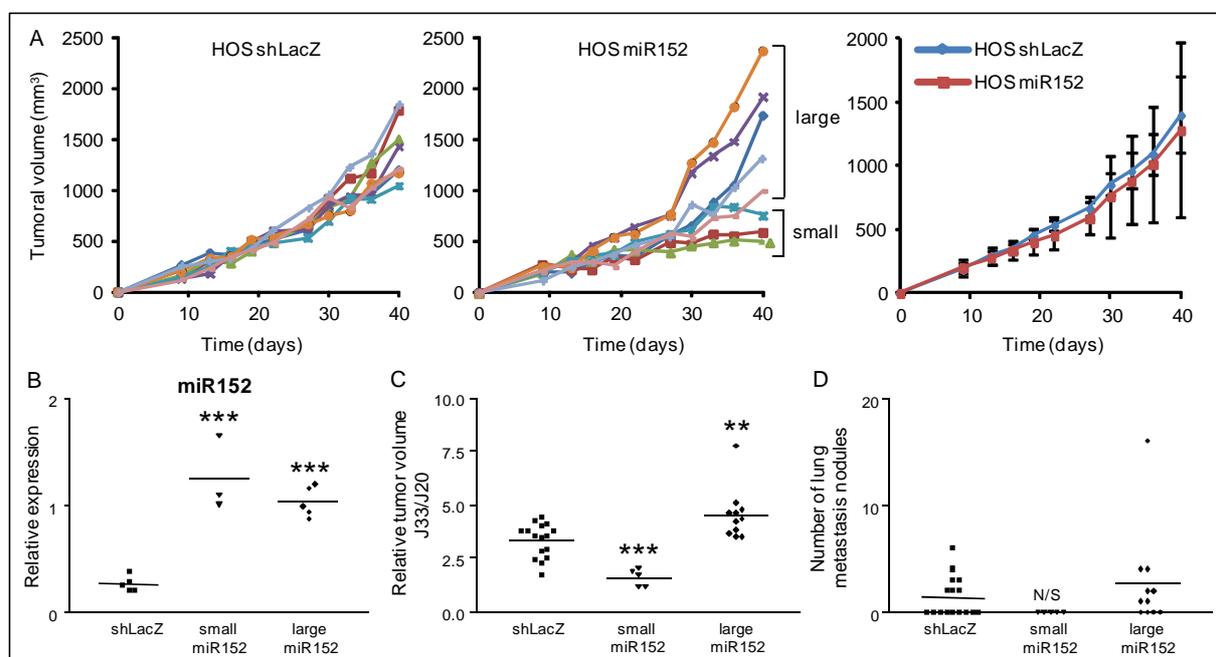


Figure 31 – Conséquences de la surexpression du miR-152 sur la tumorigénèse en souris Nude.

A. Suivi du développement tumoral chez l'animal après injection paratibiales de cellules HOS shLacZ et miR152 (N=8), et évolution du volume tumoral moyen de chaque groupe.

B. Analyse par RT-qPCR de l'expression du miR-152 dans les trois groupes de tumeurs HOS (shLacZ, small miR152 et large miR152).

C. Ratio des volumes tumoraux atteints à J33 et J20 dans les trois groupes de tumeurs HOS, en incluant les animaux des deux manipulations indépendantes.

D. Dénombrement des métastases pulmonaires de l'ensemble des animaux des deux manipulations indépendantes (N/S : non significatif)

Les résultats de nos études indiquent que la surexpression du miR-152 dans la lignée HOS n'a pas affecté sa prolifération, sa sensibilité aux agents de chimiothérapie ou sa capacité de différenciation ostéoblastique qui semble limitée *in vitro*. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact du miR-152 sur l'induction de tumeur par injection paratibiale chez la souris Nude.

Les 8 animaux injectés avec les cellules HOS shLacZ ont présenté des développements tumoraux similaires dans tout le groupe, avec un volume tumoral final moyen de 1400 mm³ en 40 jours (figure 31.A). Si le groupe HOS miR152 a atteint une valeur finale comparable pour son volume tumoral moyen (1280 mm³), le développement des tumeurs animal par animal a fait apparaître une importante hétérogénéité. En effet, 3 tumeurs sur 8 se sont développées plus lentement et n'ont pas dépassé un volume de 1000 mm³, les autres présentant des croissances similaires voire supérieures à celles du groupe HOS shLacZ (figure 31.A). Nous avons donc décidé de constituer trois groupes pour analyser les 16 tumeurs de cette manipulation : un groupe comprenant les 8 tumeurs shLacZ (shLacZ), un groupe constitué des 3 petites tumeurs miR152 (« small miR152 ») et un dernier groupe correspondant aux 5 grandes tumeurs miR152 (« large miR152 »). La surexpression du miR-152 a été vérifiée et est significative dans les « small miR152 », ainsi que dans les « large miR152 » par rapport au groupe shLacZ (figure 31.B).

Une seconde manipulation d'injection paratibiale indépendante et identique à la première a été réalisée, avec des résultats confirmant nos précédentes observations (figure 31.C,D et résultats non montrés). L'analyse de tous les animaux, avec au total 16 échantillons dans le groupe shLacZ, 5 dans le groupe « small miR152 » et 11 dans le groupe « large miR152 » a montré que le volume tumoral relatif à J33 par rapport à J20 était significativement réduit dans le groupe « small miR152 », alors qu'il était significativement augmenté dans le groupe « large miR152 », par rapport au groupe shLacZ (figure 31.C). De plus, les souris du groupe « small miR152 » ne présentaient aucune métastase pulmonaire, mais de façon non significative par rapport aux souris des groupes shLacZ et « large miR152 », dont les nombres moyens de nodules métastatiques étaient comparables (figure 31.D).

E. Effet du miR-152 sur l'ostéolyse para-tumorale

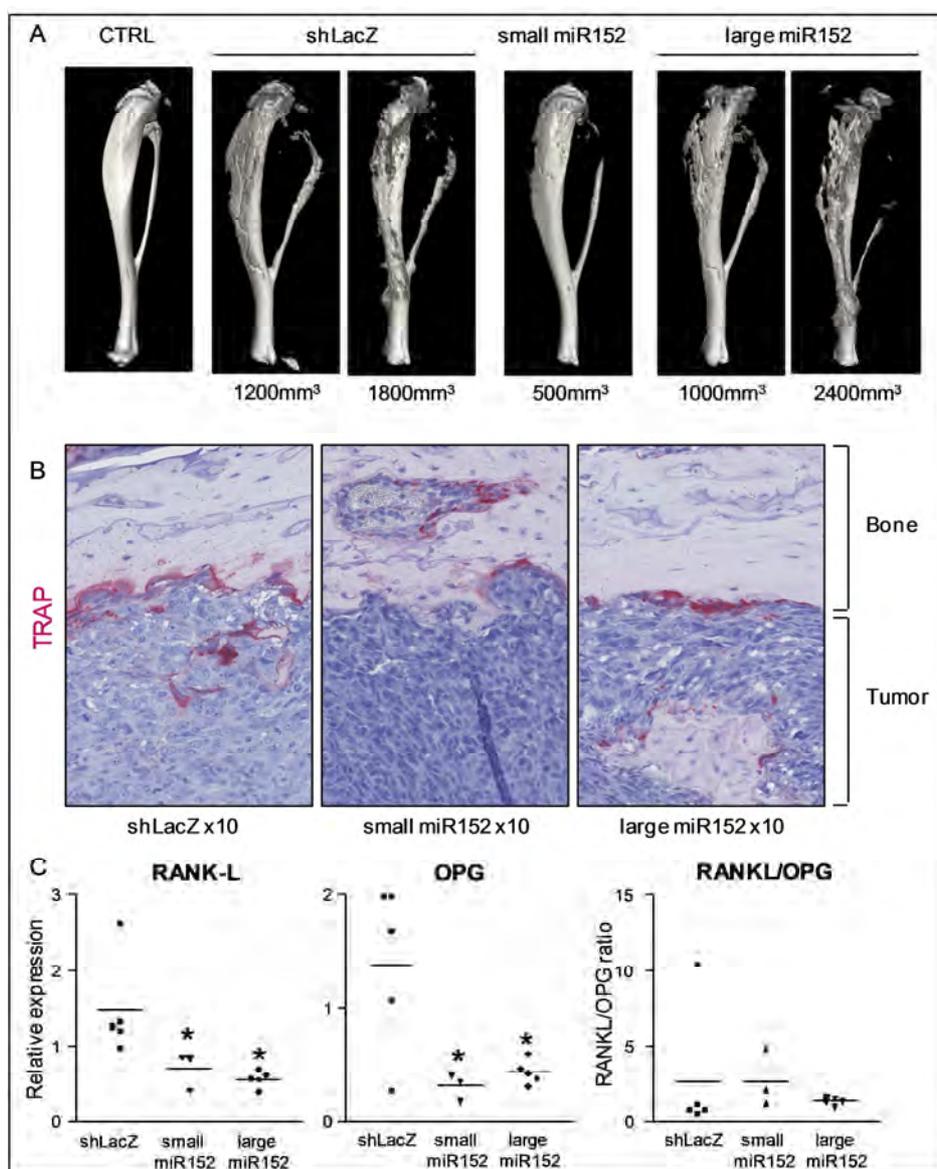


Figure 32 – Impact de la surexpression du miR-152 sur les propriétés ostéolytiques du modèle HOS murin (première manipulation).

A. Reconstruction en trois-dimensions à partir d'images obtenues par microtomographie des pattes d'animaux du groupe shLacZ, small miR152 et large miR152, et volumes tumoraux finaux correspondants. Ces images ont été comparées avec une patte contrôle non-injectée de l'un des animaux.

B. Révélation des ostéoclastes actifs à l'interface os-tumeur par coloration TRAP (une image représentative par groupe)

C. Analyse par RT-qPCR quantitative de l'expression de RANK-L et d'OPG dans les trois groupes de tumeurs HOS, et comparaison des ratios RANKL/OPG.

Les reconstructions osseuses réalisées après visualisation par microtomographie aux rayons X ont révélé d'importantes atteintes osseuses au niveau des tibias des animaux du groupe shLacZ. En effet, ils présentaient de multiples lésions ostéolytiques et des zones de formation d'os ectopique, avec des dommages plus visibles dans les animaux présentant les volumes tumoraux les plus importants (figure 32.A). Des résultats similaires ont été observés

dans le groupe « large miR152 ». Le groupe « small miR152 » ne présentait que de faibles atteintes ostéolytiques, cependant elles semblaient proportionnelles aux faibles volumes tumoraux.

La coloration histo-enzymologique TRAP n'a pas révélé de différence à l'interface os/tumeur dans les trois groupes, avec en général un faible nombre d'ostéoclastes identifié à J40 en fin d'expérimentation (figure 32.B). L'expression de RANKL, principale cytokine impliquée dans l'ostéoclastogenèse, était significativement plus faible dans les groupes « small miR152 » et « large miR152 ». Cependant l'expression de l'OPG, récepteur antagoniste de RANKL, était elle aussi réduite, conduisant à un ratio RANKL/OPG comparable entre les 3 groupes d'animaux (figure 32.C).

F. Effet in vivo du miR-152 sur la différenciation

Afin d'analyser l'expression de marqueurs spécifiques des voies de différenciation ostéoblastique et adipocytaire, de l'ARN a été extrait de 5 tumeurs shLacZ et des 8 tumeurs constituant les groupes « small » et « large miR152 » de notre première expérimentation, et utilisé pour des expériences de RT-qPCR (figure 33).

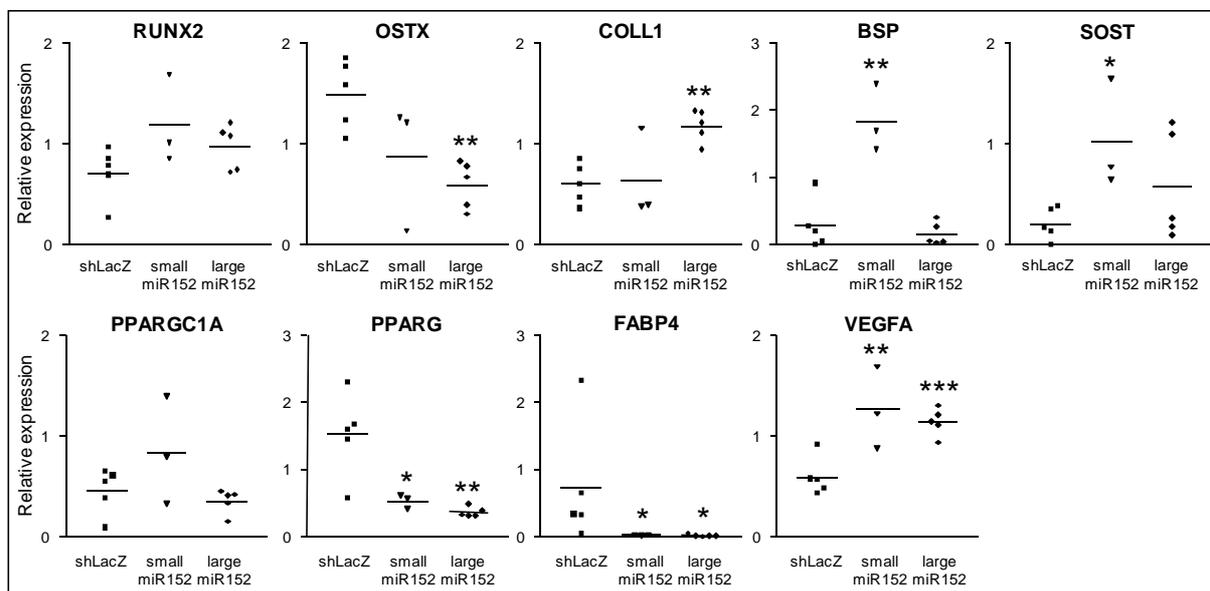


Figure 33 – Analyse par RT-qPCR de l'expression du VEGFA et de marqueurs impliqués dans les voies de différenciation ostéoblastique (RUNX2, OSTX, COLL1, BSP, SOST) et adipocytaire (PPARGC1A, PPARG, FABP4) dans les tumeurs HOS shLacZ et miR152 (première manipulation).

Alors que les tumeurs « large miR152 » surexprimaient un marqueur relativement précoce de la différenciation ostéoblastique (COLL1), les tumeurs « small miR152 » surexprimaient des marqueurs plus tardifs tels que BSP et SOST. L'expression de RUNX2 était comparable et celle d'OSTX était réduite, notamment dans les tumeurs « large miR152 ».

De plus, les deux groupes miR152 sur-exprimaient de façon significative le facteur pro-angiogénique VEGFA (figure 33).

Indépendamment de leur volume tumoral, les 2 groupes de tumeurs miR152 exprimaient plus faiblement les marqueurs adipocytaires PPARG et FABP4 mais présentaient des niveaux d'expression de PPARGC1A équivalents par rapport au groupe shLacZ.

G. Analyses histologiques des tumeurs miR152

La coloration des coupes de tumeur au rouge Sirius a révélé un réseau important de fibres de collagène, suggérant la formation d'ostéoïde dans une partie importante des tumeurs shLacZ et miR152, reconnaissables également par leur couleur bleu-verte après coloration au trichrome de Masson (figure 34.A). Cependant, des scores moyens similaires ont été attribués aux trois groupes, indiquant que le miR152 n'induisait pas la formation d'ostéoïde.

Des cellules apoptotiques ont été clairement identifiées dans les tumeurs de chaque groupe, avec une forte activité de la caspase 3. Cependant, le pourcentage de cellules apoptotiques était comparable dans les 3 groupes et des scores d'apoptose identiques ont été retrouvés (figure 34.B). Ces observations étaient corrélées avec la présence de grandes surfaces de nécrose dans toutes les tumeurs, avec un score nécrotique moyen proche de 2 (10 à 20% de nécrose) dans chaque groupe (figure 34.C). L'immunohistochimie Ki67 a cependant mis en évidence une diminution significative de l'expression de ce marqueur de prolifération dans le groupe « small miR152 » (20% en moyenne) par rapport aux tumeurs shLacZ et « large miR152 » (38 et 33% respectivement ; figure 34.D).

IV. Discussion

D'après les données recueillies par l'équipe de M. Luc Sensébé, le miR-152 stimulerait la différenciation ostéoblastique des MSC en culture. Cet effet sur l'ostéoblastogenèse serait dû au ciblage par ce miRNA de PPARGC1A, un coactivateur de PPAR γ , le principal facteur de transcription de la voie de différenciation adipocytaire. Des expériences réalisées sur la lignée MG63 en culture ont montré que l'action du miR-152 sur la capacité des cellules à synthétiser de la matrice minéralisée dans un milieu ostéogénique était également visible sur une lignée d'OS. L'objectif de cette étude préliminaire était d'approfondir ces travaux, notamment en analysant l'impact du miR-152 sur la tumorigenèse d'OS en modèle murin, en lien avec le rôle présumé de ce miRNA dans la différenciation ostéoblastique.

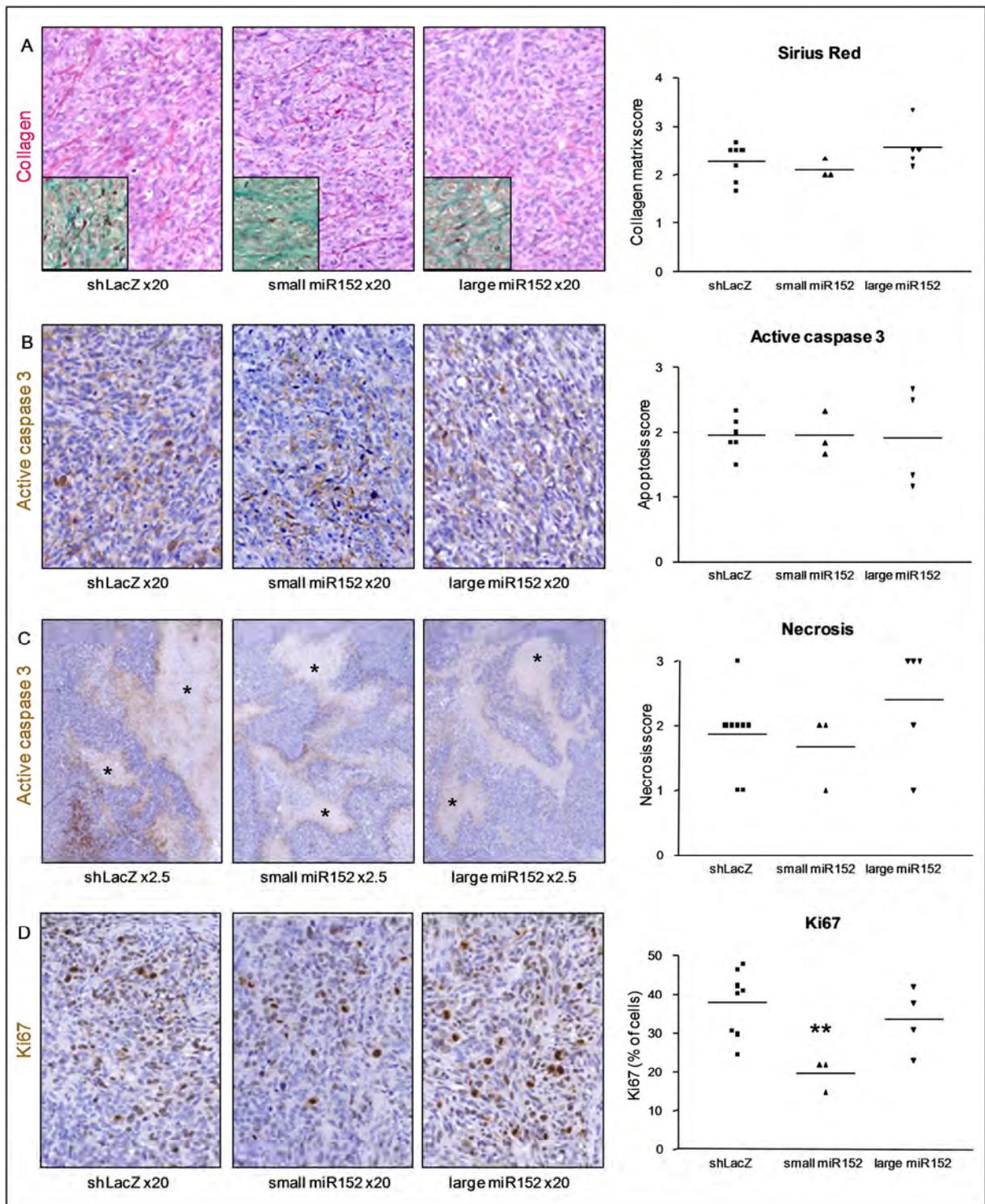


Figure 34 – Analyses histologiques réalisées sur les tumeurs HOS shLacZ et miR152 (première manipulation)

A. Révélation des fibres de collagène par la coloration au rouge Sirius
(encart : trichrome de Masson, même grossissement ; une image représentative par groupe).

Comparaison des scores collagène moyens attribués aux trois groupes.

B. Evaluation de l'apoptose par marquage immunohistochimique Caspase 3 active
(une image représentative par groupe).

Comparaison des scores apoptotiques moyens attribués aux trois groupes.

C. Identification des zones de nécrose (*) sur les lames histologiques marquées pour l'activité Caspase 3
(une image représentative par groupe).

Comparaison des scores nécrotiques moyens attribués aux trois groupes.

D. Evaluation de la prolifération cellulaire par marquage immunohistochimique Ki67
(une image représentative par groupe).

Comparaison du pourcentage moyen de cellules marquées dans des champs représentatifs de chaque groupe de tumeur.

Par transduction lentivirale, nous avons ainsi cherché à surexprimer le miR-152 dans trois lignées d'OS (deux humaines, une de rat). Si la transduction dans les cellules MG63 montrait une bonne efficacité, ces cellules exprimaient des taux basaux de miR-152 plus élevés qu'HOS et OSRGA, et la construction lentivirale lenti-miR-152 n'apportait pas de surexpression significative. Les cellules OSRGA transduites surexprimaient le miR-152, mais de façon moins importante que dans les cellules HOS transduites. De plus, la sélection des OSRGA-miR152 a abouti à une culture instable, avec une mortalité importante engendrant une diminution au cours du temps de la population surexprimant le miR-152. Plusieurs gènes cibles du miR-152 identifiés chez le rat par analyse DAVID sont impliqués dans la mort cellulaire et sont similaires à ceux prédits chez l'homme (tableau 7 et données non montrées). Cependant, les causes de la mort des cellules OSRGA-miR152 n'ont pas été clairement identifiées. Au final, seules les cellules HOS-miR152 ont été choisies comme modèle d'étude, en raison de l'efficacité de leur transduction reflétée par une surexpression significative et stable du miR-152.

Le miR-152 appartient à une famille de miRNA jouant un rôle dans la différenciation des MSC. L'analyse DAVID des cibles prédites du miR-152 humain a en effet mis en évidence des groupes de gènes impliqués dans la régulation de la différenciation mésenchymateuse, ainsi que dans les procédés métaboliques assurés par des cellules différenciés en ostéoblastes (développement osseux) ou en adipocytes (synthèse des acides gras). Cependant, les groupes les plus significatifs comprenaient des gènes intervenant dans de nombreux processus tumoraux, comme ceux codant pour des facteurs de transcription (voies TGF, Wnt, BMP...), ou encore pour des régulateurs de la mort cellulaire et du développement vasculaire. L'expression du miR-152 a en effet été décrite comme altérée dans de nombreux types de cancers (309), mais aucune étude à l'heure actuelle ne fait mention d'une telle altération et de ses conséquences dans les OS.

En culture standard (sans inducteur de différenciation), les cellules HOS-miR152 n'ont pas un comportement très différent des cellules HOS contrôle shLacZ. Leurs temps de doublement à 10 jours sont comparables, de même que leur sensibilité à des agents cytotoxiques. Le miR-152 n'induirait donc pas, dans ces cellules, de dérèglements des voies de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, aussi bien dans le sens d'une stimulation que d'une inhibition d'un processus tumoral. Par RT-qPCR, nous avons cependant pu montrer que la cible principale du miR-152, dont l'expression était significativement réprimée dans les

cellules HOS-miR152 en culture, était le coactivateur PPARGC1A. En revanche, l'expression de cibles impliquées dans la tumorigenèse, comme des gènes codant pour le TGF- β 2 ou SMAD2, ou de l'oncogène *MET* ne semble pas affectée. De même, le miR-152 dans les HOS n'interviendrait pas dans la régulation transcriptionnelle de la différenciation chondrocytaire (116), via un blocage de l'expression d'autres cibles prédites, comme *COL2A1*, *COL10A1* ou *MMP13*. Ce résultat nous conforte donc dans notre hypothèse de départ selon laquelle le miR-152 dans les OS interviendrait majoritairement sur l'équilibre entre différenciation adipocytaire et ostéoblastique.

Nous n'avons pas cultivé ces cellules en culots 3D et milieu chondrogénique ou en milieu adipogénique mais après une semaine de culture dans un milieu ostéogénique, les HOS-miR152 ne surexprimaient aucun marqueur de la différenciation ostéoblastique. Ces résultats sont contradictoires avec ceux observés par l'équipe de M. Luc Sensébé, où la surexpression du miR-152 dans la lignée MG63 induisait l'expression de RUNX2 et d'ALP dans des conditions ostéogéniques, ce qui se traduisait par une production de matrice minéralisée *in vitro* plus efficace. Pour nous rapprocher des conditions expérimentales de l'équipe de Toulouse, nous avons ajouté l'inducteur BMP4 dans notre milieu ostéogénique, mais cela n'a pas provoqué de changements significatifs de l'expression des marqueurs ostéoblastiques (données non montrées). En outre, les cellules HOS ne synthétisant pas de matrice minéralisée dans nos conditions d'ostéoblastogenèse, il est difficile de conclure avec ces données sur l'effet du miR-152 sur la différenciation ostéoblastique des lignées d'OS. De futures expériences devront être réalisées avec un modèle d'OS plus susceptible de minéraliser en culture comme OSRGA, dont la transduction lentivirale avec le lenti-miR-152 s'est révélée trop inefficace pour pouvoir être utilisée.

D'après nos résultats, la surexpression du miR-152 dans la lignée HOS aurait peu d'effet sur les propriétés de ces cellules en culture. En revanche, suite à des injections intramusculaires paratibiales en souris Nude, les groupes d'animaux injectés avec les cellules HOS miR-152 dans le cadre de deux manipulations indépendantes ont montré une hétérogénéité frappante dans l'évolution des volumes tumoraux, et nous avons analysé ces tumeurs en les divisant en deux groupes, selon leur taille (« small » et « large miR152 »). Cette différence dans la croissance des tumeurs n'est cependant pas corrélée à l'expression du miR-152, les deux groupes de tumeurs présentant des niveaux moyens d'expression équivalents. D'autre part, les petites tumeurs miR152 ne présentaient aucune métastase pulmonaire contrairement aux grosses tumeurs miR152 et aux tumeurs HOS témoins, mais

cela pourrait refléter davantage leur développement ralenti qu'un effet réel du miR-152 sur l'invasion tumorale.

Comme d'autres cellules tumorales susceptibles de rentrer en contact avec le tissu osseux, telles que les cellules métastatiques de cancers de la prostate ou du sein (325), les cellules d'OS produisent elles-mêmes ou stimulent la production de RANKL par les ostéoblastes. RANKL va ensuite activer l'ostéoclastogenèse en se liant au récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques. La dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes actifs va libérer des facteurs de croissance comme le TGF- β ou l'IGF, qui vont stimuler à leur tour la prolifération tumorale : on parle ainsi du cercle vicieux de l'ostéolyse tumorale (326). L'agressivité des OS étant souvent liée à leur activité ostéolytique, nous avons voulu déterminer les effets du miR-152 sur les atteintes osseuses dans le modèle HOS murin. En comparant les structures 3D des tibias d'animaux des groupes shLacZ et miR152, nous n'avons pas constaté de différence dans le degré d'ostéolyse, à volume tumoral équivalent. Peu d'ostéoclastes TRAP⁺ ont été observés dans les tumeurs shLacZ et miR152, vraisemblablement en raison d'un sacrifice trop tardif des animaux, après le pic ostéolytique. De manière intéressante, toutes les tumeurs miR152 exprimaient plus faiblement RANKL mais également son inhibiteur OPG, si bien que leur ratio moyen RANKL/OPG était au final proche de celui des tumeurs HOS contrôles. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent donc que si les tibias des animaux du groupe « small miR152 » présentaient beaucoup moins d'atteintes osseuses que ceux des tumeurs shLacZ, il s'agit vraisemblablement d'une conséquence d'un développement tumoral plus faible. Des analyses complémentaires, notamment à des temps plus précoces, sont cependant nécessaires afin de s'assurer que le miR-152 n'a pas d'effet direct sur l'ostéolyse tumorale.

D'après nos observations, il semblerait que le miR-152 dans les tumeurs HOS affecterait directement l'expression du facteur de transcription PPAR γ , ce qui pourrait bloquer l'adipogenèse et donc l'expression des marqueurs de la différenciation adipocytaire comme FABP4. Nous n'avons cependant aucune explication au fait que l'expression de PPARGC1A ne soit pas inhibé *in vivo*, contrairement aux cellules en culture. La forte expression du facteur pro-angiogénique VEGFA dans les tumeurs miR152 pourrait également être liée à une inhibition de l'expression de PPAR γ , qui aurait un rôle dans la régulation positive ou négative de l'angiogenèse dans de nombreux types de cancers (327,328).

Les deux groupes de tumeurs miR152 « small » et « large » diffèrent par leur expression des marqueurs de la différenciation ostéoblastique. En effet, les grosses tumeurs miR152 se

distinguent par une surexpression de *COLL1*, ce qui pourrait être un indice d'une différenciation ostéoblastique plus importante. Les petites tumeurs miR152 présentent les signes d'une différenciation ostéoblastique encore plus avancée, avec une expression de *BSP* et surtout du marqueur ostéocytaire *SOST* plus fortes que dans les tumeurs contrôles et les grosses tumeurs miR152. La surexpression du miR-152 dans un modèle animal d'OS semble ainsi avoir des conséquences sur la différenciation qui n'apparaissent pas en culture cellulaire, même dans nos conditions ostéogéniques. Cependant, les analyses histologiques des tumeurs HOS n'ont pas mis en évidence de différence en termes de synthèse de matrice osseuse collagénique. Cela contredit les résultats de l'analyse d'expression des marqueurs ostéoblastiques, avec notamment une plus forte expression de *COLL1* dans les grosses tumeurs miR152. Des analyses plus spécifiques de l'expression protéique des différents marqueurs ostéoblastiques et ostéocytaires seront nécessaires afin d'aller plus avant dans le phénotypage de ces tumeurs.

Le miR-152 n'a pas non plus affecté l'activité apoptotique des cellules tumorales et n'a pas modifié l'importante nécrose de la partie centrale des tumeurs, indice de leur expansion avancée au moment du sacrifice des animaux. En revanche, le marquage immunohistochimique Ki67 a révélé une diminution significative de la prolifération dans les petites tumeurs miR152 par rapport aux tumeurs contrôle ainsi qu'aux grosses tumeurs miR152. Ce ralentissement de prolifération pourrait être la conséquence d'une différenciation ostéoblastique/ostéocytaire plus avancée, les ostéoblastes et ostéocytes étant reconnus pour avoir une activité de prolifération très ralentie (7). Cependant, nous ne pouvons pas exclure le phénomène inverse à savoir que le miR152 cible directement un gène impliqué dans le cycle cellulaire (par exemple *E2F3*, *FOSB* ou *IGF1*, tableau 7), avec pour conséquence une stimulation de la différenciation ostéoblastique.

Si les effets de la surexpression du miR-152 dans la lignée HOS ne sont pas visibles en culture, l'injection de ces cellules chez l'animal fait apparaître d'importantes variations du développement tumoral, qui peut s'accélérer ou au contraire ralentir drastiquement. Les causes de cette hétérogénéité sont pour le moment difficiles à définir, des mécanismes d'échappement ou de résistance aux effets anti-cancéreux du miR-152 étant possibles dans les grosses tumeurs miR-152. Cette étude préliminaire suggère qu'il existe des liens entre la stimulation de la différenciation ostéoblastique par le miR-152, le blocage de la voie adipocytaire médiée par *PPAR γ* et l'inhibition de la prolifération tumorale. Une meilleure

compréhension des mécanismes d'action du miR-152 devrait nous permettre de mieux comprendre également les causes de cette hétérogénéité dans le développement tumoral. Compte tenu de la grande variété de processus biologiques dans lesquels interviennent les gènes cibles du miR-152, il est en effet probable que l'aspect « différenciation » ne soit pas le seul responsable de cette différence de taille entre plusieurs tumeurs d'un même groupe.

CONCLUSION

GENERALE

Il est aujourd'hui établi que l'apparition de TOP malignes est la conséquence de dérèglements majeurs des voies de différenciation des MSC. Les OS, issus de cellules engagées dans la voie ostéoblastique, et les CS de cellules chondrocytaires ont subi durant leur développement d'importants remaniements cytogénétiques qui provoquent de nombreuses anomalies génétiques, engendrant ainsi l'initiation d'un processus de tumorigenèse. Le degré de différenciation variable des OS et des CS conditionne fortement leurs propriétés tumorales, des cellules plus spécialisées étant moins susceptibles de se diviser rapidement. Ces tumeurs ont ainsi la particularité de présenter une grande variabilité en termes de localisation, d'agressivité et par conséquent de résistance aux traitements, ce qui pose aux cliniciens une grande difficulté quant à la prise en charge des patients atteints par ces pathologies. L'avancée dans ce domaine est néanmoins considérablement freinée par le nombre insuffisant de modèles cellulaires et animaux disponibles pour mieux appréhender les mécanismes moléculaires de ces cancers et mettre au point des thérapies plus efficaces. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier le lien entre la différenciation des CS et des OS et leur degré d'agressivité, qui se traduit notamment par leur prolifération et leur capacité à résister à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques.

Ces travaux se sont déroulés dans le cadre du projet BCS, visant à établir de nouvelles lignées tumorales à partir de biopsies de patients atteints de TOP pour pallier au manque de modèles d'étude de ces pathologies. Par culture directe ou via une étape de transplantation chez la souris immunodéprimée, ce sont ainsi près de 30 biopsies d'OS, de CS et d'ES qui ont été utilisées pour les besoins de ce projet impliquant plusieurs secteurs du CHU de Nantes, le laboratoire LPRO-INSERM UMR957 et la société privée Atlantic Bone Screen. Cependant, la complexité d'un environnement propice au développement cellulaire des TOP est difficile à reconstruire en culture cellulaire, et à l'issue de ces travaux seuls trois lignées de CS et deux modèles murins de xénogreffe (un modèle d'OS et un modèle de CS) ont pu être établis. En complément de leurs propriétés phénotypiques mésenchymateuses et de l'étude de leur tumorigenicité chez l'animal, la caractérisation génétique des trois lignées obtenues à partir de biopsies de CS fait état d'anomalies fréquemment rencontrées dans ces pathologies, telles que des mutations (TP53, IDH1/2), des amplifications (MDM2) ou délétions (CDKN2A) de locus chromosomiques. De telles aberrations sont souvent la conséquence de divers réarrangements génétiques aboutissant à des caryotypes anormaux, qui apportent la preuve de la nature tumorale de ces lignées. A titre d'exemple, la formule du caryotype attribuée visuellement aux cellules tumorales BCSC34, obtenues à partir d'une biopsie de CS conventionnel central de

grade III, reflète cette instabilité génétique avec de nombreux chromosomes sur-numéraires et une translocation entre un chromosome 1 et un chromosome 10 : 62, X, +1, +2, +3, +5, +5, +7, +7, +8, +10, +12, +17, +19, +20, +20, +21, +22, +22, t(1;10)(p34;p14).

Les CS représentent un sous-type de TOP peu vascularisé et formateur de cartilage. Ces tumeurs sont à l'heure actuelle uniquement traitées par chirurgie, en raison de leur résistance à la radiothérapie et aux traitements de chimiothérapie classiques. Les mécanismes de leur chimiorésistance font l'objet d'un débat controversé parmi les cliniciens et les équipes de recherche, et pourraient trouver leur origine au niveau des cellules de CS elles-mêmes ainsi que dans leur environnement cartilagineux. Nous avons donc utilisé les nouveaux modèles de CS de haut grade établis durant le projet BCS, en complément avec des lignées de référence, pour étudier les modalités de leur résistance à trois agents de chimiothérapie fréquemment utilisés : le MAF, le CIS et la DOX. En culture cellulaire classique, les cellules de CS répondent aussi favorablement à ces trois drogues que des lignées d'OS et d'ES, tumeurs traitées habituellement par ces agents cytotoxiques. Cependant, la culture en monocouche de cellules de CS provoque la perte de l'expression des marqueurs des chondrocytes, tels que COLL2, COMP et l'ACAN, fortement exprimés dans les tumeurs d'origine.

En utilisant le procédé de différenciation chondrocytaire *in-vitro* par culture de culots cellulaires de haute densité dans un milieu chondrogénique, nous avons été capables de permettre à ces cellules indifférenciées d'exprimer à nouveau les gènes responsables de la synthèse de matrice cartilagineuse, et donc de restaurer leur principale propriété phénotypique en environnement osseux. Ces culots cellulaires chondrogéniques présentaient de plus de faibles niveaux d'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par rapport aux cellules de CS en culture et de manière comparable à des biopsies de CS. Pour ces deux raisons, ce modèle de cellules de CS différenciées en chondrocytes sous forme de culots apparaît plus pertinent pour étudier les mécanismes moléculaires des CS que la culture cellulaire classique en monocouche, qui provoque la perte des propriétés originelles des tumeurs dans leur environnement.

Ces culots chondrogéniques de CS sont en outre capables de résister à de faibles doses de MAF et de DOX, suffisantes pourtant pour induire la mortalité dans les cultures classiques des mêmes cellules ainsi que dans des culots ne présentant pas de matrice cartilagineuse. Dans le cas de la DOX, naturellement fluorescente, nous avons en effet constaté une accumulation intranucléaire de la drogue bien plus faible dans les culots chondrogéniques de la lignée de CS

dédifférencié BCSC03 que dans des culots cultivés dans un milieu standard. La matrice cartilagineuse des culots chondrogéniques a donc constitué une barrière à la diffusion du MAF et de la DOX, qui sont des drogues hydrophobes, mais n'a pas freiné le passage d'un agent hydrophile comme le CIS.

Ces résultats mettent ainsi en évidence le rôle crucial de l'environnement cartilagineux des CS dans leur chimiorésistance, amplifiée par des mécanismes cellulaires intrinsèques préalablement identifiés comme leur faible taux de prolifération, l'efflux de drogues induit par des transporteurs ABC comme la Pgp (211) ou une protection contre l'apoptose procurée par une forte activité des protéines antiapoptotiques comme BCL2 ou les IAPs (218) (figure 35). Cependant, le modèle de culot chondrogénique n'est pas utilisable pour toutes les lignées de CS et ne permet pas de récapituler l'ensemble des paramètres pouvant influencer sur leur chimiorésistance, telle que leur faible vascularisation (224). Des études ultérieures devront intégrer des traitements de modèles animaux à différents agents de chimiothérapie.

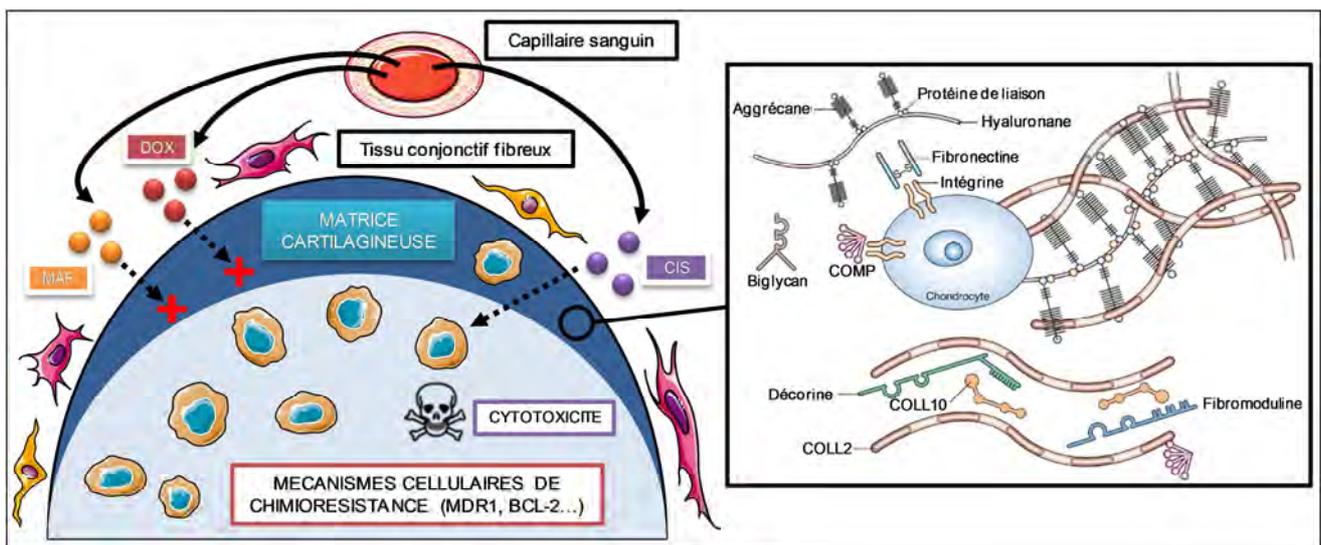


Figure 35 – Rôle central de la matrice cartilagineuse des chondrosarcomes dans leur mécanisme de chimiorésistance (adapté de (329))

La première partie de cette thèse indique ainsi que le degré de différenciation des CS jouerait un rôle crucial dans leur capacité à résister aux traitements. Des tumeurs bien différenciées présentent en effet une importante quantité de matrice cartilagineuse néo-synthétisée, qui constituerait un frein à la diffusion de la plupart des traitements chimiothérapeutiques. A l'inverse, les CS dédifférenciés et de haut grade, plus cellulaires et plus agressifs, montreraient une meilleure accessibilité aux drogues de chimiothérapie en raison de leur caractère cartilagineux moins marqué. Leur chimiorésistance serait alors principalement due à des dérégulations intrinsèques aux cellules, comme la surexpression de

transporteurs ABC ou de protéines anti-apoptotiques. Pour les CS dédifférenciés, il faut aussi considérer qu'ils comportent des régions à forte cellularité et peu de matrice cartilagineuse mais également des régions bien différenciées cartilagineuses où les cellules tumorales chondrocytaires pourraient être protégées des agents de chimiothérapie. La réponse de telles tumeurs hétérogènes aux traitements de chimiothérapie serait alors elle-même très variable selon la région considérée. De plus, la récente découverte de mutations somatiques du gène *COL2A1* dans les CS indique une altération de la maturation des fibres de *COLL2* dans ces tumeurs (193), ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'organisation moléculaire de leur matrice extracellulaire cartilagineuse. En modifiant les interactions entre les différents composants du cartilage entourant les cellules tumorales, il est possible que de telles anomalies structurales contribuent à la mauvaise diffusion des drogues jusqu'à leur cible et donc à la chimiorésistance des CS (figure 35).

S'il s'avère que la faible sensibilité des CS aux agents de chimiothérapie est principalement due à leur incapacité à diffuser à travers la matrice cartilagineuse, de nouvelles thérapies devront être mises au point pour outrepasser ce phénomène. En dehors de la recherche d'agents hydrophiles diffusant potentiellement plus facilement dans le cartilage comme le CIS, l'une des pistes envisagées est la modification chimique directe des drogues pour créer des interactions entre les agents cytotoxiques et des composants spécifiques de la matrice cartilagineuse. Les molécules ainsi modifiées seraient moins susceptibles d'être exclues à l'extérieur de la MEC, et par conséquent diffuseraient beaucoup plus facilement jusqu'aux cellules tumorales de CS. En associant un groupe ammonium quaternaire au melphalan, Peyrode et ses collaborateurs ont ainsi été capables d'augmenter l'affinité de cet agent alkylant pour les protéoglycanes du cartilage, ce qui a eu pour effet d'améliorer son efficacité anti-tumorale (330). D'autres chercheurs utilisent ces interactions pour mettre au point de nouveaux moyens d'administration des agents de chimiothérapie plus efficaces que la voie intraveineuse. Une étude réalisée en 1994 par une équipe de Nagoya a montré par exemple que l'implantation de DOX incorporée dans des particules d'hydroxyapatite *in silico* dans des tumeurs du modèle de CS de rat SRC a amélioré son effet anti-cancéreux (331). En utilisant les propriétés de l'environnement cartilagineux et en améliorant la biodistribution des agents de chimiothérapie, de nouveaux types de thérapies adjuvantes ciblées pourraient ainsi améliorer l'accessibilité des agents de chimiothérapie aux cellules tumorales et augmenter leur efficacité pour le traitement des CS.

Chez les OS, les tumeurs les plus difficiles à traiter présentent des grades élevés souvent liés à un risque métastatique accru, en particulier au niveau du poumon. La capacité d'une tumeur à produire de l'ostéoïde en quantité importante est ainsi considérée comme un facteur de bon pronostic, et à l'inverse une tumeur fortement cellularisée produisant peu de matrice, et donc moins différenciée, est considérée comme plus difficile à traiter. De nouveaux types de thérapies ciblées des OS pourraient alors stimuler directement leur différenciation dans le but de limiter leur agressivité en réduisant significativement leur prolifération et leur invasion et donc améliorer les taux de survie des patients.

De nombreux miRNA ont été identifiés ces dernières années comme agissant sur la différenciation des MSC, via le ciblage de gènes codant pour des facteurs de transcription intervenant dans la régulation des différentes voies mésenchymateuses (306). Les équipes du programme MoDICSOME ont ainsi observé que le miR-152 était surexprimé lors de l'ostéoblastogenèse des MSC. De plus, la surexpression de ce miRNA induite par transduction lentivirale dans des MSC et dans la lignée d'OS MG63 augmentait leur capacité de minéralisation en culture et donc leur degré de différenciation. La cible privilégiée du miR-152 serait PPARGCA1, un co-activateur de PPAR γ , le facteur de transcription principal de l'adipogenèse qui intervient également de façon importante dans la régulation de l'ostéoblastogenèse (332).

Nous avons donc cherché à étudier les effets d'une surexpression du miR-152 sur le modèle HOS, et en particulier sur sa tumorigénicité chez l'animal. Si ce miRNA est capable de stimuler la différenciation des OS en inhibant la voie de différenciation adipocytaire, il est en effet possible qu'il agisse sur leur agressivité. Les résultats de cette étude préliminaire, rapportés dans la deuxième partie de cette thèse, ne mettent pas en évidence d'effet du miR-152 sur la différenciation ostéoblastique des HOS en culture, ni sur leur prolifération ou leur sensibilité à la chimiothérapie. Cependant, l'injection en site osseux de cellules HOS surexprimant le miR-152 provoque une hétérogénéité dans le développement tumoral au sein d'un même groupe d'animaux, aboutissant à la formation de tumeurs volumineuses et se développant rapidement (11/16) et de petites tumeurs à l'évolution lente (5/16). En conséquence de ce développement plus lent, la surexpression du miR-152 a réduit le potentiel métastatique et les propriétés ostéolytiques d'un tiers des tumeurs HOS. L'analyse de ces tumeurs montre qu'elles ne diffèrent pas par leur capacité à surexprimer le miR-152, mais qu'elles présentent néanmoins des profils d'expression des marqueurs ostéoblastiques distincts. Ainsi, les petites tumeurs semblent avoir atteint un degré de différenciation plus

avancé et expriment des marqueurs plus tardifs comme le marqueur ostéocytaire SOST, ce qui paraît corrélér avec leur développement atténué. Cependant, les analyses histologiques ne montrent pas de synthèse d'ostéoïde plus importante. Par ailleurs, la différence majeure entre ces deux types de tumeurs HOS miR152 ne réside pas dans leur résistance à l'apoptose mais dans leur vitesse de prolifération, comme l'attestent les marquages immunohistochimiques Caspase 3 active et Ki67.

Il est possible que les petites tumeurs se soient moins développées en raison d'une différenciation plus avancée, mais d'autres expérimentations sont nécessaires afin de compléter cette étude. De prochaines manipulations d'injection des HOS miR152 chez l'animal devront être stoppées à des temps plus précoces, afin de pouvoir analyser l'ostéolyse tumorale à volume équivalent et pour limiter la nécrose de la partie centrale des tumeurs qui peut altérer le résultat des analyses histologiques. Il sera alors intéressant de vérifier de nouveau l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastiques précoces et tardifs par RT-PCR quantitative mais aussi par immunohistochimie.

Quoi qu'il en soit, ces résultats préliminaires indiquent clairement qu'un traitement anticancéreux par surexpression du miR-152 dans les cellules HOS n'est efficace que dans 1/3 des tumeurs. Une majorité des tumeurs miR152 ne présentent en effet que peu de modification phénotypique (augmentation de l'expression du *COLL1* par exemple), les marqueurs de prolifération et d'apoptose étant tout à fait normaux, alors que les volumes tumoraux sont même supérieurs aux tumeurs contrôles. Des mécanismes d'échappement ou de résistance au miR-152 sont bien sûr envisagés, suite à des modifications génétiques ou épigénétiques de certains gènes dans ces tumeurs, mais là encore une meilleure compréhension du mode d'action de ce miRNA est nécessaire. Si *PPARGCA1* ou *PPARG* sont les gènes cibles principaux du miR-152 (leur expression est effectivement réduite en culture ou *in vivo* dans toutes les tumeurs petites ou grosses), la résistance au miR-152 trouverait par conséquent son origine au niveau d'un défaut de différenciation ostéoblastique, qui serait insuffisante dans 2/3 des tumeurs. Cette hypothèse serait alors confortée par les publications qui font état d'anomalies génétiques ou épigénétiques qui limitent la différenciation ostéoblastique dans les OS (333,334). Par exemple, RB a un rôle-clé dans ces mécanismes, et permet à la cellule d'inhiber PPAR γ et l'adipogenèse tout en potentialisant RUNX2 et l'ostéogenèse (335). L'inactivation de RB dans les OS aurait alors un rôle délétère sur l'ostéogenèse même si l'adipogenèse était inhibée par le miR-152. Il est en outre possible que les cellules HOS en culture, caractérisées par une RB non-mutée et active, comprennent

une sous-population de cellules possédant d'autres altérations provoquant une dérégulation de l'expression ou de l'activité de RUNX2, en touchant par exemple les CDK ou d'autres protéines régulatrices du cycle cellulaire (336,337) (figure 36).

Comme d'autres lignées d'OS, la lignée MNNG-HOS présente un défaut de différenciation terminale, et n'est pas capable de synthétiser de la matrice minéralisée en culture (258) (tableau 1) . Les tumeurs obtenues par injection para-osseuse de ces cellules en modèle murin présentent peu de zones ostéoïdes et rappellent les tumeurs d'OS de haut grade. Des dysfonctionnements de la voie de synthèse de la MEC osseuse, causés par exemple par des mutations des gènes codant pour l'enzyme ALP ou le COLL1, pourraient expliquer la mauvaise qualité de l'ostéoïde synthétisé dans les tumeurs HOS. L'effet du miR-152 sur la différenciation ostéoblastique ne se traduirait donc pas par une production plus importante d'ostéoïde et ne serait donc pas directement visible grâce des colorations histologiques telles que le trichrome de Masson ou le Rouge Sirius.

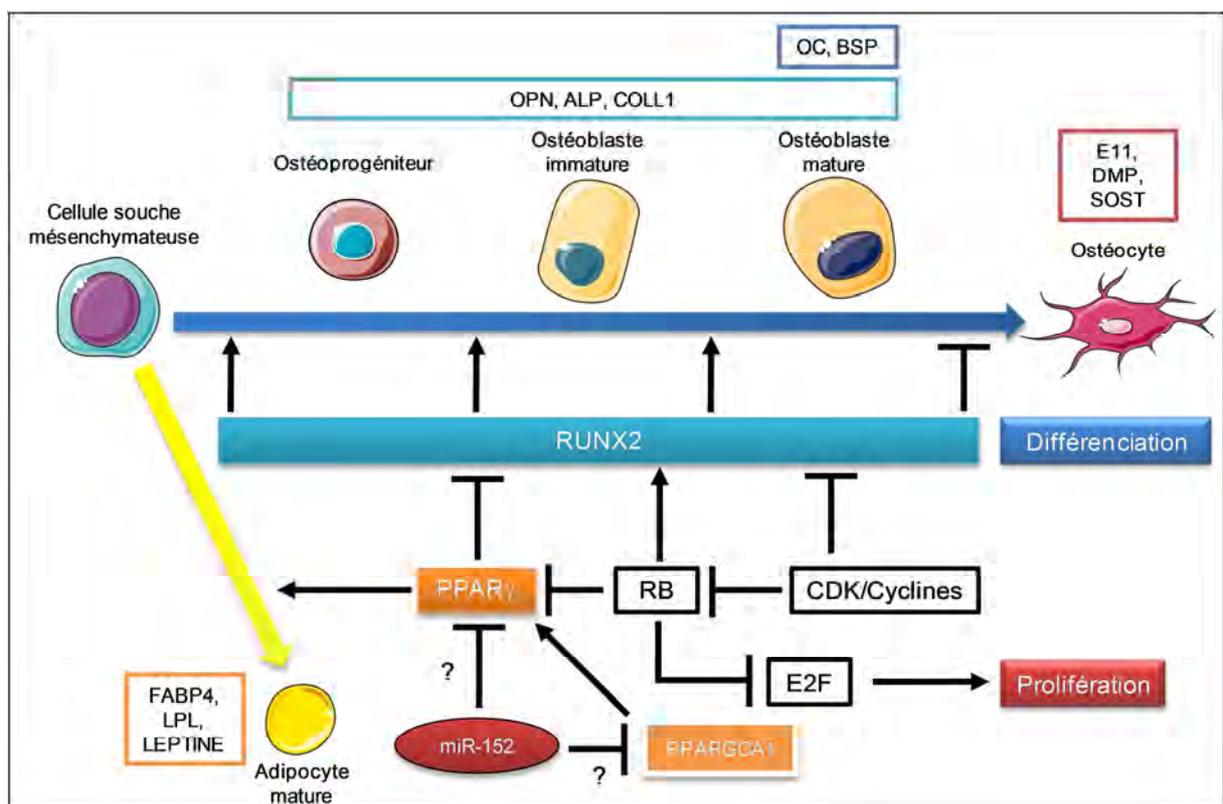


Figure 36 – Mode d'action hypothétique du miR-152 sur l'ostéoblastogenèse et connexion avec les voies de régulation de RUNX2 et PPAR γ (adapté de (66,93,192,337))

Cette étude préliminaire indique qu'une thérapie de différenciation des OS utilisant le miR-152 serait peu efficace, avec seulement une chance de succès sur trois. Pour améliorer ce rendement, il sera tout d'abord impératif de mieux comprendre le mécanisme d'action de ce miRNA, particulièrement en déterminant si sa cible est réellement la voie de différenciation

adipocytaire via PPARG ou son coactivateur PPARGCA1. Cela pourra par exemple être vérifié en utilisant des constructions couplant la séquence 3'UTR des ARNm codant pour ces deux protéines à la luciférase. S'il s'avère que PPARG est identifié comme cible majoritaire du miR-152, son effet sur la différenciation du modèle HOS devra être vérifié *in vivo*, en déterminant notamment si l'administration d'inhibiteurs de PPARG provoque les mêmes ralentissements de développement tumoral que dans les groupes HOS miR152. Il serait également intéressant d'essayer d'augmenter l'efficacité du miR-152 sur la différenciation des OS par traitement d'animaux HOS miR152 avec des inducteurs de l'ostéoblastogenèse comme la vitamine D3 ou la PTH. D'autre part, l'analyse du phénotype des tumeurs HOS miR152 devra être approfondie, notamment en termes de synthèse protéique par Western-blot et immunohistochimie.

Le degré de différenciation des TOP a ainsi une incidence sur leur comportement, qui se répercute directement sur leur réponse aux traitements. Dans le cas des CS, une différenciation chondrocytaire plus avancée, favorisée par des conditions hypoxiques réduisant la prolifération des cellules tumorales, engendre la synthèse d'une matrice cartilagineuse dense qui constituerait une barrière aux agents de chimiothérapie, contribuant par conséquent de façon importante à leur chimiorésistance. Il sera donc nécessaire de surpasser cette protection physique pour traiter efficacement ces tumeurs réfractaires à la chimiothérapie, par la mise au point de nouvelles thérapies ou la modification chimique de drogues déjà existantes de manière à favoriser leur diffusion à travers le cartilage. D'un autre côté, les OS prolifèrent très souvent trop rapidement pour permettre une réelle différenciation, ce qui pourrait expliquer leurs phénotypes variés et leur grande capacité d'invasion. En améliorant notre connaissance des mécanismes d'action des miRNA et de leur implication dans la régulation de la différenciation des MSC ainsi que leurs moyens d'administration thérapeutique pour une application clinique chez l'homme, nous serons peut-être à l'avenir en mesure de les utiliser afin de limiter leur prolifération et leur potentiel métastatique, dans le but de faciliter leur élimination par chimiothérapie.

Références bibliographiques

1. Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Bone Tissue : morphology, growth and modeling. *Ann Médecine Vétérinaire*. 2004;148(1):1-13.
2. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med*. 2010;61(1):91-104.
3. Booth SL, Centi A, Smith SR, Gundberg C. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nat Rev Endocrinol*. janv 2013;9(1):43-55.
4. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S. The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumatol*. nov 2012;8(11):674-683.
5. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol*. janv 2012;9(1):11-19.
6. Heymann D, Lepreux S. Le tissu osseux. *Histol Bases Fondam*. Omniscience.
7. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. janv 2006;235(1):176-190.
8. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. avr 2000;21(2):115-137.
9. 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 Off J Am Soc Bone Miner Res*. oct 2000;15(10):1879-1888.
10. Malaval L, Aubin JE, Vico L. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling. *Osteoporos Int*. 2009 Jun;20(6):1077-80.
11. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. mars 1991;45(3):292-302.
12. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 15 mai 2008;473(2):201-209.
13. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. oct 2008;19(5):444-451.
14. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010 Sep;21(9):1457-69.
15. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. août 1995;17(2 Suppl):87S-91S.

16. Rousselle A-V, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. avr 2002;30(4):533-540.
17. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 25 août 1989;245(4920):855-857.
18. Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech*. 1 févr 1996;33(2):171-181.
19. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* [Internet]. juin 2013 [cité 10 juill 2013];228(6):1149-1153. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23139068>
20. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of Osteopontin in Cellular Signaling and Toxicant Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41(1):723-49.
21. Boskey AL, Christensen B, Taleb H, Sørensen ES. Post-translational modification of osteopontin: Effects on in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 mars 2012;419(2):333-338.
22. Fujisawa R, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2012;17:1891-1903.
23. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop*. mai 1995;(314):266-280.
24. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi*. févr 2010;77(1):4-12.
25. Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*. 1 nov 2002;16(21):2813-2828.
26. Bovée JV, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. juill 2010;10(7):481-488.
27. Tiet TD, Alman BA. Developmental pathways in musculoskeletal neoplasia: involvement of the Indian Hedgehog-parathyroid hormone-related protein pathway. *Pediatr Res*. avr 2003;53(4):539-543.
28. Koziel L, Wuelling M, Schneider S, Vortkamp A. Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation. *Dev Camb Engl*. déc 2005;132(23):5249-5260.
29. Adams SL, Cohen AJ, Lassová L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol*. 2007;213(3):635-41.

30. 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*. 17 avr 1998;93(2):165-176.
31. 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*. 31 mars 1998;95(7):3597-3602.
32. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 15 mai 2003;423(6937):337-342.
33. Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. juill 2000;85(7):2355-2363.
34. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology*. nov 1998;139(11):4743-4746.
35. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1 mai 1998;12(9):1260-1268.
36. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 21 août 2000;192(4):463-474.
37. Lee S-K, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone*. juill 2002;31(1):252-259.
38. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. déc 2001;142(12):5050-5055.
39. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*. nov 2003;163(5):2021-2031.
40. Dennis JE, Charbord P. Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma. *STEM CELLS*. 2002;20(3):205-14.
41. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation. *Cell [Internet]*. 29 juin 2007;129(7):1377-1388.

42. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
43. Bühring H-J, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106(1):262-71.
44. Watson JT, Foo T, Wu J, Moed BR, Thorpe M, Schon L, et al. CD271 as a Marker for Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow versus Umbilical Cord Blood. *Cells Tissues Organs*. 2013;197(6):496-504.
45. Bassi G, Pacelli L, Carusone R, Zanoncello J, Krampera M. Adipose-derived stromal cells (ASCs). *Transfus Apher Sci*. oct 2012;47(2):193-198.
46. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 19 oct 2007;131(2):324-336.
47. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 11 sept 2008;3(3):301-313.
48. Bouacida A, Rosset P, Trichet V, Guilloton F, Espagnol N, Cordonier T, et al. Pericyte-Like Progenitors Show High Immaturity and Engraftment Potential as Compared with Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*. 7 nov 2012;7(11):e48648.
49. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2012;5:19.
50. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 juill 2003;100(14):8407-8411.
51. Liu Y, Yan X, Sun Z, Chen B, Han Q, Li J, et al. Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev*. oct 2007;16(5):695-706.
52. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Dev Camb Engl*. déc 2001;128(24):5181-5188.
53. Chen G, Wang Y, Xu Z, Fang F, Xu R, Wang Y, et al. Neural stem cell-like cells derived from autologous bone mesenchymal stem cells for the treatment of patients with cerebral palsy. *J Transl Med*. 2013;11:21.
54. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PloS One*. 2007;2(9):e941.

55. Milwid JM, Ichimura T, Li M, Jiao Y, Lee J, Yarmush JS, et al. Secreted factors from bone marrow stromal cells upregulate IL-10 and reverse acute kidney injury. *Stem Cells Int.* 2012;2012:392050.
56. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell.* 3 oct 2013;13(4):392-402.
57. 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.* 1 févr 2001;344(5):385-386.
58. Faundez AA, Taylor S, Kaelin AJ. Instrumented fusion of thoracolumbar fracture with type I mineralized collagen matrix combined with autogenous bone marrow as a bone graft substitute: a four-case report. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc.* oct 2006;15 Suppl 5:630-635.
59. Gimbel M, Ashley RK, Sisodia M, Gabbay JS, Wasson KL, Heller J, et al. Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. *J Craniofac Surg.* juill 2007;18(4):895-901.
60. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical Efficacy of the Microfracture Technique for Articular Cartilage Repair in the Knee An Evidence-Based Systematic Analysis. *Am J Sports Med.* 10 janv 2009;37(10):2053-2063.
61. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A.* 2013;83A(1):48-61.
62. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 30 mai 1997;89(5):747-754.
63. Choi JY, Pratap J, Javed A, Zaidi SK, Xing L, Balint E, et al. Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is essential for tissue-specific differentiation during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 juill 2001;98(15):8650-8655.
64. Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, et al. Ectopic *Msx2* overexpression inhibits and *Msx2* antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol.* 15 mai 1999;209(2):298-307.
65. Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins *Msx2* and *Dlx5*. *Biochemistry (Mosc).* 17 nov 1998;37(46):16360-16368.
66. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 15 mai 2008;473(2):98-105.
67. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11 janv 2002;108(1):17-29.

68. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med.* août 2005;11(8):880-885.
69. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 30 avr 2004;117(3):387-398.
70. Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem.* 2 sept 2005;280(35):30689-30696.
71. 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.* juin 2006;26(12):4539-4552.
72. Kneissel M. The promise of sclerostin inhibition for the treatment of osteoporosis. *IBMS BoneKEy.* juill 2009;6(7):259-264.
73. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol.* avr 1997;17(4):2336-2346.
74. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem.* 14 avr 2000;275(15):10738-10744.
75. Liu C, Zhang Y, Xu K, Parsons D, Alfonso D, Di Cesare PE. Transcriptional activation of cartilage oligomeric matrix protein by Sox9, Sox5, and Sox6 transcription factors and CBP/p300 coactivators. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2007;12:3899-3910.
76. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1 oct 1998;17(19):5718-5733.
77. Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol.* 1 mai 2002;245(1):95-108.
78. Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* sept 2005;75(3):200-212.
79. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* mai 2008;58(5):1377-1388.
80. Studer D, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012;24:118-135.
81. Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 19 oct 2007;131(2):242-256.

82. Enerbäck S. The Origins of Brown Adipose Tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-2023.
83. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 8 janv 2007;293(2):E444-E452.
84. Ahmadian M, Wang Y, Sul HS. Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* mai 2010;42(5):555-559.
85. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-736.
86. Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem.* 25 oct 1993;268(30):22243-22246.
87. Huang H, Song T-J, Li X, Hu L, He Q, Liu M, et al. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 2009;106(31):12670-12675.
88. Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci.* juin 2001;114(Pt 11):2085-2094.
89. Bowers RR, Lane MD. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. *Cell Cycle Georget Tex.* 1 mai 2008;7(9):1191-1196.
90. Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 1 sept 1999;13(17):2231-2241.
91. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2006;7(12):885-896.
92. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci.* 15 août 2011;124(Pt 16):2681-2686.
93. Kawai M, Rosen CJ. PPAR γ : a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* nov 2010;6(11):629-636.
94. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, et al. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 6 août 2004;279(32):34015-34022.
95. Lakshminpathy U, Hart RP. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* févr 2008;26(2):356-363.

96. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 23 janv 2009;136(2):215-233.
97. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. mars 2009;11(3):228-234.
98. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2 juin 2006;125(5):887-901.
99. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 5 juill 2007;448(7149):83-86.
100. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 15 déc 2003;17(24):3011-3016.
101. Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol*. 27 juin 2008;380(1):237-243.
102. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2005;6(5):376-385.
103. Yang J-S, Lai EC. Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. *Cell Cycle Georget Tex*. 15 nov 2010;9(22):4455-4460.
104. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 17 oct 2003;115(2):199-208.
105. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*. déc 2005;7(12):1261-1266.
106. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*. juin 2012;19(6):586-593.
107. Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, et al. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell*. 24 sept 2009;35(6):868-880.
108. Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell*. 7 oct 2011;44(1):120-133.
109. Morozova N, Zinovyev A, Nonne N, Pritchard L-L, Gorban AN, Harel-Bellan A. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA New York N*. sept 2012;18(9):1635-1655.
110. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 sept 2008;105(37):13906-13911.

111. Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 déc 2009;106(49):20794-20799.
112. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force Aldred S, et al. Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2009;4(5):e5605.
113. Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 avr 2011;108(15):6139-6144.
114. Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med*. févr 2012;18(2):109-118.
115. Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. avr 2008;58(4):1001-1009.
116. Han J, Yang T, Gao J, Wu J, Qiu X, Fan Q, et al. Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. mars 2010;25(3):377-384.
117. Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett*. 24 juill 2006;580(17):4214-4217.
118. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum*. sept 2009;60(9):2723-2730.
119. Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets*. mai 2011;15(5):623-636.
120. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol*. avr 2011;46(2):R65-72.
121. Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 oct 2008;105(40):15417-15422.
122. Koslowski MJ, Kübler I, Chamailard M, Schaeffeler E, Reinisch W, Wang G, et al. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One*. 2009;4(2):e4496.
123. Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010;11:320.

124. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dayt Ohio*. févr 2010;28(2):357-364.
125. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 déc 2009;390(2):247-251.
126. Fletcher CDM, Krishnan Unni K, Mertens F. World Health Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC Press. Lyon; 2002.
127. Mohseny AB, Hogendoorn PCW. Concise Review: Mesenchymal Tumors: When Stem Cells Go Mad. *STEM CELLS*. 1 mars 2011;29(3):397-403.
128. Luk F, Yu Y, Dong H-T, Walsh WR, Yang J-L. New gene groups associated with dissimilar osteoblastic differentiation are linked to osteosarcomagenesis. *Cancer Genomics Proteomics*. avr 2011;8(2):65-75.
129. Tang X, Lu X, Guo W, Ren T, Zhao H, Zhao F, et al. Different expression of Sox9 and Runx2 between chondrosarcoma and dedifferentiated chondrosarcoma cell line. *Eur J Cancer Prev*. nov 2010;19(6):466-471.
130. Tang N, Song W-X, Luo J, Haydon RC, He T-C. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop*. sept 2008;466(9):2114-2130.
131. Boeuf S, Kunz P, Hennig T, Lehner B, Hogendoorn P, Bovée J, et al. A chondrogenic gene expression signature in mesenchymal stem cells is a classifier of conventional central chondrosarcoma. *J Pathol*. 2008;216(2):158-66.
132. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med*. 25 août 1983;309(8):496-498.
133. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 10 sept 1992;359(6391):162-165.
134. Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res*. 1 juin 2005;65(11):4633-4644.
135. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol*. juin 1987;127(3):507-518.
136. Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res*. 1 juill 2003;63(13):3464-3468.

137. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal Stem Cell Features of Ewing Tumors. *Cancer Cell*. 8 mai 2007;11(5):421-429.
138. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà M-L, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, et al. Development of Ewing's Sarcoma from Primary Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Cancer Res*. 15 déc 2005;65(24):11459-11468.
139. Riggi N, Suvà M-L, Vito CD, Provero P, Stehle J-C, Baumer K, et al. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev*. 5 janv 2010;24(9):916-932.
140. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, Fourth Edition. IARC; 2013.
141. Mavrogenis AF, Gambarotti M, Angelini A, Palmerini E, Staals EL, Ruggieri P, et al. Chondrosarcomas revisited. *Orthopedics*. mars 2012;35(3):e379-390.
142. Giuffrida AY, Burgueno JE, Koniaris LG, Gutierrez JC, Duncan R, Scully SP. Chondrosarcoma in the United States (1973 to 2003): an analysis of 2890 cases from the SEER database. *J Bone Joint Surg Am*. mai 2009;91(5):1063-1072.
143. Lee FY, Mankin HJ, Fondren G, Gebhardt MC, Springfield DS, Rosenberg AE, et al. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. *J Bone Joint Surg Am*. mars 1999;81(3):326-338.
144. Ogose A, Unni KK, Swee RG, May GK, Rowland CM, Sim FH. Chondrosarcoma of small bones of the hands and feet. *Cancer*. 1 juill 1997;80(1):50-59.
145. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, Rijswijk CS van, Krol AD, Taminiau AHM, et al. The Clinical Approach Towards Chondrosarcoma. *The Oncologist*. 3 janv 2008;13(3):320-329.
146. Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer*. août 1977;40(2):818-831.
147. Kim M-J, Cho K-J, Ayala AG, Ro JY. Chondrosarcoma: With Updates on Molecular Genetics. *Sarcoma*. 15 févr 2011;2011.
148. Björnsson J, McLeod RA, Unni KK, Ilstrup DM, Pritchard DJ. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. *Cancer*. 15 nov 1998;83(10):2105-2119.
149. Rizzo M, Ghert MA, Harrelson JM, Scully SP. Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictors of outcome. *Clin Orthop*. oct 2001;(391):224-233.
150. Nojima T, Unni KK, McLeod RA, Pritchard DJ. Periosteal chondroma and periosteal chondrosarcoma. *Am J Surg Pathol*. sept 1985;9(9):666-677.

151. Papagelopoulos PJ, Galanis EC, Mavrogenis AF, Savvidou OD, Bond JR, Unni KK, et al. Survivorship analysis in patients with periosteal chondrosarcoma. *Clin Orthop.* juill 2006;448:199-207.
152. Dahlin DC, Beabout JW. Dedifferentiation of low-grade chondrosarcomas. *Cancer.* août 1971;28(2):461-466.
153. Röpke M, Boltze C, Neumann HW, Roessner A, Schneider-Stock R. Genetic and Epigenetic Alterations in Tumor Progression in a Dedifferentiated Chondrosarcoma. *Pathol - Res Pr.* 2003;199(6):437-444.
154. Mercuri M, Picci P, Campanacci L, Rulli E. Dedifferentiated chondrosarcoma. *Skeletal Radiol.* août 1995;24(6):409-416.
155. Staals EL, Bacchini P, Bertoni F. Dedifferentiated central chondrosarcoma. *Cancer.* 2006;106(12):2682-91.
156. Dickey ID, Rose PS, Fuchs B, Wold LE, Okuno SH, Sim FH, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: the role of chemotherapy with updated outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* nov 2004;86-A(11):2412-2418.
157. Riedel RF, Larrier N, Dodd L, Kirsch D, Martinez S, Brigman BE. The clinical management of chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* avr 2009;10(1-2):94-106.
158. Kumta SM, Griffith JF, Chow LT, Leung PC. Primary juxtacortical chondrosarcoma dedifferentiating after 20 years. *Skeletal Radiol.* oct 1998;27(10):569-573.
159. Grimer RJ, Gosheger G, Taminiau A, Biau D, Matejovsky Z, Kollender Y, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: Prognostic factors and outcome from a European group. *Eur J Cancer.* sept 2007;43(14):2060-2065.
160. Ayoub KS, Grimer RJ, Carter SR, Mangham DC, Davies AM, Tillman RM. Clear cell chondrosarcoma of bone. *Sarcoma.* 1999;3(2):115-119.
161. Donati D, Yin J, Colangeli M, Colangeli S, Bella CD, Bacchini P, et al. Clear cell chondrosarcoma of bone: long time follow-up of 18 cases. *Arch Orthop Trauma Surg.* févr 2008;128(2):137-142.
162. Bertoni F, Picci P, Bacchini P, Capanna R, Innao V, Bacci G, et al. Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissues. *Cancer.* 1 août 1983;52(3):533-541.
163. Hoang MP, Suarez PA, Donner LR, Y Ro J, Ordóñez NG, Ayala AG, et al. Mesenchymal Chondrosarcoma: A Small Cell Neoplasm with Polyphenotypic Differentiation. *Int J Surg Pathol.* oct 2000;8(4):291-301.
164. Bovée JV, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AH, Hogendoorn PC. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. *Lancet Oncol.* août 2005;6(8):599-607.

165. Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, Gokgoz N, Poon R, Lin AC, et al. Constitutive Hedgehog Signaling in Chondrosarcoma Up-Regulates Tumor Cell Proliferation. *Am J Pathol.* janv 2006;168(1):321-330.
166. Hopyan S, Gokgoz N, Poon R, Gensure RC, Yu C, Cole WG, et al. A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis. *Nat Genet.* mars 2002;30(3):306-310.
167. Rozeman LB, Hameetman L, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Bovée JV. Absence of IHH and retention of PTHrP signalling in enchondromas and central chondrosarcomas. *J Pathol.* 2005;205(4):476-82.
168. Amary MF, Damato S, Halai D, Eskandarpour M, Berisha F, Bonar F, et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet.* 2011;43(12):1262-1265.
169. Hameetman L, Bovée JV, Taminiau AH, Kroon HM, Hogendoorn PC. Multiple osteochondromas: clinicopathological and genetic spectrum and suggestions for clinical management. *Hered Cancer Clin Pr.* 2004;2(4):161-173.
170. Jennes I, Pedrini E, Zuntini M, Mordenti M, Balkassmi S, Asteggiano CG, et al. Multiple osteochondromas: mutation update and description of the multiple osteochondromas mutation database (MOdb). *Hum Mutat.* déc 2009;30(12):1620-1627.
171. Benoist-Lasselín C, de Margerie E, Gibbs L, Cormier S, Silve C, Nicolas G, et al. Defective chondrocyte proliferation and differentiation in osteochondromas of MHE patients. *Bone.* juill 2006;39(1):17-26.
172. Ahmed AR, Tan T-S, Unni KK, Collins MS, Wenger DE, Sim FH. Secondary chondrosarcoma in osteochondroma: report of 107 patients. *Clin Orthop.* juin 2003;(411):193-206.
173. Douis H, Saifuddin A. The imaging of cartilaginous bone tumours. II. Chondrosarcoma. *Skeletal Radiol.*;1-16.
174. Mandahl N, Gustafson P, Mertens F, Akerman M, Baldetorp B, Gisselsson D, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic impact in chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* févr 2002;33(2):188-200.
175. Rozeman LB, Szuhai K, Schrage YM, Rosenberg C, Tanke HJ, Taminiau AHM, et al. Array-comparative genomic hybridization of central chondrosarcoma. *Cancer.* 2006;107(2):380-8.
176. Tallini G, Dorfman H, Brys P, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CDM, et al. Correlation between clinicopathological features and karyotype in 100 cartilaginous and chordoid tumours. A report from the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Collaborative Study Group. *J Pathol.* 1 févr 2002;196(2):194-203.

177. Bovée JVMG, Cleton-Jansen A-M, Kuipers-Dijkshoorn NJ, van den Broek LJCM, Taminiau AHM, Cornelisse CJ, et al. Loss of heterozygosity and DNA ploidy point to a diverging genetic mechanism in the origin of peripheral and central chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26(3):237-46.
178. Amary MF, Bacsí K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol*. 19 mai 2011;224(3):334-343.
179. Damato S, Alorjani M, Bonar F, McCarthy SW, Cannon SR, O'Donnell P, et al. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromas. *Histopathology*. 2012;60(2):363-5.
180. Kerr DA, Lopez HU, Deshpande V, Hornicek FJ, Duan Z, Zhang Y, et al. Molecular distinction of chondrosarcoma from chondroblastic osteosarcoma through IDH1/2 mutations. *Am J Surg Pathol*. juin 2013;37(6):787-795.
181. Ward PS, Cross JR, Lu C, Weigert O, Abel-Wahab O, Levine RL, et al. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene*. 10 mai 2012;31(19):2491-2498.
182. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 17 juin 2010;465(7300):966.
183. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW, et al. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 févr 2011;108(8):3270-3275.
184. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations: Mechanisms, Models, and Clinical Opportunities. *Cancer Discov*. 24 juin 2013;
185. Schaap FG, French PJ, Bovée JVMG. Mutations in the Isocitrate Dehydrogenase Genes IDH1 and IDH2 in Tumors. *Adv Anat Pathol*. janv 2013;20(1):32-38.
186. Boeuf S, Bovée JVMG, Lehner B, Hogendoorn PCW, Richter W. Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology*. 2010;56(5):641-51.
187. Terek RM, Healey JH, Garin-Chesa P, Mak S, Huvos A, Albino AP. p53 mutations in chondrosarcoma. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B*. févr 1998;7(1):51-56.
188. Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, Cleton-Jansen A-M, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW, et al. Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth in vitro. *J Cell Mol Med*. sept 2009;13(9a):2843-2852.

189. Larramendy ML, Tarkkanen M, Valle J, Kivioja AH, Ervasti H, Karaharju E, et al. Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Am J Pathol.* févr 1997;150(2):685.
190. Asp J, Inerot S, Block JA, Lindahl A. Alterations in the regulatory pathway involving p16, pRb and cdk4 in human chondrosarcoma. *J Orthop Res.* 2001;19(1):149-54.
191. Van Beerendonk HM, Rozeman LB, Taminiou AH, Sciort R, Bovée JV, Cleton-Jansen A-M, et al. Molecular analysis of the INK4A/INK4A-ARF gene locus in conventional (central) chondrosarcomas and enchondromas: indication of an important gene for tumour progression. *J Pathol.* 2004;202(3):359-66.
192. Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol MP.* août 2001;54(4):215-221.
193. Tarpey PS, Behjati S, Cooke SL, Van Loo P, Wedge DC, Pillay N, et al. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nat Genet.* 16 juin 2013;
194. Donati D, El Ghoneimy A, Bertoni F, Di Bella C, Mercuri M. Surgical treatment and outcome of conventional pelvic chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg Br.* nov 2005;87(11):1527-1530.
195. Leerapun T, Hugate RR, Inwards CY, Scully SP, Sim FH. Surgical management of conventional grade I chondrosarcoma of long bones. *Clin Orthop.* oct 2007;463:166-172.
196. Fox E, Patel S, Wathen JK, Schuetze S, Chawla S, Harmon D, et al. Phase II Study of Sequential Gemcitabine Followed by Docetaxel for Recurrent Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, or Unresectable or Locally Recurrent Chondrosarcoma: Results of Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study 003. *The Oncologist.* 3 janv 2012;17(3):321-e329.
197. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, Pereira JR, De Marinis F, von Pawel J, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mai 2004;22(9):1589-1597.
198. Chow WA, Bedell V, Gaytan P, Borden E, Goldblum J, Hicks D, et al. Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are frequently detected by fluorescence in situ hybridization in conventional chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 15 avr 2006;166(2):95-100.
199. Moussavi-Harami F, Mollano A, Martin JA, Ayoob A, Domann FE, Gitelis S, et al. Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28 juill 2006;346(2):379-385.
200. Kim DW, Kim K-O, Shin MJ, Ha JH, Seo SW, Yang J, et al. siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol Cancer.* 2009;8:28.

201. Amling M, Pösl M, Hentz MW, Priemel M, Delling G. PTHrP and Bcl-2: essential regulatory molecules in chondrocyte differentiation and chondrogenic tumors. *Verhandlungen Dtsch Ges Für Pathol.* 1998;82:160-169.
202. Bovée JVMG, van den Broek LJCM, Cleton-Jansen A-M, Hogendoorn PCW. Up-Regulation of PTHrP and Bcl-2 Expression Characterizes the Progression of Osteochondroma towards Peripheral Chondrosarcoma and Is a Late Event in Central Chondrosarcoma. *Lab Invest.* 2000 Dec;80(12):1925-1933.
203. Miyaji T, Nakase T, Onuma E, Sato K, Myoui A, Tomita T, et al. Monoclonal antibody to parathyroid hormone-related protein induces differentiation and apoptosis of chondrosarcoma cells. *Cancer Lett.* 25 sept 2003;199(2):147-155.
204. Lin C, McGough R, Aswad B, Block JA, Terek R. Hypoxia induces HIF-1alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* nov 2004;22(6):1175-1181.
205. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br.* mars 2008;90(3):364-370.
206. Klenke FM, Abdollahi A, Bertl E, Gebhard M-M, Ewerbeck V, Huber PE, et al. Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC Cancer.* 2007;7:49.
207. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* janv 2002;2(1):48-58.
208. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:361-398.
209. Rosier RN, O'Keefe RJ, Teot LA, Fox EJ, Nester TA, Puzas JE, et al. P-glycoprotein expression in cartilaginous tumors. *J Surg Oncol.* juin 1997;65(2):95-105.
210. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human « MDR1 » gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1987;84(9):3004-3008.
211. Wyman JJ, Hornstein AM, Meitner PA, Mak S, Verdier P, Block JA, et al. Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: Expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance. *J Orthop Res.* 1999;17(6):935-40.
212. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 12 avr 1992;258(5088):1650-1654.

213. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 22 déc 1998;95(26):15665-15670.
214. Van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH, Cleton-Jansen AM, Gelderblom H, et al. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol.* 2012;23(6): 1617-1626.
215. Moffitt KL, Martin SL, Walker B. From sentencing to execution--the processes of apoptosis. *J Pharm Pharmacol.* mai 2010;62(5):547-562.
216. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* juin 2002;2(6):420-430.
217. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* déc 2009;21(6):871-877.
218. Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, et al. Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* juin 2007;25(6):820-828.
219. Van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* nov 2006;10(5):389-399.
220. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther [Internet].* 5 janv 2006 [cité 25 mars 2013];5(5):1087-1098. Disponible sur: <http://mct.aacrjournals.org/content/5/5/1087>
221. Lechler P, Renkawitz T, Campean V, Balakrishnan S, Tingart M, Grifka J, et al. The antiapoptotic gene survivin is highly expressed in human chondrosarcoma and promotes drug resistance in chondrosarcoma cells in vitro. *BMC Cancer [Internet].* 2 avr 2011 [cité 13 juill 2012];11(1):120.
222. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer.* sept 2009;9(9):665-674.
223. Ayala G, Liu C, Nicosia R, Horowitz S, Lackman R. Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. *Hum Pathol.* mars 2000;31(3):341-346.
224. Kalinski T, Krueger S, Sel S, Werner K, Ropke M, Roessner A. Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1beta. *Cancer.* 1 mai 2006;106(9):2028-2038.
225. Kalinski T, Sel S, Kouznetsova I, Röpke M, Roessner A. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol - Res Pr.* 15 mai 2009;205(5):339-345.

226. Gorlick R, Janeway K, Lessnick S, Randall RL, Marina N, COG Bone Tumor Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: bone tumors. *Pediatr Blood Cancer*. juin 2013;60(6):1009-1015.
227. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur J Cancer Prev*. mai 2010;19(3):173-181.
228. Gurney JG, Swensen AR, Bulterys M. Malignant Bone Tumors, In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al., editors. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995*. Bethesda, MD: National Cancer Institute SEER Program, NIH Pub. No. 99-4649; 1999. pp. 99–110.
229. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 févr 2002;20(3):776-790.
230. Bertucci F, Araujo J, Giovannini M. Pancreatic metastasis from osteosarcoma and Ewing sarcoma: literature review. *Scand J Gastroenterol*. janv 2013;48(1):4-8.
231. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol*. avr 2006;125(4):555-581.
232. Sanerkin NG. Definitions of osteosarcoma, chondrosarcoma, and fibrosarcoma of bone. *Cancer*. 1 juill 1980;46(1):178-185.
233. Merino S, Arrazola J, Saiz A, Blanco JA, Ortega L. Post-Paget telangiectatic osteosarcoma of the skull. *Skeletal Radiol*. août 1999;28(8):470-472.
234. Brown MJ, Logan PM, O'Connell JX, Janzen DL, Connell DG. Diaphyseal telangiectatic osteosarcoma as a second tumor after bilateral retinoblastomas. *Skeletal Radiol*. oct 1996;25(7):685-688.
235. Heymann D, Rédini F. Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *IBMS BoneKEy*. sept 2011 ;8(9):402-414.
236. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res*. févr 2007;27(1A):155-164.
237. Eyre R, Feltbower RG, Mubwandarikwa E, Eden TOB, McNally RJQ. Epidemiology of bone tumours in children and young adults. *Pediatr Blood Cancer*. déc 2009;53(6):941-952.
238. Ottaviani G, Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009;152:15-32.
239. 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*. juin 2001;22(2):77-88.

240. Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol*. janv 2010;22(1):64-69.
241. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:2.
242. Hansen MF, Seton M, Merchant A. Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. déc 2006;21 Suppl 2:P58-63.
243. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 7 janv 2011;144(1):27-40.
244. López-Guerrero JA, López-Ginés C, Pellín A, Carda C, Llombart-Bosch A. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B*. juin 2004;13(2):81-91.
245. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: chondrosarcoma and other cartilaginous neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet*. mai 2003;143(1):1-31.
246. Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev*. 15 juin 2008;22(12):1662-1676.
247. Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, et al. Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer J Int Cancer*. 10 nov 2005;117(3):349-355.
248. Wu X, Cai Z, Lou L, Zhu Y. Expressions of p53, c-MYC, BCL-2 and apoptotic index in human osteosarcoma and their correlations with prognosis of patients. *Cancer Epidemiol*. avr 2012;36(2):212-216.
249. Yasko AW. Surgical management of primary osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009;152:125-145.
250. 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 Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. juill 2003;14(7):1126-1134.
251. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 20 oct 2003;22(47):7265-7279.
252. Zhang J, Tian Q, Chan SY, Duan W, Zhou S. Insights into oxazaphosphorine resistance and possible approaches to its circumvention. *Drug Resist Updat*. oct 2005;8(5):271-297.

253. Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1991;27(5):532-535.
254. Bertino JR. Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. *Best Pract Res Clin Haematol*. déc 2009 ;22(4):577-582.
255. Cowell IG, Austin CA. Mechanism of Generation of Therapy Related Leukemia in Response to Anti-Topoisomerase II Agents. *Int J Environ Res Public Health*. 31 mai 2012;9(12):2075-2091.
256. Picci P, Bacci G, Campanacci M, Gasparini M, Pilotti S, Cerasoli S, et al. Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy. Regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer*. 1 oct 1985;56(7):1515-1521.
257. Wagner ER, Luther G, Zhu G, Luo Q, Shi Q, Kim SH, et al. Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011: article ID 325238, 12 pages.
258. Mohseny AB, Machado I, Cai Y, Schaefer K-L, Serra M, Hogendoorn PCW, et al. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest*. 2011; 91: 1195-1205.
259. Manara M., Baldini N, Serra M, Lollini P-L, De Giovanni C, Vaccari M, et al. Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene. *Bone*. mars 2000;26(3):215-220.
260. Cao Y, Zhou Z, de Crombrughe B, Nakashima K, Guan H, Duan X, et al. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res*. 15 févr 2005;65(4):1124-1128.
261. Rayet B, Gélinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 22 nov 1999;18(49):6938-6947.
262. Andela VB, Sheu T-J, Puzas EJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Rosier RN. Malignant reversion of a human osteosarcoma cell line, Saos-2, by inhibition of NFκB. *Biochem Biophys Res Commun*. 20 sept 2002;297(2):237-241.
263. Carpio L, Gladu J, Goltzman D, Rabbani SA. Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 9 janv 2001;281(3):E489-E499.
264. Wysolmerski JJ. Parathyroid Hormone-Related Protein: An Update. *J Clin Endocrinol Metab*. 9 janv 2012;97(9):2947-2956.
265. Soki FN, Park SI, McCauley LK. The multifaceted actions of PTHrP in skeletal metastasis. *Future Oncol Lond Engl*. juill 2012;8(7):803-817.
266. Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7305-7315.

267. Park BH, Breyer B, He TC. Peroxisome proliferator-activated receptors: roles in tumorigenesis and chemoprevention in human cancer. *Curr Opin Oncol.* janv 2001;13(1):78-83.
268. Haydon RC, Zhou L, Feng T, Breyer B, Cheng H, Jiang W, et al. Nuclear Receptor Agonists As Potential Differentiation Therapy Agents for Human Osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 5 janv 2002;8(5):1288-1294.
269. Haydon RC, Luu HH, He T-C. Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis. *Clin Orthop.* janv 2007;454:237-246.
270. He B-C, Chen L, Zuo G-W, Zhang W, Bi Y, Huang J, et al. Synergistic antitumor effect of the activated PPARgamma and retinoid receptors on human osteosarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 avr 2010;16(8):2235-2245.
271. Kallio A, Guo T, Lamminen E, Seppänen J, Kangas L, Väänänen HK, et al. Estrogen and the selective estrogen receptor modulator (SERM) protection against cell death in estrogen receptor alpha and beta expressing U2OS cells. *Mol Cell Endocrinol.* 16 juill 2008;289(1-2):38-48.
272. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2010;9(10):775-789.
273. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol.* déc 2012;6(6):590-610.
274. Lulla RR, Costa FF, Bischof JM, Chou PM, de F Bonaldo M, Vanin EF, et al. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Osteosarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:732690.
275. Maire G, Martin JW, Yoshimoto M, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. *Cancer Genet.* mars 2011;204(3):138-146.
276. Ziyan W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* déc 2011;28(4):1469-1474.
277. Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 3 avr 2008;27(15):2128-2136.
278. Duan Z, Choy E, Harmon D, Liu X, Susa M, Mankin H, et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. *Mol Cancer Ther.* août 2011;10(8):1337-1345.
279. Liu L, Li H, Li J, Zhong H, Zhang H, Chen J, et al. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 déc 2011 [;416(1-2):31-38.

280. Zhang H, Cai X, Wang Y, Tang H, Tong D, Ji F. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* nov 2010;24(5):1363-1369.
281. Thayanithy V, Sarver AL, Kartha RV, Li L, Angstadt AY, Breen M, et al. Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone.* janv 2012;50(1):171-181.
282. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, et al. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Mol Ther.* juin 2011;19(6):1123-1130.
283. Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, Hughes D, Kleinerman ES. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. *Cancer Res.* 15 févr 2012;72(4):908-916.
284. Montanini L, Lasagna L, Barili V, Jonstrup SP, Murgia A, Pazzaglia L, et al. MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93. *Cell Oncol Dordr.* févr 2012;35(1):29-41.
285. Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina GI, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene.* 19 nov 2009;28(46):4065-4074.
286. He C, Xiong J, Xu X, Lu W, Liu L, Xiao D, et al. Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 oct 2009;388(1):35-40.
287. Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, Perez J, Duc A, Dutour A, et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int J Cancer J Int Cancer.* 1 août 2011;129(3):680-690.
288. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther.* déc 2011;18(12):1121-1126.
289. Liu C, Tang DG. MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res.* 15 sept 2011;71(18):5950-5954.
290. 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.* nov 2004;19(11):1850-1861.
291. Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, Numoto K, Kikuta K, Ozaki T, et al. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 12 août 2013;
292. Ban J, Jug G, Mestdagh P, Schwentner R, Kauer M, Aryee DNT, et al. Hsa-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene.* 5 mai 2011;30(18):2173-2180.

293. Franzetti G-A, Laud-Duval K, Bellanger D, Stern M-H, Sastre-Garau X, Delattre O. MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor. *Oncogene*. 17 sept 2012;
294. McKinsey EL, Parrish JK, Irwin AE, Niemeyer BF, Kern HB, Birks DK, et al. A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Fli1-regulated microRNAs. *Oncogene*. 8 déc 2011;30(49):4910-4920.
295. De Vito C, Riggi N, Suvà M-L, Janiszewska M, Horlbeck J, Baumer K, et al. Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's sarcoma development. *PloS One*. 2011;6(8):e23592.
296. Dylla L, Moore C, Jedlicka P. MicroRNAs in Ewing sarcoma. *Front Pediatr Oncol*. 2013;3:65.
297. Von Der Mark K, Gauss V, Von Der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 9 juin 1977;267(5611):531-532.
298. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. août 1982;30(1):215-224.
299. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4(4):415-428.
300. Oldershaw RA, Tew SR, Russell AM, Meade K, Hawkins R, McKay TR, et al. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio*. mars 2008;26(3):666-674.
301. Oldershaw RA. Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. *Int J Exp Pathol*. déc 2012;93(6):389-400.
302. Murdoch AD, Grady LM, Ablett MP, Katopodi T, Meadows RS, Hardingham TE. Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells Dayt Ohio*. nov 2007;25(11):2786-2796.
303. Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2 mars 2012;3(2):9.
304. Fourré N, Millot J-M, Garnotel R, Jeannesson P. In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Anticancer Res*. déc 2006;26(6B):4623-4626.
305. Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*. 2011;12(12):236.
306. Collino F, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. MicroRNAs and mesenchymal stem cells. *Vitam Horm*. 2011;87:291-320.

307. Zhou G, Shi X, Zhang J, Wu S, Zhao J. MicroRNAs in osteosarcoma: from biological players to clinical contributors, a review. *J Int Med Res.* févr 2013;41(1):1-12.
308. Gao J, Yang T, Han J, Yan K, Qiu X, Zhou Y, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem.* juill 2011;112(7):1844-1856.
309. Chen Y, Song Y-X, Wang Z-N. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer.* 2013;12:43.
310. Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology* Baltim Md. juill 2010;52(1):60-70.
311. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* juill 2010;14(7):1170-1179.
312. Zhou X, Zhao F, Wang Z-N, Song Y-X, Chang H, Chiang Y, et al. Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep.* févr 2012;27(2):447-454.
313. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013;754:3-29.
314. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008;27(41):5443-5453.
315. Tsuruta T, Kozaki K-I, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, et al. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res.* 15 oct 2011;71(20):6450-6462.
316. Zhu C, Li J, Ding Q, Cheng G, Zhou H, Tao L, et al. miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGF α in prostate cancer cell lines. *Prostate.* juill 2013;73(10):1082-1089.
317. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* juin 2005;1(6):361-370.
318. Chen S-D, Yang D-I, Lin T-K, Shaw F-Z, Liou C-W, Chuang Y-C. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):7199-7215.
319. Summermatter S, Baum O, Santos G, Hoppeler H, Handschin C. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway. *J Biol Chem.* 22 oct 2010;285(43):32793-32800.
320. Girnun GD. The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* juin 2012;23(4):381-388.

321. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 févr 2005;102(7):2414-2419.
322. Mazzatti D, Lim F-L, O'Hara A, Wood IS, Trayhurn P. A microarray analysis of the hypoxia-induced modulation of gene expression in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem*. juill 2012;118(3):112-120.
323. Cherrier B, Gouin F, Heymann M-F, Thiéry JP, Rédini 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 J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. juin 2005;26(3):121-130.
324. Picarda G, Surget S, Guiho R, Téletchéa S, Berreur M, Tirode F, et al. A functional, new short isoform of death receptor 4 in Ewing's sarcoma cell lines may be involved in TRAIL sensitivity/resistance mechanisms. *Mol Cancer Res MCR*. mars 2012;10(3):336-346.
325. Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol*. avr 2011;7(4):208-218.
326. Goltzman D. Osteolysis and cancer. *J Clin Invest*. 15 mai 2001;107(10):1219-1220.
327. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. mars 2012;12(3):181-195.
328. Biscetti F, Straface G, Pitocco D, Zaccardi F, Ghirlanda G, Flex A. Peroxisome proliferator-activated receptors and angiogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. déc 2009;19(11):751-759.
329. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Rev Rheumatol*. juill 2006;2(7):373-382.
330. Peyrode C, Weber V, David E, Vidal A, Auzeloux P, Communal Y, et al. Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies. *Invest New Drugs*. 1 août 2012;30(4):1782-1790.
331. Yamamura K, Iwata H, Osada T, Yotsuyanagi T, Nabeshima T. Antitumor Effects and Distribution of Adriamycin Incorporated into Hydroxyapatite Implants in a Cancer Rat Model Bearing Swarm Rat Chondrosarcoma. *Jpn J Pharmacol*. 1994;66(4):433-438.
332. Viccica G, Francucci CM, Marcocci C. The role of PPAR γ for the osteoblastic differentiation. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(7 Suppl):9-12.
333. Thomas DM, Johnson SA, Sims NA, Trivett MK, Slavin JL, Rubin BP, et al. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J Cell Biol*. 6 déc 2004;167(5):925-934.

334. Luo X, Chen J, Song W-X, Tang N, Luo J, Deng Z-L, et al. Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* déc 2008;88(12):1264-1277.
335. Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA. Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature.* 26 août 2010;466(7310):1110-1114.
336. Shen R, Wang X, Drissi H, Liu F, O'Keefe RJ, Chen D. Cyclin D1-cdk4 induce runx2 ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 16 juin 2006;281(24):16347-16353.
337. Chuang LSH, Ito K, Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *Int J Cancer.* 2013;132(6):1260-71.

POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE LA DIFFERENCIATION DANS LES CHONDROSARCOMES ET LES OSTEOSARCOMES

Les chondrosarcomes (CS) et les ostéosarcomes (OS) sont les deux tumeurs osseuses primitives principales de l'adulte. Ces pathologies présentent une grande hétérogénéité et variabilité dans la réponse individuelle aux traitements. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux liens entre le degré de différenciation mésenchymateuse de ces tumeurs, leur agressivité et leur chimiorésistance.

Dans un premier temps, nous avons utilisé de nouvelles lignées de CS établies à partir de biopsies de patients pour étudier leur chimiorésistance. Grâce à un modèle de chondrogenèse en culots 3D *in vitro*, nous avons mis en évidence le rôle important de la différenciation chondrocytaire et donc de la matrice cartilagineuse, qui ferait office de barrière physique à la diffusion des drogues et aurait ainsi un rôle-clé dans la réponse aux traitements.

Nous avons ensuite étudié l'impact de la surexpression d'un microARN stimulant l'ostéoblastogenèse, le miR-152, sur la différenciation et la tumorigénicité des OS. Si le miR-152 n'avait aucun effet sur une lignée d'OS en culture, il induisait dans un cas sur trois un fort ralentissement du développement tumoral d'un modèle d'OS en souris immunodéprimée. Cet effet anticancéreux pourrait résulter d'une action du miR-152 sur la différenciation ostéoblastique ou directement sur la prolifération cellulaire.

Ces études soulignent l'impact de la différenciation mésenchymateuse sur l'agressivité et la chimiorésistance des CS et OS. Une meilleure biodistribution des drogues au niveau du cartilage et une activité anticancéreuse du miR-152 plus efficace constitueraient de nouvelles stratégies pour améliorer les traitements des patients à haut-risque.

Mots-clés : Différenciation, Chondrosarcome, Ostéosarcome, Chimiothérapie

THERAPEUTIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL DIFFERENTIATION IN CHONDROSARCOMA AND OSTEOSARCOMA

Chondrosarcoma (CS) and osteosarcoma (OS) are the two main primary bone tumors of the adult. These pathologies present high heterogeneity and variability in the individual response to the treatments. In this context, we were interested in the links between the differentiation level of these tumors, their aggressiveness and chemoresistance.

We first used new characterized CS cell lines established from patients' biopsies to study their chemoresistance. Using the *in vitro* chondrogenesis model with 3D pellets, we were able to evidence the major role of chondrogenic differentiation and therefore of cartilaginous matrix, which may act as a physical barrier to the diffusion of drugs and may play a major role in the response to the treatments.

Second, we studied the influence of an osteoblastogenesis-stimulating microRNA, miR-152, on the differentiation and tumorigenicity of OS. Even if no effect of miR-152 could be observed on an OS cell line, it induces in one case out of three a strong reduction in tumoral development of an OS model in the immunodeficient mouse. This anti-cancer effect may be the consequence of an action of miR-152 on osteoblastic differentiation or directly on tumoral proliferation.

These studies highlight the importance of mesenchymal differentiation on aggressiveness and chemoresistance of CS and OS. A better biodistribution of drugs on the cartilage and a more efficient antitumoral activity of miR-152 may constitute new strategies to improve the clinical management of high-risk patients.

Key-words : Differentiation, Chondrosarcoma, Osteosarcoma, Chemotherapy