

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2008

N° 53

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Emmanuelle DAVID

Présentée et soutenue publiquement le 22 octobre 2008

**Rôle de l'Oncostatine M dans la biologie des
Chondrosarcomes et Sarcomes d'Ewing**

Président

M. Jean-François BIARD Docteur en pharmacie, Professeur des
Universités de Pharmacognosie, Nantes

Directeur de thèse :

M. Frédéric BLANCHARD Chargé de Recherche, INSERM ERI7, Nantes

Membres du jury :

M. Ronan LE BOT Docteur en pharmacie, Directeur d'Atlantic Bone
Screen, Nantes

M. Marc BAUD'HUIN Docteur en pharmacie, Doctorant INSERM ERI7,
Nantes

Sommaire

INTRODUCTION.....	4
1ère PARTIE PHYSIOLOGIE DE L'OS ET DU CARTILAGE	5
I. Structure de l'os	6
1. <i>Rôles du tissu osseux.....</i>	6
a. Fonction mécanique.....	6
b. Fonction métabolique	6
c. Fonction hématopoïétique	6
2. <i>Organisation macroscopique de l'os</i>	7
a. L'os compact ou cortical	8
b. L'os spongieux ou trabéculaire.....	8
c. Le périoste	9
d. L'endoste	9
II. Composition du tissu osseux.....	10
1. <i>Généralités</i>	10
2. <i>Les cellules souches à l'origine des tissus squelettiques</i>	11
a. Les cellules souches mésenchymateuses	11
b. Les cellules souches hématopoïétiques	14
3. <i>Les cellules de la lignée ostéoblastique</i>	15
a. Le préostéoblaste	15
b. L'ostéoblaste.....	15
c. L'ostéocyte	16
d. La cellule bordante	16
e. Marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste	16
4. <i>Les cellules de la lignée ostéoclastique</i>	17
5. <i>Interactions ostéoblaste / ostéoclaste</i>	18
6. <i>La matrice extracellulaire</i>	19
a. Le collagène de type I (Coll 1)	19
b. L'ostéopontine (OP)	19
c. La sialoprotéine osseuse (BSP)	19
d. L'ostéocalcine (OC)	20
e. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes.....	20
7. <i>La fraction minérale.....</i>	20
III. Les remaniements physiologiques de l'os	21
1. <i>La croissance osseuse</i>	21
a. L'ossification membranaire.....	21
b. L'ossification périchondrale ou périostique	21
c. L'ossification endochondrale.....	22
d. L'ossification haversienne	23
2. <i>Le remodelage osseux</i>	24
a. Phase de quiescence.....	24
b. Phase d'activation	24
c. Phase de résorption.....	25
d. Phase d'inversion	25
e. Phase de formation	25

IV. Le tissu cartilagineux	26
1. <i>Composition du tissu cartilagineux</i>	26
a. Chondrocytes	26
b. Matrice extra-cellulaire.....	27
c. Périchondre.....	27
2. <i>Classification histologique des cartilages.....</i>	28
3. <i>Croissance et différenciation</i>	29

2ème PARTIE LES TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES..... 30

I. Diversité des pathologies tumorales osseuses	31
II. Les Ostéosarcomes	33
1. <i>Définition</i>	33
2. <i>Histologie.....</i>	33
3. <i>Epidémiologie</i>	34
4. <i>Localisations.....</i>	34
5. <i>Etiologie</i>	34
6. <i>Traitements.....</i>	35
III. Les Sarcomes d'Ewing.....	36
1. <i>Définition</i>	36
2. <i>Histologie.....</i>	36
3. <i>Epidémiologie</i>	37
4. <i>Localisation</i>	37
5. <i>Etiologie</i>	37
a. Translocation Chromosomique caractéristique	37
• Les différents types de translocation	37
• Rôle de EWS-FLI1 dans l'oncogenèse.....	38
b. Autres mutations.....	39
6. <i>Diagnostic.....</i>	39
7. <i>Traitements.....</i>	40
IV. Les Chondrosarcomes.....	41
1. <i>Définition</i>	41
2. <i>Histologie.....</i>	41
3. <i>Epidémiologie</i>	42
4. <i>Diagnostic.....</i>	42
5. <i>Thérapeutique.....</i>	42
V. Nouveaux protocoles thérapeutiques	43

**3ème PARTIE ONCOSTATINE M : UNE CYTOKINE DE LA
FAMILLE DE L'INTERLEUKINE 6 45**

I. Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6	46
1. Définitions	46
2. Récepteurs	47
3. Activités biologiques	48
a. Activités communes	48
b. Activités spécifiques	49
II. L'Oncostatine M.....	51
1. Origine et Structure.....	51
2. Activation du récepteur et transduction du signal.....	51
3. Activités biologiques	52
a. Inflammation	52
b. Hématopoïèse	52
c. Développement hépatique et neuronal.....	52
d. Effets sur les tissus squelettiques.....	53
e. Effets anti-cancéreux	54
f. Effets pro-cancéreux.....	55

4ème PARTIE TRAVAUX DE RECHERCHE..... 56

I. Problématique	57
1. OSM et ostéosarcomes.....	57
a. Différenciation.....	57
b. Prolifération	58
c. Apoptose.....	58
d. Etudes in-vivo.....	60
e. Applications.....	60
2. Objectifs.....	61
3. Mise en oeuvre.....	62
II. Matériels et méthodes	63
1. Culture cellulaire	63
a. Milieux.....	63
b. Cellules	63
c. Cytokines.....	65
2. Tests cellulaires.....	65
a. Test de prolifération XTT	65
b. Comptage de prolifération et d'apoptose.....	66
c. Test d'adhésion.....	67
d. Test de migration	67
3. Etude des ARNm	68
a. Extraction de l'ARN	68
b. Dosage de l'ARN.....	68
c. Reverse transcription	69
d. PCR semi-quantitative.....	69
e. PCR quantitative.....	70
f. Contrôles.....	71

4.	<i>Etude des protéines</i>	73
a.	Réalisation des lysats protéiques	73
b.	Dosage protéique	73
c.	Western blot.....	73
d.	Activité caspase 3	75
5.	<i>Inhibition de EWS-FLI1</i>	75
6.	<i>Analyse statistique</i>	76
III.	Résultats	77
1.	<i>Screening de la réponse des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing aux cytokines de la famille de l'Interleukine 6</i>	77
a.	Test de prolifération.....	77
b.	Récepteurs des cytokines	78
c.	Signalisation	80
2.	<i>Activité de l'OSM sur la Prolifération</i>	81
a.	Effets à court terme.....	81
b.	Effets à long terme.....	82
c.	Etude de protéines du cycle cellulaire	83
3.	<i>Activité de l'OSM sur l'Apoptose</i>	84
a.	Sarcomes d'Ewing et SW1353	85
b.	SRC.....	85
c.	Etude de protéines de la voie mitochondriale de l'apoptose	86
4.	<i>Activité de l'OSM sur les caractéristiques cellulaires</i>	87
a.	SRC.....	88
•	Morphologie	88
•	Différenciation.....	88
•	Adhésion et migration	89
b.	SW1353	91
•	Morphologie	91
•	Différenciation.....	91
•	Adhésion et migration	92
c.	Lignées de Sarcome d'Ewing.....	93
•	Morphologie	93
•	Différenciation.....	93
•	Adhésion et migration	94
5.	<i>Hypothèses sur la spécificité de réponse des cellules de sarcome d'Ewing à l'OSM</i>	94
a.	Etude du rôle de EWS-FLI-1	95
b.	Etude du rôle du statut de différenciation.....	97
	CONCLUSION	99
	BIBLIOGRAPHIE	111

INTRODUCTION

Le squelette humain est composé de plus ou moins 206 os associés à du cartilage, qui ont des fonctions mécaniques, métaboliques et hématopoïétiques très importantes. Le tissu osseux n'est pas inerte, il est en perpétuel renouvellement grâce aux deux principaux types cellulaires qui le composent : les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'équilibre entre la production et la résorption osseuse représente la situation physiologique chez l'homme adulte. Le tissu cartilagineux quant à lui contient un seul type cellulaire, les chondrocytes, et est en revanche peu régénéré chez l'adulte.

Les tissus osseux et cartilagineux peuvent être sujets à divers dérèglements. Outre les pathologies touchant l'équilibre de leur renouvellement, ces tissus ne sont pas épargnés par les processus tumoraux. Les cellules cancéreuses, qui prolifèrent de façon anarchique, proviennent soit directement du tissu osseux (ce sont les tumeurs osseuses primitives), soit d'une tumeur d'un autre organe qui a métastasé au niveau de l'os.

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types de tumeurs osseuses primitives rares, à savoir le sarcome d'Ewing et le chondrosarcome. Ces cancers nécessitent de nouveaux traitements, plus adaptés au tissu osseux et cartilagineux, afin de diminuer la mortalité ou les conséquences d'actes chirurgicaux lourds. L'objectif de ce travail, réalisé dans le cadre du master recherche, a été d'évaluer l'activité de cytokines de la famille de l'Interleukine 6, et plus spécifiquement l'Oncostatine M, sur les chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing. Cette étude est justifiée par le fait que ces cytokines ont déjà montré des propriétés anticancéreuses dans d'autres types tumoraux. Nous avons analysé, in-vitro sur plusieurs lignées de cellules de chondrosarcomes ou de sarcomes d'Ewing, les modifications touchant la prolifération, la mort ou la différenciation et engendrées lors d'un traitement par l'Oncostatine M.

1ère PARTIE

PHYSIOLOGIE DE L'OS ET DU

CARTILAGE

I. Structure de l'os

1. Rôles du tissu osseux

Les tissus osseux et cartilagineux sont des tissus squelettiques, caractérisés par la nature solide de leur matrice extracellulaire, qui a la particularité de se calcifier dans le cas de l'os. Le tissu osseux a 3 fonctions.

a. Fonction mécanique

Le tissu osseux est un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter des contraintes mécaniques. L'os a donc un rôle de soutien du corps et de protection des organes.

b. Fonction métabolique

Le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé notamment sous l'effet des pressions mécaniques. Le remodelage osseux entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux, permettant ainsi le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

c. Fonction hématopoïétique

Les os renferment dans leurs espaces médullaires la moelle hématopoïétique à l'origine des cellules du sang. Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques. Certaines d'entre elles sont des cellules souches mésenchymateuses susceptibles de se différencier dans de multiples lignages différents (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes...)(Owen, 1988).

2. Organisation macroscopique de l'os

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

Un os long typique chez l'adulte est constitué de plusieurs parties.

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

Au sein de ces différentes parties, histologiquement, on distingue plusieurs types de tissus osseux : l'os compact, l'os spongieux, le périoste et l'endoste.

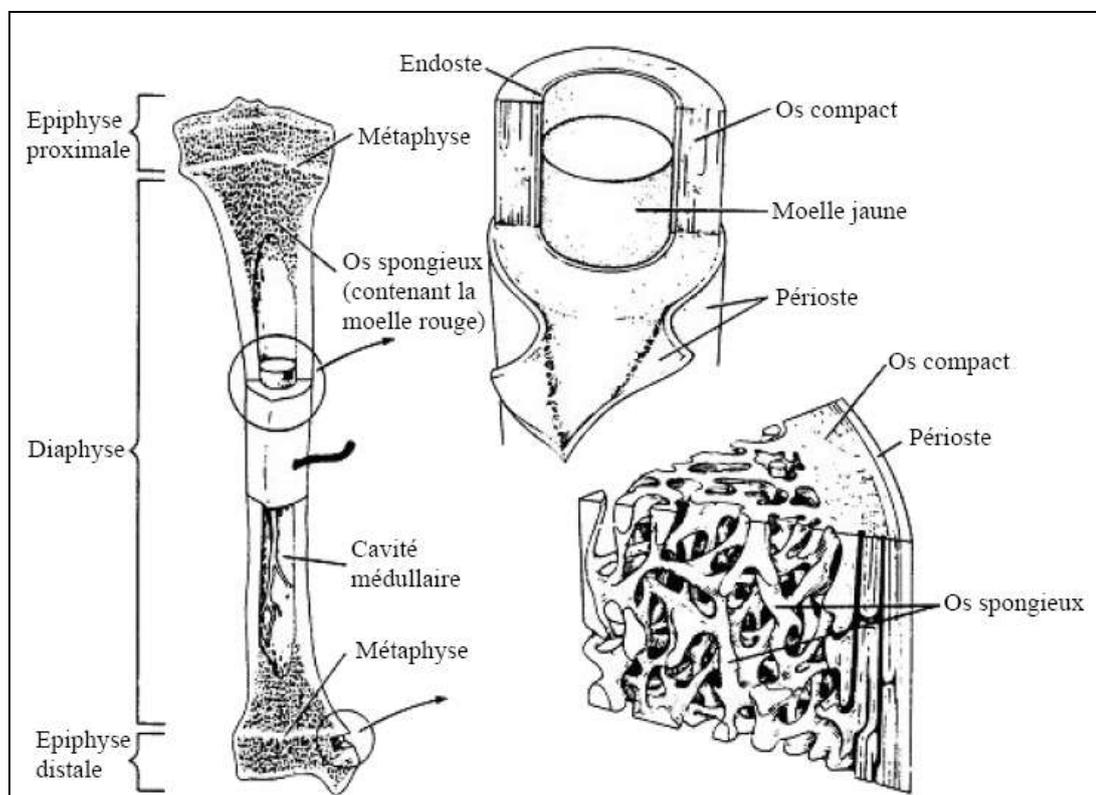


Figure 1 : Organisation macroscopique d'un os long

a. L'os compact ou cortical

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

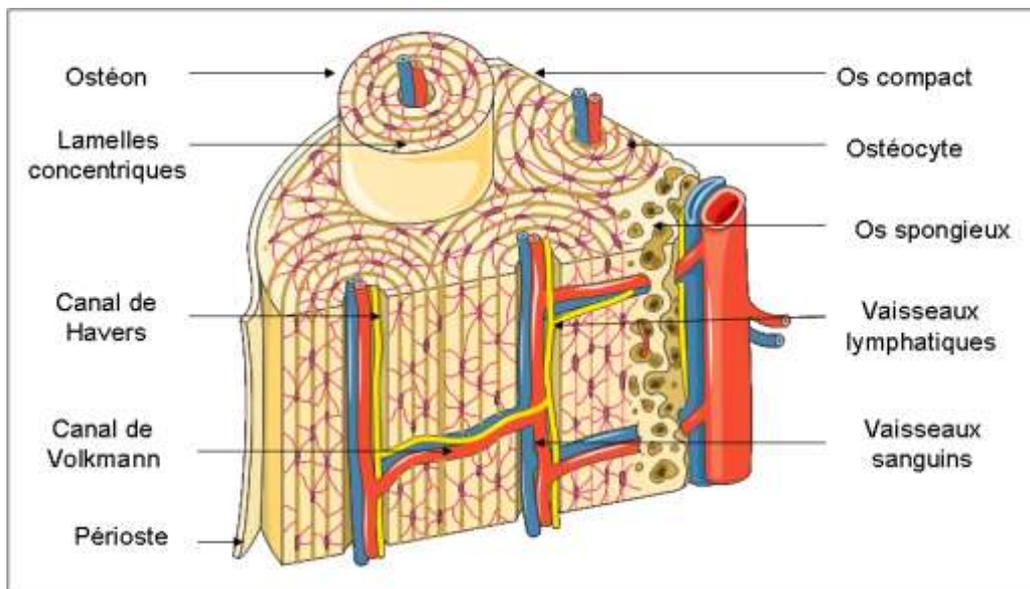


Figure 2 : Représentation de la structure des ostéons

b. L'os spongieux ou trabéculaire

L'os spongieux (30 à 90 % de porosité) est localisé principalement au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaires des os longs, ainsi que dans les os courts et plats (Halfter et al., 1998). Il est constitué de trabécules qui s'entremêlent dans la moelle osseuse jaune (tissu adipeux) ou rouge (hématopoïétique). L'os spongieux réalise des échanges avec la moelle osseuse : en effet il a un rôle hématopoïétique en permettant le développement des progéniteurs des différentes lignées sanguines.

c. Le périoste

Il s'agit de l'enveloppe externe qui entoure l'os sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion de tendons et de ligaments. Le périoste, très vascularisé, est constitué de deux couches :

- le périoste fibreux, externe, est constitué d'un réseau dense de fibres de collagène
- le périoste cellulaire, interne, abrite des cellules mésenchymateuses, des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoblastes et des ostéoclastes.

d. L'endoste

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

- L'endoste cortical tapisse l'os compact adjacent à la cavité médullaire
- L'endoste trabéculaire tapisse les travées osseuses d'os spongieux qui bordent la moelle osseuse
- L'endoste ostéonien entoure les canaux de Havers et de Volkmann.

II. Composition du tissu osseux

1. Généralités

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

La fraction organique contient :

- Les cellules de la lignée ostéoblastique qui comprend les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.
- Les cellules de la lignée ostéoclastique qui comprend les préostéoclastes et les ostéoclastes.
- La matrice extracellulaire.

La fraction minérale est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite.

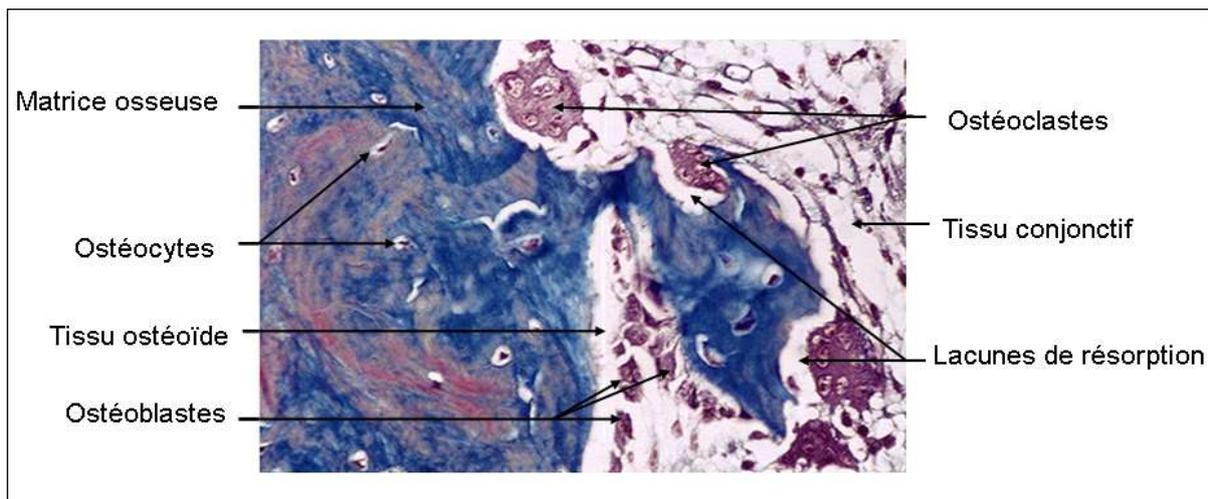


Figure 3 : Coupe histologique de tissu osseux

2. Les cellules souches à l'origine des tissus squelettiques

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 et macrophages. Le stroma contient un panel de cellules multipotentes regroupées sous le nom de cellules souches mésenchymateuses (MSC). La moelle osseuse contient en réalité une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques (1 à 2 %) et de cellules souches mésenchymateuses (moins de 0,5%) par rapport aux cellules totales (Strauer et Kornowski, 2003).

a. Les cellules souches mésenchymateuses

Localisation

Les cellules souches mésenchymateuses sont localisées principalement dans le stroma médullaire, mais on peut les retrouver au niveau du périoste et de l'endoste. Même si la principale réserve de MSC est la moelle osseuse, les MSC sont également retrouvées dans les tissus musculaires, adipeux mais aussi dans le sang de cordon et le sang périphérique. Leur nombre diminue avec l'âge (Caplan, 2007).

Caractéristiques

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules immatures (très peu différenciées) caractérisées par :

- un potentiel d'auto-renouvellement
- une capacité de différenciation en plusieurs lignées cellulaires : ostéocyte, adipocyte, chondrocyte...
- un potentiel immunorégulateur en inhibant la prolifération des lymphocytes T (Djouad et al., 2003)

- une capacité de migration vers les tissus inflammés
- l'expression de divers marqueurs membranaires (dépendant de l'espèce) qui peuvent être utilisés pour les sélectionner in vitro (Pontikoglou et al., 2008). Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD90 (cluster de différenciation 90 ; tyrosine kinase), CD105 (endoglin), CD29 (B1 intégrine), CD44 (récepteur acide hyaluronique), CD73, CD166 CD49 et l'absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques, érythrocytaires, plaquettaires et endothéliaux (Abdi et al., 2008).

Différenciation

Les cellules souches mésenchymateuses ont une certaine plasticité et peuvent se différencier dans la voie ostéoblastique, chondrocytaire, adipocytaire (Zou et al., 2008), myocytaire, endothéliale, et peut être même neuronale (Jackson et al., 2007). La différenciation vers l'une ou l'autre voie implique l'expression temporelle de facteurs de transcription.

- Les cellules de la lignée ostéoblastique sont des cellules mononucléées d'origine mésenchymateuse (Owen, 1988) différenciées notamment grâce au facteur de transcription **cbfa-1/Runx2**. La délétion génique de ce facteur chez la souris (knock-out) entraîne l'absence de tissu osseux: les maquettes des os sont présentes et de forme normale mais elles ne sont constituées que de cartilage
- L'expression de **Sox-9** induit la voie chondroblastique
- L'expression de **MyoD** induit la voie myoblastique
- L'expression du peroxyosome **PPAR γ 2** (*proliferator activated receptor gamma 2*) induit la différenciation adipocytaire

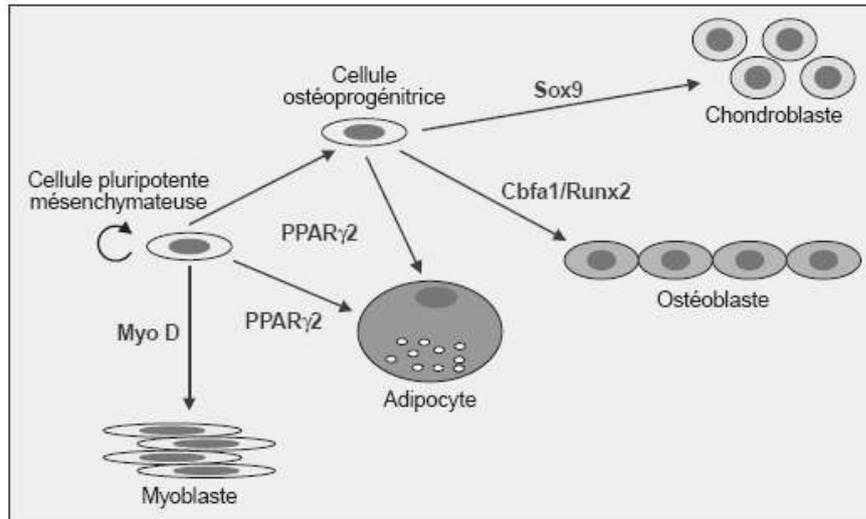


Figure 4 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Marie, 2001)

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent être cultivées ex-vivo et leur différenciation peut être induite dans des conditions de cultures particulières (Tirode et al., 2007). Ces propriétés en font des candidats intéressants pour diverses applications thérapeutiques et notamment pour la régénération tissulaire (Kumar et al., 2008).

b. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont caractérisées par les marqueurs CD34 et CD133 et n'expriment pas CD2, CD14, CD16, CD19, CD24 et CD56 (Jaatinen et Laine, 2007). Ces cellules sont capables d'auto-renouvellement et de donner naissance à différents lignages.

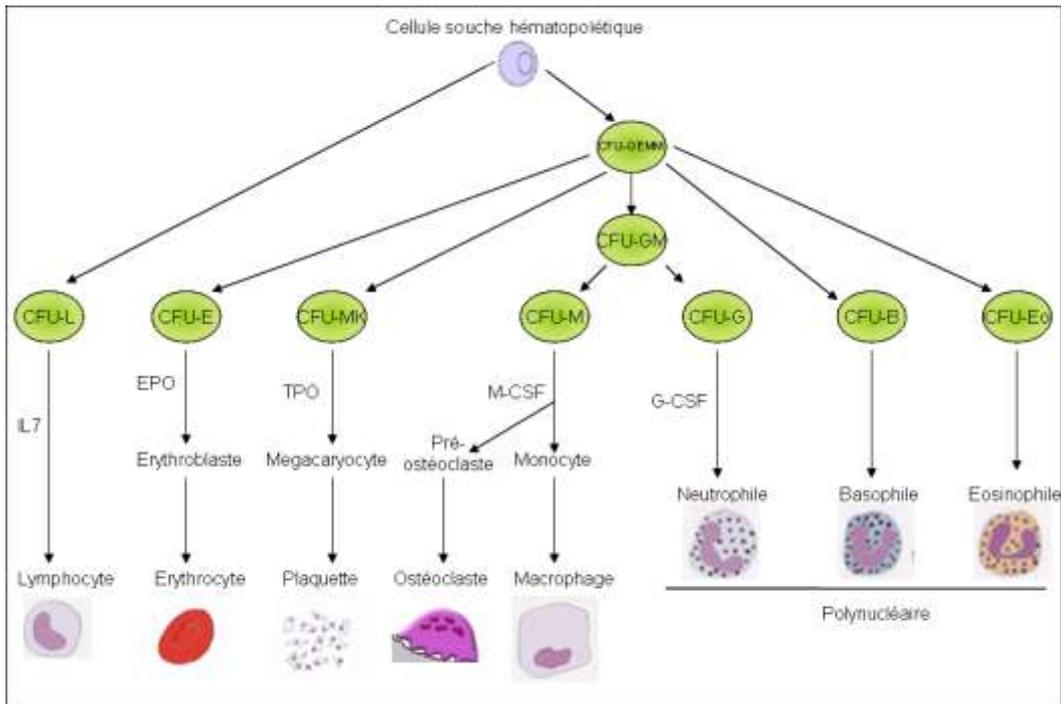


Figure 5 : Schéma de l'hématopoïèse

Parmi les différents types cellulaires formés, les cellules souches hématopoïétiques donnent naissance aux cellules mononucléées appelées CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte-Macrophage). Ces cellules peuvent alors se différencier en ostéoclaste mononucléé après chimiotactisme vers un site de résorption, puis fusionnent pour former un ostéoclaste multinucléé (Suda et al., 1995).

3. Les cellules de la lignée ostéoblastique

a. Le préostéoblaste

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

b. L'ostéoblaste

L'ostéoblaste correspond au stade de différenciation suivant le préostéoblaste. Les ostéoblastes permettent la synthèse et la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse au cours de la croissance et le renouvellement de la matrice chez l'adulte (Manolagas, 2000).

Les ostéoblastes ont une disposition pseudo-épithéliale et communiquent entre eux par des jonctions gap. Le noyau est situé au pôle basal et la partie apicale du cytoplasme contient de nombreux organites permettant une activité de synthèse importante. Les ostéoblastes reposent sur une couche de tissu constitué de collagène, de protéines non collagéniques (ostéocalcine, décorine) et de glycosaminoglycanes, non encore minéralisé appelé tissu ostéoïde.

Les ostéoblastes libèrent la phosphatase alcaline, une enzyme hydrolysant les esters phosphoriques qui sont des inhibiteurs de la minéralisation. Cette enzyme, dosable dans le sérum, est donc un index de la formation osseuse. Les ostéoblastes synthétisent également des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme et des facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines et notamment stimuler la formation ou l'activité des ostéoclastes (Matsuo et Irie, 2008). Certains de ces facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et seront ultérieurement libérés quand l'os sera résorbé

c. L'ostéocyte

L'ostéocyte apparaît quand l'ostéoblaste est emmuré dans la matrice minéralisée. 10 à 20% des ostéoblastes deviennent des ostéocytes. L'ostéocyte, situé dans une logette appelée ostéoplaste, est relié aux autres cellules par un réseau de canalicules dans lesquels l'ostéocyte émet de fins prolongements (Franz-Odenaal et al., 2006). L'ostéocyte a un niveau d'activité métabolique bien inférieur à celui de l'ostéoblaste, mais du fait de sa localisation, il joue un rôle dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux et qui influencent son métabolisme.

d. La cellule bordante

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

e. Marqueurs exprimés au cours de la différenciation de l'ostéoblaste

La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par plusieurs vagues d'expression de gènes ostéoblastiques. Les gènes précoces sont le PTH-R (récepteur de la PTH), ALP (phosphatase alcaline), ColII (collagène de type I) et OP (ostéopontine). Les gènes tardifs sont la BSP (sialoprotéine osseuse) et OC (ostéocalcine).

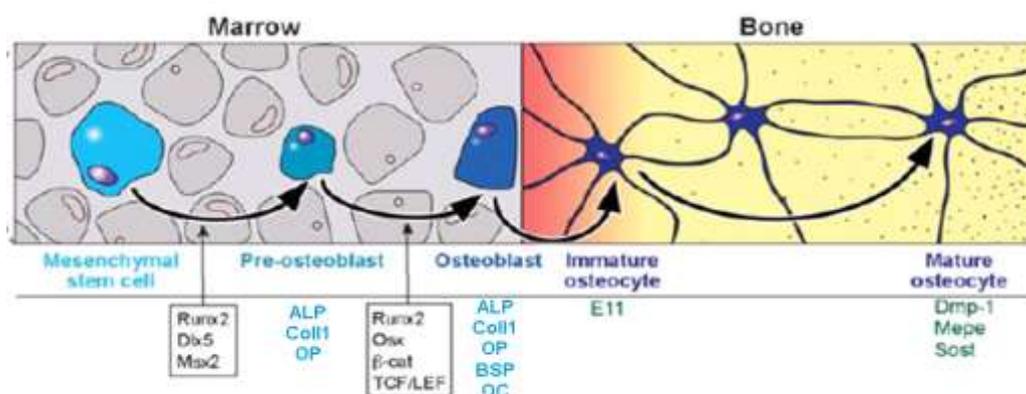


Figure 6: Différenciation ostéoblastique (d'après Marie, 2001 ; Robling et al., 2006)

4. Les cellules de la lignée ostéoclastique

Les ostéoclastes sont de grandes cellules (100µm) plurinucléées (10-20 noyaux en moyenne), formées par la fusion de cellules mononucléées d'origine hématopoïétique dérivées des cellules de la lignée monocyte macrophage (Suda et al., 1995).

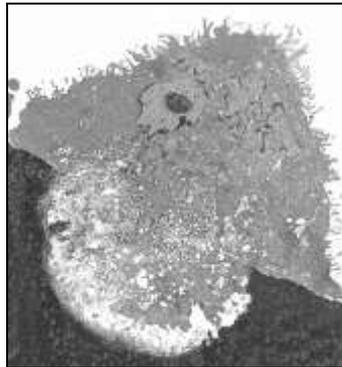


Figure 7: Ostéoclaste dégradant la matrice osseuse

Les ostéoclastes sont responsables, par la production d'enzymes protéolytiques, de la dégradation de la matrice organique osseuse, et par acidification du milieu, de la solubilisation de la fraction minérale de l'os. Le pôle basal de la cellule en contact avec l'os présente une membrane plissée permettant des échanges métaboliques nombreux. La zone de contact proprement dite est dénuée de tout organite (zone claire) alors que par ailleurs le cytoplasme est chargé de très nombreuses vacuoles, vésicules et lysosomes. Les ostéoclastes sont des cellules hautement mobiles.

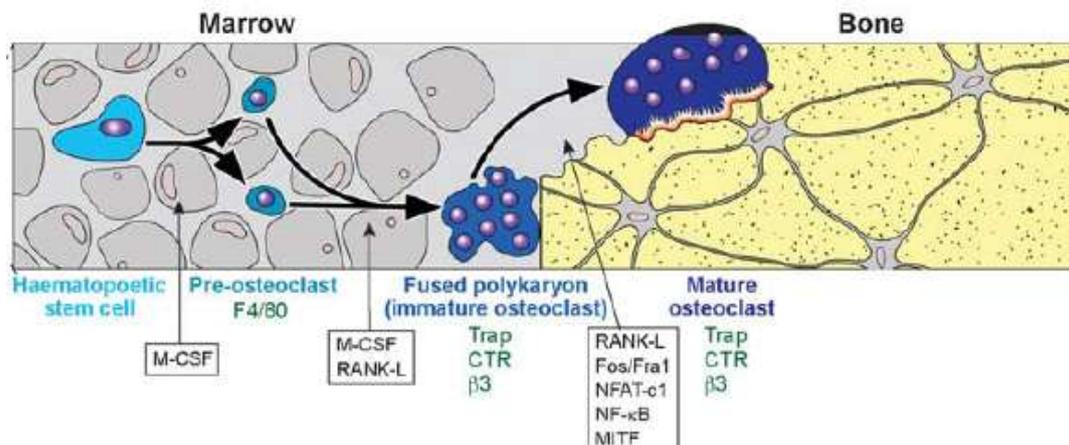


Figure 8 : La différenciation ostéoclastique au sein du tissu osseux (Robling et al., 2006)

5. Interactions ostéoblaste / ostéoclaste

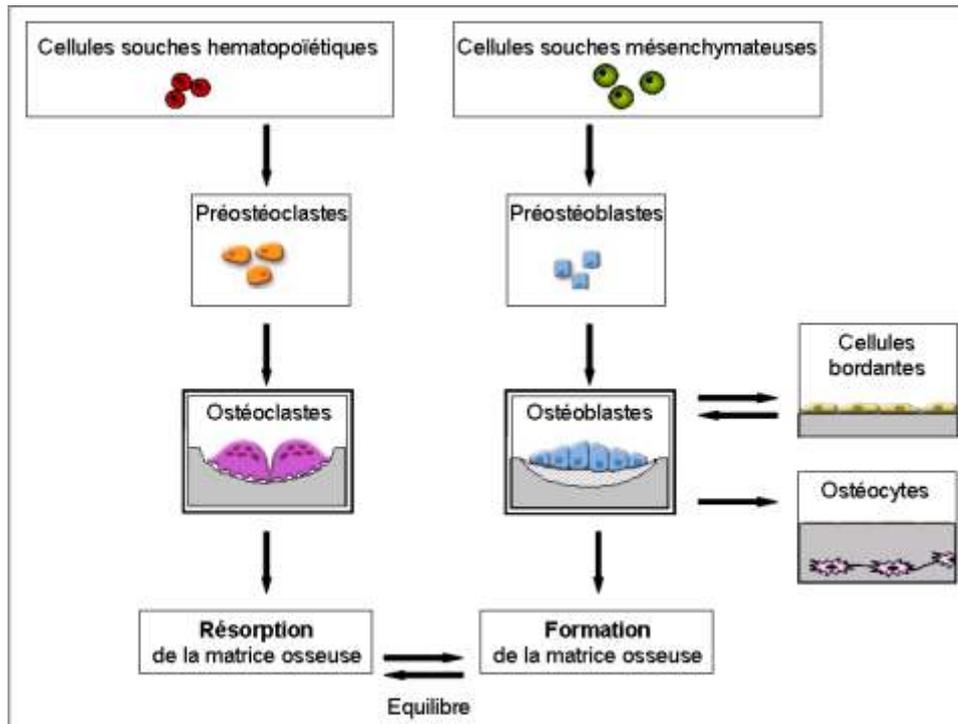


Figure 9 : Différenciation ostéoblastique et ostéoclastique

De manière générale l'homéostasie du tissu osseux repose sur 2 types cellulaires aux actions antagonistes :

- l'ostéoblaste permettant la formation de la matrice osseuse
- l'ostéoclaste impliqué dans la résorption de la matrice osseuse

Mais ces deux types cellulaires ne sont pas totalement indépendants puisque les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes. En culture cellulaire, les ostéoclastes sont incapables de détruire l'os en l'absence d'ostéoblastes ou de leurs produits de sécrétion (Fauchoux et al., 2001 ; Baron, 2001). L'ostéoblaste est donc impliqué à la fois dans l'ostéogenèse et dans l'ostéolyse. Il sécrète des facteurs solubles régulateurs de l'ostéoclastogenèse (Ducy, 2001 ; Lacey et al., 1998 ; Yasuda et al., 1998) : l'ostéoprotégérine (OPG), RANKL (receptor activator of NFκB ligand), des facteurs de stimulation de colonies de macrophages (M-CSF), le tumor necrosis factor (TNF) ou des interleukines (IL-1, IL-6, IL-11).

6. La matrice extracellulaire

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

- **la substance fibrillaire** (90 %) contient des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine)

- **la substance interfibrillaire** (10 %) englobe les glycosaminoglycanes et protéoglycanes, des petites protéines non collagéniques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités.

a. Le collagène de type I (Coll I)

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

b. L'ostéopontine (OP)

L'ostéopontine est une glycoprotéine riche en acide sialique ayant une grande affinité avec le calcium. Au niveau osseux, l'ostéopontine présente 3 activités : la régulation de l'adhésion des cellules osseuses, la régulation de la fonction des ostéoclastes et la régulation de la minéralisation de la matrice (Giachelli et Steitz, 2000).

c. La sialoprotéine osseuse (BSP)

La sialoprotéine osseuse est une glycoprotéine riche en acide sialique (Williams and Peacocke, 1965) impliquée dans la minéralisation initiale de l'os en se déposant sur la matrice extracellulaire et facilitant la formation des cristaux d'hydroxyapatite (Ganss et al., 1999).

d. L'ostéocalcine (OC)

L'ostéocalcine, synthétisée par les ostéoblastes, active les ostéoclastes et joue donc un rôle dans le renouvellement osseux. Elle capte des ions Ca^{2+} extracellulaires dont la concentration locale augmente. La concentration de cette protéine dans le sérum est ainsi le reflet du métabolisme osseux (Peretz, 1993).

e. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes polysaccharidiques et leur liaison covalente à une protéine forme les protéoglycanes. Ces molécules sont dotées d'un grand pouvoir osmotique et facilitent les phénomènes de diffusion. On peut citer l'héparan sulfate qui associé à la membrane plasmique est un corécepteur de facteurs influençant l'ostéogénèse (Nakano et al., 2004).

7. La fraction minérale

La minéralisation se déroule en 2 étapes

1- la sécrétion de la matrice ostéoïde sous forme de « bandes ». L'ostéoblaste produit les fibres de collagène qui sont orientées en fonction des contraintes mécaniques.

2- la minéralisation proprement dite. Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27 %) et le phosphore (12 %) dans un ratio égal à 1,66. Les taux de calcium et d'hydroxyde de phosphate augmentent progressivement grâce à l'ostéocalcine et à l'activité phosphatase alcaline de l'ostéoblaste. Ces ions précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite qui se fixent sur les fibres de collagène conférant à l'os sa solidité (Toppets et al., 2003).

Le squelette représente la principale réserve en calcium de l'organisme et celui-ci est rapidement mobilisable grâce à l'activation des ostéoclastes par certaines hormones et cytokines telles que RANK-L (Vaananen et Laitala-Leinonen, 2008).

III. Les remaniements physiologiques de l'os

1. La croissance osseuse

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

a. L'ossification membranaire

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

b. L'ossification périchondrale ou périostique

Cette ossification se produit autour des os : le tissu osseux est élaboré à partir d'un tissu conjonctif fibreux recouvrant une pièce cartilagineuse ou osseuse. L'ossification périostique permet la croissance en épaisseur de l'os et assure une augmentation du diamètre de la diaphyse osseuse ainsi que la formation des apophyses.

c. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le processus survenant au cours du développement en longueur des os longs. Dans ce cas, la formation osseuse est réalisée à partir d'une ébauche cartilagineuse et aboutit essentiellement à la formation d'os spongieux : le cartilage préexistant est détruit puis remplacé par de l'os.

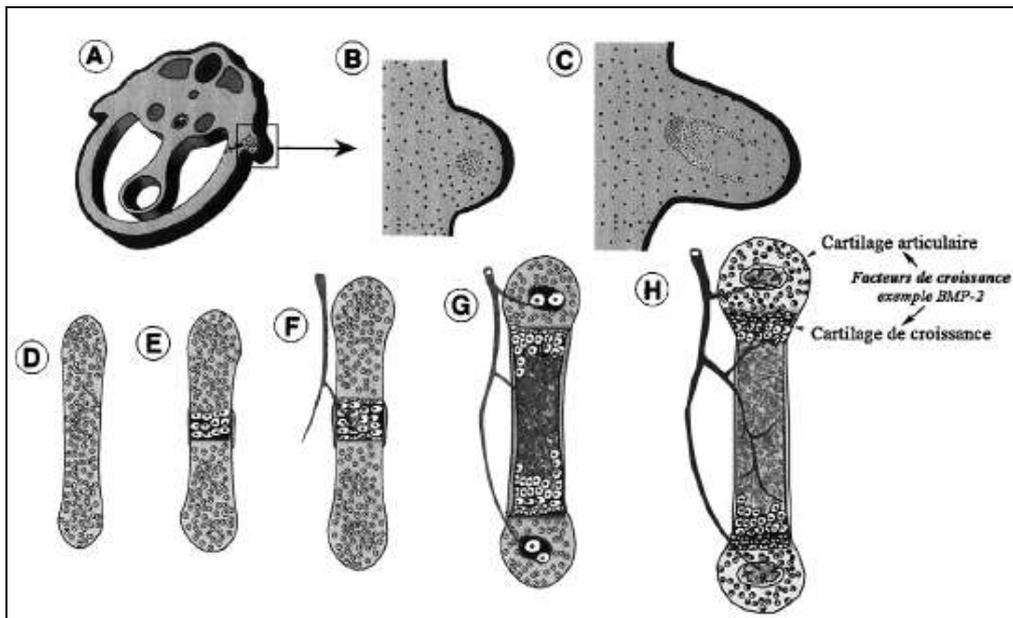


Figure 10 : Représentation des étapes de l'ossification endochondrale (Freyria et al., 2008).

Chez l'embryon, les cellules mésenchymateuses migrent (A), se condensent (B) et se différencient en chondrocytes (C) pour former l'ébauche d'un membre qui va s'individualiser (D). Dans la partie centrale des maquettes de cartilages, les cellules s'hypertrophient et la matrice se calcifie, alors qu'à la périphérie se différencient les cellules péri-chondrales (E). Les vaisseaux (F) acheminent les ostéoblastes permettant l'allongement de l'os et les ostéoclastes résorbant l'os pour créer l'espace contenant la moelle osseuse hématopoïétique (G). La croissance continue alors au niveau des cartilages de croissance jusqu'à l'âge adulte (H). Vers l'âge de 18 ans, la plaque de croissance est remplacée par de l'os spongieux, ce qui provoque la fusion de l'épiphyse et de la métaphyse.

d. L'ossification haversienne

Il s'agit d'une ossification tertiaire survenant suite au remaniement d'un tissu osseux déjà élaboré pour lui permettre de mieux résister aux contraintes mécaniques : c'est la formation des ostéons. L'ossification haversienne survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs.

Les ostéoclastes creusent de larges canaux dans l'os lamellaire qui sont ensuite colonisés par des ostéoblastes. Les ostéoblastes sécrètent une matrice dans laquelle ils se retrouvent emmurés, jusqu'à la formation d'étroits canaux que sont les canaux de Havers et de Volkmann. L'os haversien va entièrement se substituer à l'os lamellaire périostique.

Les ostéons eux-mêmes subissent le processus de remaniement. Les plus anciens sont attaqués et érodés par des ostéoclastes, tandis qu'un nouvel ostéon se met en place. Ceci joue un rôle dans le maintien de la calcémie en stockant ou déstockant le calcium.

2. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant renouvellement, appelé remodelage osseux, grâce à un équilibre entre les phases de production par les ostéoblastes et les phases de résorption par les ostéoclastes (Manolagas, 2000). Le remodelage osseux peut être divisé en 5 phases.

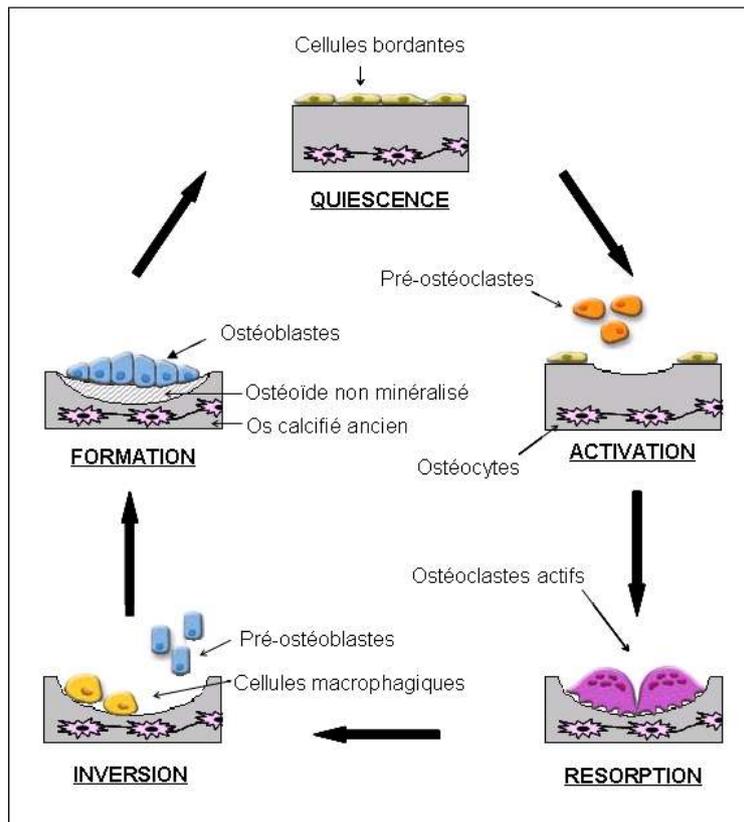


Figure 11 : Les étapes du remodelage osseux

a. Phase de quiescence

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

b. Phase d'activation

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

c. Phase de résorption

Les surfaces osseuses en phase de résorption présentent de petites zones concaves, les lacunes de Howship, sur lesquelles se trouvent des ostéoclastes différenciés. En plusieurs étapes (figure 12), l'ostéoclaste est capable de détruire la matrice organique (Vaananen et Laitala-Leinonen, 2008).

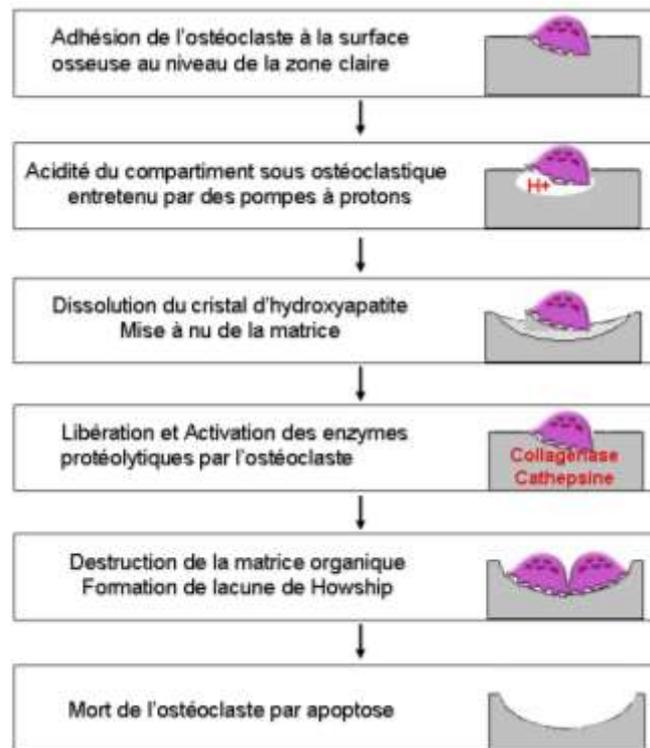


Figure 12 : Les étapes de la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes

d. Phase d'inversion

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

e. Phase de formation

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

IV. Le tissu cartilagineux

1. Composition du tissu cartilagineux

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

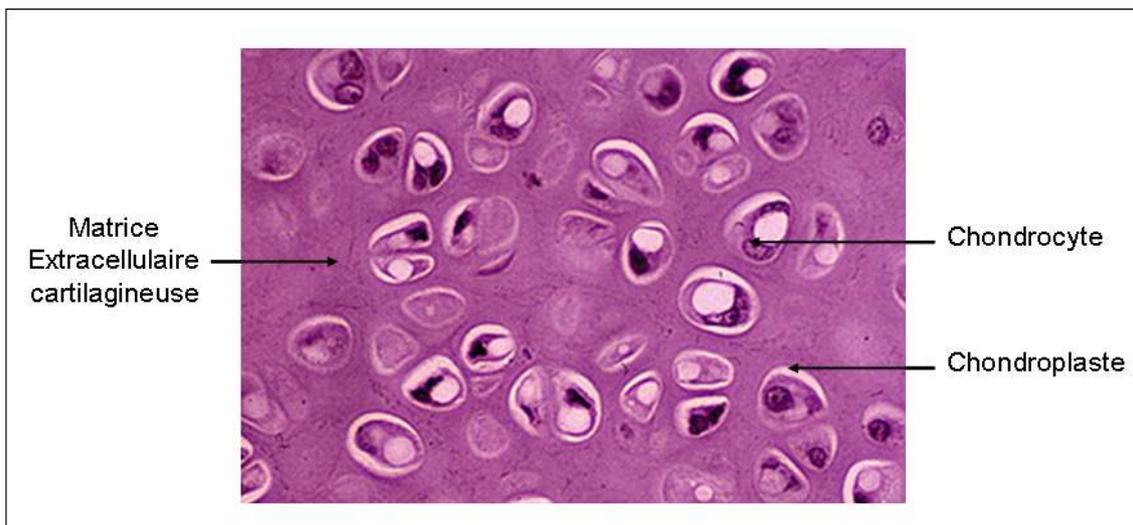


Figure 13 : Coupe de cartilage hyalin

a. Chondrocytes

Les chondrocytes proviennent des cellules souches mésenchymateuses (MSC) qui se sont différenciées notamment sous l'effet du facteur de transcription SOX9. Les chondrocytes sont des cellules volumineuses qui assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants de la MEC cartilagineuse. Ils possèdent des récepteurs pour l'hormone de croissance, les vitamines A et D, la parathormone, les glucocorticoïdes et les œstrogènes (Gaissmaier et al., 2008).

b. Matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire (MEC) contient diverses molécules lui conférant ses caractéristiques :

- L'eau représente 70 à 80 % du poids de la MEC et permet la déformabilité des cartilages
- Le collagène de type II (Coll II) est le collagène le plus abondant dans la MEC
- L'aggrécane est le protéoglycane le plus représenté, il donne au cartilage ses propriétés mécaniques de compressibilité et d'élasticité
- La chondroïtine-sulfate et la kératane-sulfate sont des glycosaminoglycanes très hydrophiles, favorisant la teneur élevée en eau et l'élasticité du cartilage
- L'acide hyaluronique est associé aux glycosaminoglycanes sulfatés
- La chondronectine est une protéine non collagénique
- Les métalloprotéinases matricielles et aggrécanasés sont des enzymes protéolytiques permettant la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement

c. Périchondre

Tous les cartilages de l'organisme sont recouverts de périchondre à l'exception des cartilages articulaires et des cartilages nasaux, costaux et épiphysaires. Le périchondre est un tissu conjonctif formé de fibroblastes et d'un réseau dense de fibres de collagène. Contrairement au cartilage, le périchondre est un tissu vascularisé qui joue un rôle dans la nutrition, la croissance et la réparation du cartilage. Les cellules du périchondre produisent le collagène de type I du périchondre.

2. Classification histologique des cartilages

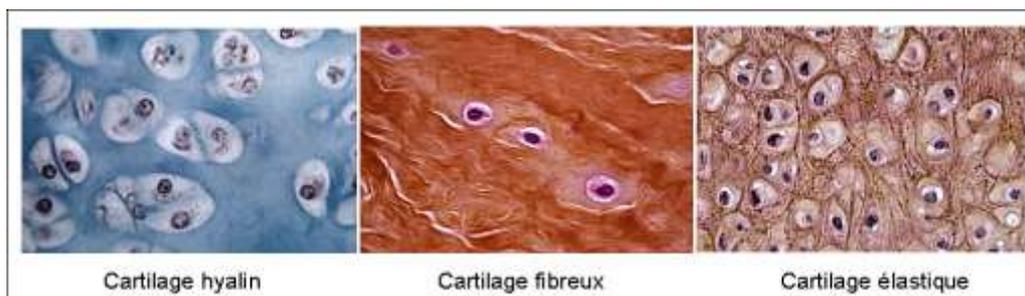


Figure 14 : Coupes histologiques des 3 types de cartilage

On distingue 3 variétés histologiques de cartilage selon la richesse de la MEC en fibres de collagènes ou élastiques.

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 collagène II et XI, de petite taille et peu nombreuses, sont disposées en un réseau à mailles larges. Le cartilage hyalin peut être localisé au niveau articulaire (à la surface des articulations mobiles de type synoviale en continuité du périoste de l'os) ou non articulaire (cloison nasale, cartilage thyroïde, côtes flottantes). Le cartilage de conjugaison est un cartilage hyalin situé entre la métaphyse et l'épiphyse de l'os assurant la croissance en longueur de celui-ci.

Le cartilage fibreux est formé de MEC contenant d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I orientés le long des lignes de force, le rendant très résistant aux tractions. Ce type de cartilage est retrouvé dans les disques intervertébraux de la colonne vertébrale ou les ménisques du genou.

Le cartilage élastique présente une densité cellulaire très importante et de nombreuses fibres élastiques disposées en un réseau tridimensionnel. Ceci permet de maintenir la forme de la structure cartilagineuse en lui conférant une grande flexibilité. On retrouve le cartilage élastique notamment dans l'oreille externe et l'épiglotte.

3. Croissance et différenciation

Il existe 2 mécanismes de croissance des chondrocytes, la croissance interstitielle et la croissance par apposition, mais à l'âge adulte, il n'y a plus de régénération du cartilage, ainsi toute anomalie sera irréversible.

- La croissance interstitielle est rare chez l'adulte. Les chondrocytes réalisent des mitoses successives pour aboutir à un groupe de chondrocytes (groupe isogénique)

- La croissance par apposition à lieu à partir du périchondre. Les MSC de la couche interne du périchondre se différencient en chondroblastes puis en chondrocytes pour produire le collagène de type II ainsi que la matrice cartilagineuse.

Au niveau des cartilages de croissance, les chondrocytes deviennent hypertrophiques, puis recrutent des ostéoblastes pour permettre une ossification endochondrale (Karsenty, 2001). Lors de leur différenciation, les cellules expriment d'abord l'aggrécane et le collagène de type II puis le collagène de type X, marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire (Adams et al., 2007 ; Freyria et al., 2008). Cependant cette théorie est controversée puisque certains chondrocytes expriment le collagène X mais pas le collagène II (Mwale et al., 2006) et il semblerait donc que les chondrocytes hypertrophiques perdent l'expression du collagène II.

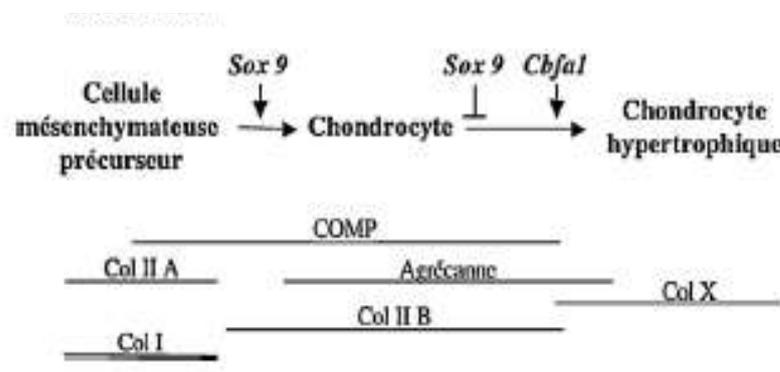


Figure 15 : Expression des marqueurs de la chondrogenèse (Freyria et al., 2008)

2ème PARTIE

LES

TUMEURS OSSEUSES PRIMITIVES

I. Diversité des pathologies tumorales osseuses

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

Les tumeurs osseuses primitives bénignes sont plus fréquentes que les tumeurs osseuses primitives 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 osseuses primitives malignes représentent environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et l'adolescent. On peut citer :

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

Les deux principaux types de tumeur osseuse maligne chez l'enfant sont l'ostéosarcome et la tumeur d'Ewing qui constituent environ 90% de l'ensemble des tumeurs osseuses malignes pédiatriques (Desandes et al., 2004).

Les tumeurs osseuses secondaires correspondent aux métastases osseuses. Si la majorité des cancers peuvent métastaser à l'os, certaines tumeurs sont plus ostéophiles telles que les tumeurs du sein, de la prostate, de la thyroïde, du poumon et du rein.

II. Les Ostéosarcomes

1. Définition

L'ostéosarcome est défini comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales dérivées des ostéoblastes (Tomeno et Forest, 1990). Radiologiquement c'est une tumeur très agressive, avec appositions périostées, destruction de la corticale, et envahissement des parties molles. La tumeur peut être purement lytique, condensante, ou le plus souvent mixte.



Figure 16 : Radiographie d'un ostéosarcome du fémur

2. Histologie

L'ostéosarcome existe sous diverses formes histologiques :

- ostéosarcome ostéoblastique
- ostéosarcome chondroblastique
- ostéosarcome fibroblastique à petites cellules
- ostéosarcome à cellules géantes
- ostéosarcome très différencié
- ostéosarcome télangiectasique (Murphey et al., 2003)

3. Epidémiologie

C'est une tumeur rare puisque le nombre de nouveaux cas par an en France est estimé entre 150 et 200. Toutefois, l'ostéosarcome représente la tumeur osseuse maligne primitive la plus fréquente après le myélome. L'ostéosarcome survient généralement dans une population jeune, avec une médiane d'âge de 18 ans et touche 1,4 fois plus fréquemment les garçons que les filles.

4. Localisations

Les os longs sont atteints dans 90 % des cas, le genou dans deux tiers, la métaphyse étant la plus souvent affectée. L'ostéosarcome est surtout retrouvé au niveau de la diaphyse du fémur, du tibia ou de l'humérus mais il existe aussi des ostéosarcomes du tronc et du crâne. La présence de métastases est parfois rencontrée notamment au niveau pulmonaire, et plus rarement au niveau osseux (Jaffe et al., 2002).

5. Etiologie

L'étiologie de l'ostéosarcome reste inconnue, cependant certains facteurs de risque peuvent être impliqués dans la pathogenèse et la résistance des ostéosarcomes (Walkley et al., 2008) :

- de multiples dérégulations des protéines contrôlant le cycle cellulaire (p53, Rb, p16, MDM2...).
- les prédispositions génétiques telles que le rétinoblastome héréditaire (mutation du gène *Rb*), le syndrome de Li-Fraumeni (mutation de la p53) et le syndrome de Rothmund-Thomson (troubles cutanés liés à une mutation sur le chromosome 8).
- les radiations ionisantes utilisées à forte dose
- la maladie de Paget pour laquelle l'ostéosarcome apparaît suite à une modification pathologique du remodelage osseux (Horn et al., 1990).

6. Traitements

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 (Bielack et al., 2002). Avec les thérapeutiques actuelles, la survie des patients à 5 ans est de 60 à 70 % mais chute à 30 % lorsque des métastases pulmonaires sont présentes lors du diagnostic.

a. Chirurgie

L'objectif de la chirurgie est de pratiquer l'ablation de la tumeur tout en conservant la fonction de l'os touché. La conservation du membre est maintenant possible chez la grande majorité des patients (> 90 %), mais l'amputation reste la seule solution en cas de tumeur trop volumineuse envahissant les tissus mous avoisinants. La reconstruction pour les ostéosarcomes du genou se fait le plus souvent par endoprothèse.

b. Chimiothérapie

Les 2 objectifs de la chimiothérapie, en association à la chirurgie, sont :

- la réduction de la masse tumorale pour faciliter la résection tumorale et donc diminuer le risque de récurrence locale
- l'éradication des micrométastases pour limiter le risque de récurrence à distance.

Les cytotoxiques utilisés dans l'ostéosarcome sont le méthotrexate à haute dose, la doxorubicine, le cisplatine et l'ifosfamide.

III. Les Sarcomes d'Ewing

1. Définition

Ce sarcome a initialement été identifié par James Ewing comme dérivant des cellules endothéliales. En fait, le sarcome d'Ewing appartient à la catégorie des lésions à petites cellules rondes ; ces cellules sont peu différenciées et dérivent des MSC (Tirode et al., 2007).

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



Figure 17: IRM de sarcome d'Ewing du bassin

2. Histologie

Les tumeurs d'Ewing existent sous plusieurs formes :

- tumeur osseuse primitive
- tumeur histologiquement proche touchant les tissus mous
- tumeur neuroectodermique.

3. Epidémiologie

Les tumeurs d'Ewing surviennent le plus souvent dans la seconde décade de la vie : la moyenne d'âge est de 13 ans et en France l'incidence annuelle est de 3.2 nouveaux cas par million d'enfants de moins de 15 ans (Desandes et al., 2004).

4. Localisation

La moitié des sarcomes d'Ewing atteint les os longs (principalement le fémur, tibia et humérus) et la moitié est centrale (thorax ou bassin). Les sarcomes d'Ewing s'accompagnent de tumeurs des parties molles souvent volumineuses en particulier au niveau des os plats. Les sarcomes d'Ewing totalement extra osseux sont très rares. Le risque de métastases est très important notamment au niveau pulmonaire (Bernstein et al., 2006).

5. Etiologie

a. Translocation chromosomique caractéristique

- **Les différents types de translocation**

Ces tumeurs sont toujours associées à une translocation chromosomique qui peut être détectée par PCR. Dans la majorité des cas, cette translocation fait intervenir le gène EWS et un gène de la famille ETS (Tableau I), mais il existe également d'autres types de translocation beaucoup plus rares (Arvand et Denny, 2001).

Localisation de la translocation	Gènes fusionnés	Occurrence
t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	85 %
t(21,22)(q22;q12)	EWS-ERG	10 %
t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	1 %
t(17;22)(q12;q12)	EWS-ETV4	1 %
t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	1 %
t(21,16)	FUS-ERG	1 %

Tableau I: Translocations caractéristiques du sarcome d'Ewing (Riggi et Stamenkovic, 2007)

Parmi ces translocations, EWS-FLI1 est de loin la plus fréquente. Trois variants de cette translocation sont connus selon les exons appariés (Figure 16); le type I est moins prolifératif et de meilleur pronostic que les autres (de Alava et al., 2000).

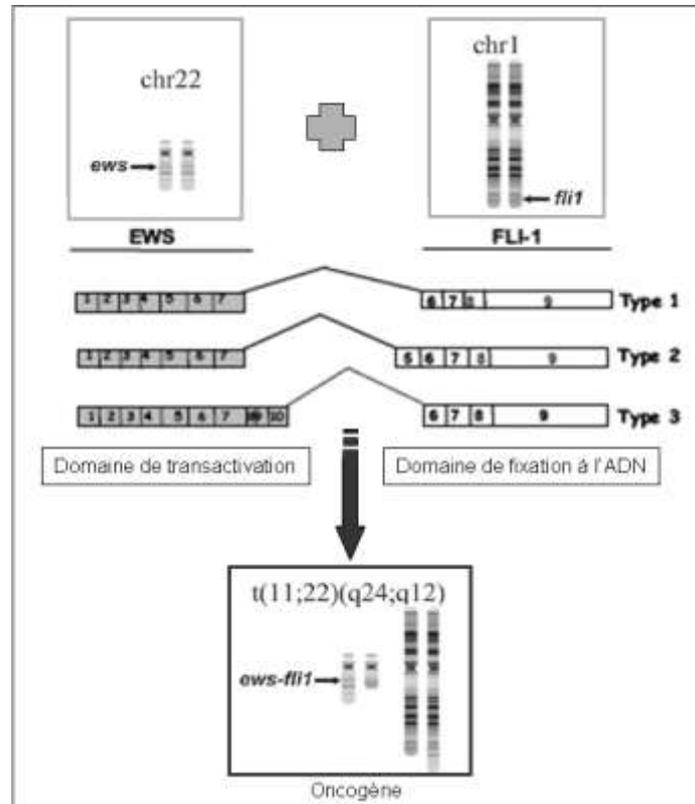


Figure 18 : Les différents types de translocation EWS-FLI1 (d'après Gonzalez et al., 2007)

- Rôle de EWS-FLI1 dans l'oncogénèse

Toutes ces translocations aboutissent à l'expression par les cellules tumorales de protéines de fusion exerçant leur action oncogénique en modifiant l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la différenciation.

La protéine de fusion formée peut par exemple induire un effet pro-prolifératif par le blocage de p21 (Nakatani et al., 2003) et de p27 (Matsunobu et al., 2004) ; p21 et p27 étant des protéines inhibitrices du cycle cellulaire.

La protéine de fusion peut également inhiber la différenciation ou l'apoptose en se comportant comme un facteur de transcription ou en coactivant d'autres facteurs de transcription de nombreux gènes critiques (Hu-Lieskovan et al., 2005).

La seule addition du gène EWS-FLI1 à des MSC leur donne un phénotype tumoral caractéristique des sarcomes d'Ewing (Riggi et al., 2005), empêche leur différenciation (Torchia et al., 2003) et induit le développement de tumeur d'Ewing chez la souris après injection de ces cellules (Castillero-Trejo et al., 2005).

b. Autres mutations

Outre EWS-FLI1, d'autres mutations aspécifiques peuvent être retrouvées : p16 est souvent sous exprimé dans les sarcomes d'Ewing et constitue un facteur d'agressivité de la tumeur (Kovar et al., 1997). Alors que p53 est mutée dans plus de 50% des tumeurs, dans les sarcomes d'Ewing cette mutation n'est retrouvée que dans 10% des cas mais EWS-FLI1 pourrait directement bloquer la voie p53 pour induire la tumorigenicité (Rorie et Weissman, 2004). L'effet de toutes ces délétions peut se cumuler puisque la délétion conjointe de p53, p16 et p14 définit un groupe de tumeurs très résistantes à la chimiothérapie (Huang et al., 2005 ; Tsuchiya et al., 2000).

6. Diagnostic

Le diagnostic du sarcome d'Ewing est basé sur l'imagerie ainsi que sur des techniques d'immunohistochimie, RT-PCR et hybridation in situ pour rechercher la protéine ou le transcrit EWS-FLI1 ou le marqueur CD99 (Barr et Womer, 2007 ; Jambhekar et al., 2006).

7. Traitements

La chirurgie prend actuellement une place de plus en plus importante dans la prise en charge de ce type de tumeur.

La chimiothérapie a pour but de prévenir l'apparition de métastases dans les formes localisées ou de les stériliser dans les formes métastatiques. Les cytotoxiques utilisés sont la vincristine, l'actinomycine D, l'adriamycine et le cyclophosphamide. L'ifosfamide ou l'étoposide peuvent être utilisés comme adjuvants.

La radiothérapie est fréquemment utilisée dans les formes inopérables ou associée à la chirurgie du fait de la radiosensibilité des tumeurs d'Ewing.

Grâce à ces traitements, la survie à 5 ans de ce type de tumeur est de 60 % mais chute à 10 % dans les cas de récurrence (Rodriguez-Galindo et al., 2008). Dans les maladies métastatiques au diagnostic, les patients traités par de la chimiothérapie conventionnelle rechutent très fréquemment et les taux de survie ne dépassent pas 15 à 20 %.

IV. Les Chondrosarcomes

1. Définition

Les chondrosarcomes sont des tumeurs osseuses formatrices de cartilage (Chen et al., 2008). Les chondrosarcomes seraient des tumeurs dérivant des cellules souches mésenchymateuses, puis différenciées secondairement dans la voie chondrocytaire (Boeuf et al., 2008).



Figure 19 : IRM de chondrosarcome du fémur

2. Histologie

Il existe différents sous types histologiques de chondrosarcome:

- 85% des chondrosarcomes sont dits conventionnels et peuvent être centraux (originaire de la cavité médullaire de l'os) ou périphériques (à partir de la capsule cartilagineuse) avec des survies à 10 ans de 90% à 40% selon les grades histologiques.
- 15% sont des chondrosarcomes dédifférenciés ou des chondrosarcomes mésenchymateux et sont plus agressifs avec des survies à 10 ans respectivement de 10% et 25% (Rozeman et al., 2006).

3. Epidémiologie

Bien qu'étant des tumeurs rares, les chondrosarcomes représentent le deuxième type de tumeur osseuse le plus fréquent chez l'adulte après l'ostéosarcome et sont exceptionnels chez l'enfant. 3,8% des chondrosarcomes surviennent avant 20 ans et 50% après 40 ans.

4. Diagnostic

Le problème du diagnostic des tumeurs cartilagineuses est la distinction entre bénignité (chondrome, chondromatose) et malignité (chondrosarcome de bas grade). Le diagnostic est basé sur des critères cliniques, radiologiques et histologiques. Le chondrosarcome est caractérisé comme une tumeur :

- cartilagineuse
- douloureuse
- localisée aux ceintures ou aux segments proximaux
- dont la taille est supérieure à 5 cm
- hétérogène, à contours flous
- entraînant une soufflure, un épaissement cortical, une réaction périostée,
- envahissant les parties molles
- entraînant une hyperfixation scintigraphique.

5. Thérapeutique

Le traitement actuel est uniquement chirurgical et consiste en une exérèse large de la tumeur. Les chondrosarcomes sont chimiorésistants du fait de leur faible vascularisation qui pose des problèmes pour la biodistribution des chimiothérapies. Des altérations de p53 et des délétions de p16 et p14 sont retrouvées fréquemment et sont également responsables de la résistance aux chimiothérapies (Papachristou et al., 2006). Néanmoins quelques approches moléculaires sont en cours d'étude comme les anti-angiogéniques ou les inhibiteurs des stéroïdes (Rozeman et al., 2006). Le chondrosarcome est également réfractaire à la radiothérapie.

V. Nouveaux protocoles thérapeutiques

Les thérapeutiques actuelles des tumeurs osseuses primitives n'étant pas satisfaisantes de par les effets secondaires et le faible taux de survie, de nouveaux traitements doivent être proposés aux patients.

Dans le paysage de la cancérologie, le développement des tumeurs osseuses est dépendant de 2 composantes que sont la prolifération tumorale et la résorption osseuse (Figure 20). En effet, les cellules tumorales qui prolifèrent libèrent des facteurs pouvant activer les ostéoblastes. Ceux-ci produisent la cytokine RANK-L qui permet d'activer les ostéoclastes grâce au récepteur RANK. Les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse, libérant alors des facteurs de croissance capables d'activer la prolifération tumorale. Il apparaît alors un cercle vicieux entre prolifération tumorale et ostéolyse (Ando et al., 2008).

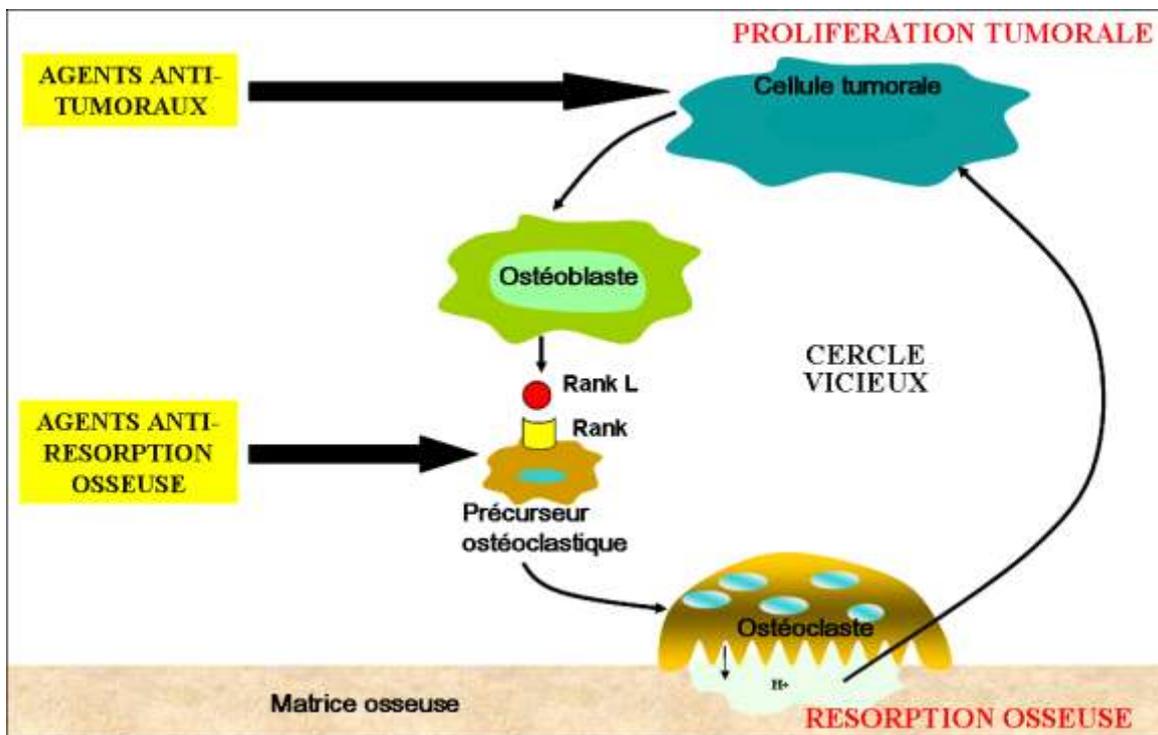


Figure 20 : Problématique du développement tumoral en site osseux

Il existe donc 2 grandes approches possibles pour traiter les tumeurs osseuses primitives en bloquant ce cercle vicieux :

- *Soit en empêchant la résorption osseuse*, notamment en inhibant l'activation des précurseurs ostéoclastiques par l'Ostéoprotégérine (récepteur soluble de RANK-L empêchant sa fixation à RANK) (Lamoureux et al., 2007). Un inhibiteur de la résorption osseuse de la famille des bisphosphonates, le Zolédronate, déjà utilisé dans le traitement de l'ostéoporose, fait par exemple partie d'un protocole d'essai clinique pour l'ostéosarcome nommé OS2006. Le Zolédronate est également à l'étude pour le traitement des sarcomes d'Ewing (protocole EUROEWING).

- *Soit en touchant directement la cellule tumorale* avec de nouveaux agents anti-cancéreux. Il existe différentes approches anti-cancéreuses : des agents pro-apoptotique (cytotoxique) ou anti-prolifératifs (cytostatique) ciblant les cellules tumorales. Ces agents peuvent être des molécules synthétisées chimiquement ou des molécules naturellement présentes dans l'organisme comme les cytokines. Dans le cadre de ce projet, nous choisissons d'étudier les cytokines de la famille de l'IL6.

3ème PARTIE ONCOSTATINE

M : UNE CYTOKINE DE

LA FAMILLE DE L'INTERLEUKINE 6

I. Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6

1. Définitions

Les cytokines sont des médiateurs solubles glycoprotéiques, produits par de nombreux types cellulaires après leur activation et actifs à de faibles concentrations. Elles permettent des communications très rapides entre des cellules présentes dans un même micro-environnement. Elles sont synthétisées et excrétées localement pour contribuer notamment à la réponse inflammatoire. Les cytokines peuvent exister sous différentes formes : soluble, membranaire ou intracytoplasmique et sont caractérisées par leur caractère pléiotrope et redondant. **La pléiotropie** caractérise la faculté des cytokines à agir sur de nombreuses cibles différentes, elles ont un large spectre d'activité. **La redondance** caractérise plusieurs cytokines ayant une même activité biologique.

Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 regroupent toutes les cytokines dont une partie du récepteur est la glycoprotéine gp130 ou une protéine apparentée telle que la gp1 (gp130 like). Cette famille regroupe actuellement 10 cytokines :

- **OSM** = Oncostatine M
- **LIF** = Leukaemia inhibitory factor
- **IL31** = Interleukine 31
- **IL6** = Interleukine 6
- **IL11** = Interleukine 11
- **IL27** = Interleukine 27
- **CNTF** = Ciliary NeuroTrophic Factor
- **CT1** = CardioTrophine-1
- **CLC** = Cardiotrophine-Like Cytokine
- **NP** = NeuroPoietine

2. Récepteurs

Les cytokines de la famille de l'IL6 exercent leurs activités grâce à un complexe de récepteur, formé de glycoprotéines transmembranaires, contenant au moins la protéine de transduction du signal gp130 ou la gpl (gp130 like). Seules les chaînes gp130, gpl, OSMRB et LIFR sont capables de transduire un signal (Figure 21)(Heinrich et al., 2003). La protéine gp130 est exprimée dans quasiment tous les types cellulaires.

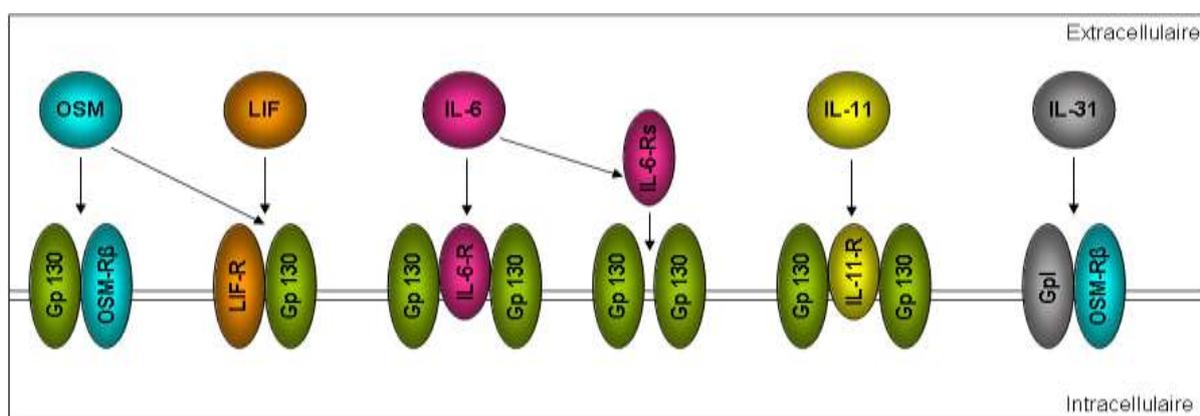


Figure 21 : Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 utilisées dans cette étude

L'IL6 se fixe à l'IL6R (IL6 récepteur) membranaire (IL6Rm) ou soluble (IL6Rs) physiologiquement présent, puis à un homodimère de gp130. L'IL6R est principalement exprimé par les hépatocytes, neutrophiles, monocytes/macrophages, et lymphocytes. L'IL6Rs est présent dans divers liquides biologiques, et est généré par la protéolyse limitée de l'IL6Rm ou par épissage alternatif de l'ARNm de l'IL6R (Toppets et al., 2004). L'IL6Rs peut permettre à des cellules possédant la gp130 mais pas l'IL6Rm de répondre à la cytokine IL6, ce mécanisme est appelé trans-signalisation.

Le LIF se fixe à un hétérodimère de gp130 et LIFR

L'OSM peut se fixer à 2 types de récepteur : un hétérodimère gp130 et OSMRB ou hétérodimère gp130 et LIFR

L'IL11 se fixe à l'IL11R et à un homodimère de gp130

L'IL31 se fixe à un hétérodimère gpl et OSMRB.

3. Activités biologiques

a. Activités communes

Les cytokines de la famille de l'IL6 ont des activités bien souvent redondantes du fait qu'elles utilisent des récepteurs très proches dans leur structure et leur fonctionnement. Elles sont également extrêmement pléiotropes et de façon générale, sont impliquées dans le développement, l'inflammation et la réparation de nombreux tissus tels le foie, les os et les systèmes nerveux et hématopoïétiques.

Inflammation

De manière générale les cytokines de la famille de l'IL6 sont impliquées dans l'inflammation et notamment dans l'induction de la production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation par le foie (Baumann et Gauldie, 1994). Dans des lésions inflammatoires cutanées de type psoriasis, dermatite atopique, il a été mis en évidence une surexpression d'IL6 (Neuner et al., 1991), d'IL11 (Ameglio et al., 1997), d'IL31 (Dillon et al., 2004 ; Sonkoly et al., 2006) et d'OSM (Boniface et al., 2007). Ces cytokines jouent également un rôle dans le développement des pathologies inflammatoires intestinales et du cancer colorectal (Atreya et Neurath, 2008) (Dambacher et al., 2007) (Ernst et al., 2008). Enfin, le ciblage de ces cytokines par des anticorps pourrait être une solution thérapeutique pour des pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou l'asthme (Ding et al., 2008 ; O'Hara et al., 2003 ; Richards, 2004).

Hématopoïèse

Directement sur les cellules hématopoïétiques ou indirectement par leur action sur les cellules stromales, les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent un rôle central dans l'hématopoïèse

fœtale et adulte. Elles peuvent favoriser la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, la production de globules rouges, de plaquettes, de neutrophiles...(Hirano, 1998; Broxmeyer et al., 2007).

Physiologie osseuse

Les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'os puisque l'inactivation du gène de la gp130 chez des souris entraîne la mort et de nombreuses anomalies du squelette (Shin et al., 2004). Ces cytokines stimulent le développement ostéoclastique et donc la résorption osseuse (Manolagas et al., 1995; Bozec et al., 2008; Walker et al., 2008) jouant un rôle dans l'ostéoporose post-ménopause (Poli et al., 1994).

Sur les ostéoblastes, elles ont montré un effet biphasique puisqu'à des stades très précoces de différenciation elles stimulent la différenciation et la minéralisation alors qu'à un stade plus tardif, elles inhibent la minéralisation (Malaval et Aubin, 2001).

b. Activités spécifiques

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

L'IL6 apparaît plus particulièrement impliquée dans la production des APP (acute phase proteins) par le foie (Kopf et al., 1994), l'ostéoporose post-ménopause (Poli et al., 1994) et l'arthrite rhumatoïde (Alonzi et al., 1998). Dans des modèles de tumeurs solides chez la souris, l'IL6 pourrait être un facteur de bon pronostic puisque le traitement par radiothérapie est amélioré si il est associé à l'administration d'IL6 + IL6Rs (Wei et al., 2007).

Le LIF est produit par de nombreux types cellulaires : lymphocytes, monocytes, cellules stromales de la moëlle osseuse et cellules ostéoblastiques (Heymann et Rousselle, 2000; Chodorowska et al., 2004). Le LIF a un rôle majeur en contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires et il est nécessaire pour l'implantation du blastocyste (Stewart et al., 1992).

L'IL31 est une cytokine produite par les lymphocytes T (helper type 2, CD4+), majoritairement impliquée dans l'inflammation cutanée (Dillon et al., 2004).

L'IL11 stimule la thrombopoïèse, la neutropoïèse, l'hématopoïèse et régule la différenciation macrophagique (Ameglio et al., 1997). C'est une cytokine anti-inflammatoire en inhibant la production d'IL1 et activant la production d'IL10 (Trepicchio et al., 1996) impliquée dans le maladie de Crohn (Herrlinger et al., 2006).

L'OSM est la cytokine de type IL6 la plus active pour inhiber la prolifération de divers sarcomes ou carcinomes (Horn et al., 1990).

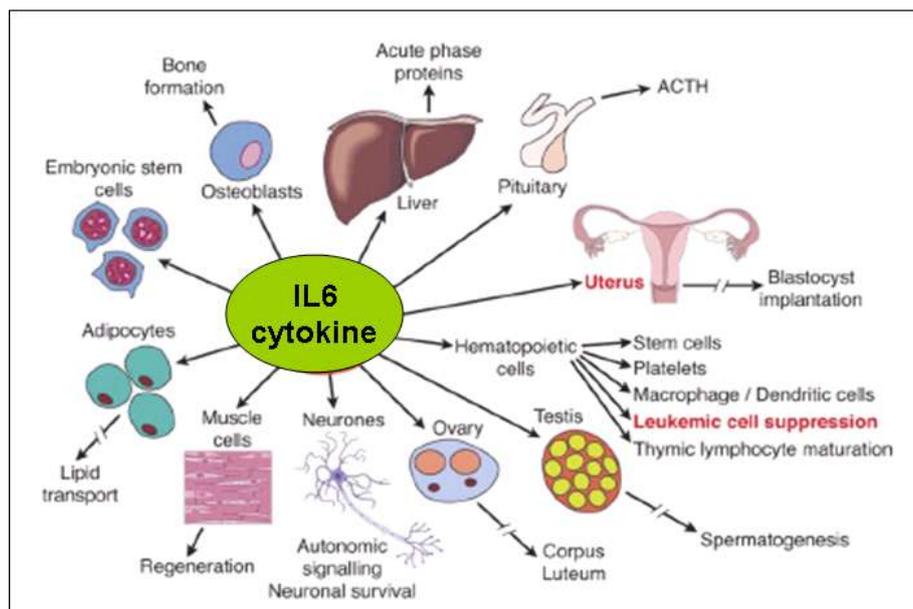


Figure 22 : Différentes actions des cytokines de la famille de l'IL6 (d'après Metcalf, 2008)

II. L'Oncostatine M

1. Origine et Structure

L'Oncostatine M a été identifiée en 1986 et fait partie des cytokines de la famille de l'IL6 (Gearing et al., 1992). Elle est produite par les lymphocytes T, macrophages activés, cellules dendritiques et neutrophiles (Grenier et al., 1999 ; Suda et al., 2002) .

Chez l'homme, l'OSM est tout d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur protéique (252 acides aminés). La forme pro-OSM (227 acides aminés) est obtenue après clivage du peptide signal (Malik et al., 1989), puis la forme mature et active de l'OSM (196 acides aminés) est générée par clivage du pro-OSM (Linsley et al., 1990). Cette cytokine est une glycoprotéine de 28kD formée de 4 hélices alpha.

2. Activation du récepteur et transduction du signal

L'Oncostatine M peut se fixer sur 2 types de récepteur :

- son récepteur de type I est un hétérodimère constitué de la chaîne gp130 et de la sous unité spécifique OSMRB (Bellido et al., 1997),
- son récepteur de type II, qui est également le récepteur du LIF, est un hétérodimère de gp130 et LIFR

La fixation de l'OSM sur ses récepteurs induit l'activation des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et des kinases Akt, PKCdelta et Erk1/2 (Chen et Benveniste, 2004 ; Chipoy et al., 2004 ; Heinrich et al., 2003). Ces kinases et les STATs contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Cette cytokine est donc multifonctionnelle.

3. Activités biologiques

a. Inflammation

L'OSM est une cytokine inflammatoire capable d'induire les protéines de la phase aigüe de l'inflammation (anti-protéases et fibrinogène) dans les hépatocytes (Richards et al., 1992). Cette cytokine joue un rôle dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires (Tanaka et Miyajima, 2003). L'OSM induit la production d'IL6, donc stimule l'inflammation (Brown et al., 1991). L'inflammation induite par l'OSM dans la polyarthrite rhumatoïde est en revanche indépendante de l'IL6 (de Hooge et al., 2002).

L'OSM participe également à l'inflammation cutanée et à la cicatrisation. Une augmentation de l'expression de l'OSM est retrouvée dans les lésions de psoriasis et autres blessures cutanées (Goren et al., 2006; Boniface et al., 2007).

b. Hématopoïèse

Chez la souris, l'OSM est impliquée dans l'hématopoïèse fœtale (en stimulant les cellules endothéliales de la zone aortique induisant l'expression des progéniteurs hématopoïétiques)(Mukoyama et al., 1998) et dans l'hématopoïèse adulte (en activant les cellules stromales de la moelle osseuse pour maintenir les progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes)(Tanaka et al., 2003).

c. Développement hépatique et neuronal

Cette cytokine est également impliquée dans le développement embryonnaire, ainsi que dans la régénération de différents tissus dont le foie (Okaya et al., 2005). L'OSM est également impliquée dans le développement des neurones nociceptifs (Morikawa et al., 2004).

d. Effets sur les tissus squelettiques

Ostéoblastes

L'OSM est également capable de moduler la biologie de l'os. Sur des cellules issues de calvaria (os de la voûte crânienne) de souris, l'OSM présente des effets différents selon le stade de différenciation des cellules. L'OSM induit la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse aux stades précoces, alors qu'elle inhibe la formation osseuse à des stades tardifs (Chipoy et al., 2004 ; Malaval et al., 2005).

Ostéoclastes

L'OSM stimule la différenciation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse (Palmqvist et al., 2002). Contrairement à l'effet direct de l'OSM sur les ostéoblastes, l'ostéoclaste n'ayant pas de récepteur à l'OSM, l'effet est indirect via le relargage de protéines par l'ostéoblaste et agissant sur l'ostéoclaste, telles que RANK-L (Heymann et Rousselle, 2000).

Cartilage

L'OSM induit la dégradation de la matrice extracellulaire dans le cartilage (Richards, 2004) en modifiant l'équilibre entre les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP).

e. Effets anti-cancéreux

L'OSM est capable d'inhiber la prolifération de nombreuses tumeurs solides dont :

- **les mélanomes** (Horn et al., 1990). L'OSM a été montrée comme étant capable d'inhiber les métastases pulmonaires des cellules B16 de mélanome murin (Ouyang et al., 2006). In vitro, la prolifération des mélanocytes et des lignées cellulaires issues de mélanomes de stades précoces est inhibée par l'OSM, cependant les lignées cellulaires issues des lésions plus avancées ou métastatiques perdent leur sensibilité (Lu et al., 1993) notamment par perte du récepteur (Lacrouette et al., 2007).
- **les ostéosarcomes** (Bellido et al., 1997). La surexpression de l'OSM murine suite à l'injection d'adénovirus codant cette cytokine, en association avec la Midostaurine, ralentit la progression d'ostéosarcome chez le rat (Brounais et al., 2008).
- **les hépatocarcinomes** (Klausen et al., 2000)
- **les adénocarcinomes pulmonaires** (Wang et al., 2004)
- **les cancers du sein** (Grant et Begley, 1999). Dans ce cas, l'inhibition de prolifération est associée à une induction de la différenciation (Douglas et al., 1998).
- **les gliomes** (Halfter et al., 1998)

Les études cliniques chez l'homme indiquent que la réponse à l'OSM serait un facteur corrélé à la survie des patients atteints de mélanome ou d'adénocarcinome. Dans des mélanomes de grade III, les patients ayant des cellules tumorales sensibles à l'OSM ont un taux de survie sans rechute plus important (Lacrouette et al., sous presse). Dans l'adénocarcinome pulmonaire, l'expression d'une forme courte du récepteur à l'OSM (OSMRs) qui est un récepteur leurre, réduit

la sensibilité des cellules à l'OSM et est un facteur de mauvais pronostic (Chen et al., 2008). Il apparaît alors qu'une tumeur sensible à l'OSM soit de meilleur pronostic.

f. Effets pro-cancéreux

D'autres études en revanche mettent l'accent sur les limites d'une potentielle utilisation de l'OSM puisque selon le type de tumeur ou son niveau de différenciation, cette cytokine peut avoir des effets opposés. Ainsi, l'OSM stimule la prolifération des fibroblastes normaux (Grant et Begley, 1999). L'OSM induit également la prolifération de certaines tumeurs dont :

- **les astrogliomes.** l'OSM inhibe la prolifération cellulaire mais n'empêche pas la dissémination (Chen et al., 2006).
- **les carcinomes cervicaux.** La surexpression de l'OSMR (accumulation du nombre de copies du gène *OSMRb*) est un facteur de mauvais pronostic, et dans ce cas, l'intérêt thérapeutique ne serait pas d'administrer l'OSM mais au contraire de bloquer son récepteur (Ng et al., 2007).
- **le myélome et sarcome de Kaposi.** Dans ces tumeurs, l'OSM est capable de stimuler la prolifération cellulaire (Zhang et al., 1994).

L'OSM augmente la sécrétion de VEGF (Vascular endothelial growth factor), un facteur proangiogénique impliqué dans l'invasion tumorale, notamment dans des lignées de cancer du sein et les carcinomes cervicaux (Ng et al., 2007). De plus l'OSM stimule le détachement de ces cellules et leur capacité invasive (Queen et al., 2005).

4^{ème} PARTIE

TRAVAUX

DE RECHERCHE

I. Problématique

1. OSM et ostéosarcomes

Comme indiqué précédemment, les tumeurs osseuses primitives (ostéosarcomes, chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing) nécessitent le développement de nouveaux protocoles thérapeutiques. L'OSM possède des activités anticancéreuses intéressantes qui justifient son étude en tant qu'adjuvant pour le traitement de ces tumeurs. Au laboratoire, l'effet de l'OSM a été étudié in vitro et in vivo sur la prolifération, différenciation et apoptose de lignées d'ostéosarcome (Mg63, SaOS2, U2Os, OSRGa, POS1).

a. Différenciation

L'OSM induit la différenciation des cellules d'ostéosarcome (induction d'expression puis perte des marqueurs ostéoblastiques ALP, BSP et OC), modifie leur morphologie (allongement des cellules) et inhibe leur capacité à former une matrice osseuse (Chipoy et al., 2004). Le traitement de ces tumeurs par l'OSM pourrait en fait induire la différenciation terminale de ces cellules tumorales en ostéocytes (Brounais et al., en révision). Au sein des cytokines de la famille de l'IL6, seul l'IL6+IL6Rs présenterait également ce type d'activité (résultats non publiés).

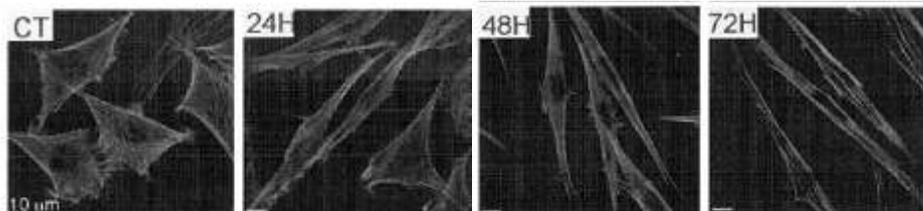


Figure 23 : Modification de morphologie (filaments d'actine) d'ostéosarcome OSRGa après 0 à 3 jours de traitement par l'OSM (Chipoy et al., 2004)

b. Prolifération

L'OSM induit un effet anti-prolifératif (blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire) dû à l'induction de p21 par STAT3 (Figure 24)(Chipoy et al., 2004). Encore une fois, seul l'IL6+IL6Rs est également capable d'inhiber la prolifération des ostéosarcomes (Brounais et al., 2008).

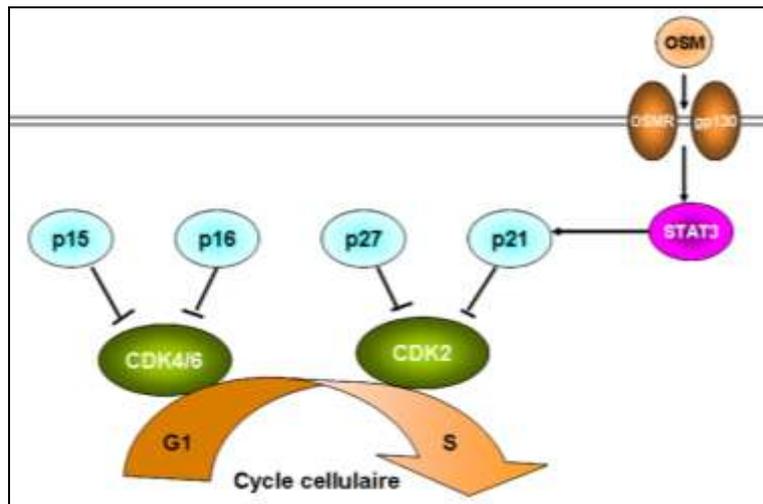


Figure 24: Mécanismes d'action de l'OSM sur la prolifération des ostéosarcomes

c. Apoptose

L'OSM seul n'induit pas la mort des cellules d'ostéosarcome mais permet une sensibilisation à l'apoptose induite par différents inducteurs de mort comme les UV, le TNF α , la Staurosporine (STS) ou la doxorubicine (Figure 25).

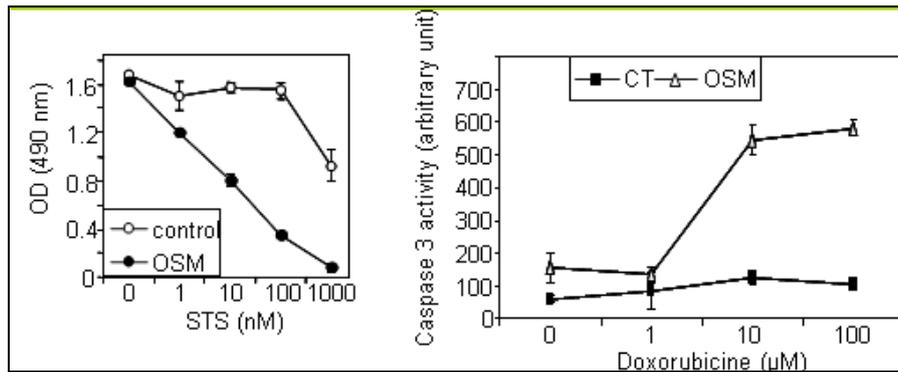


Figure 25 : Effets anticancéreux de l'OSM *in vitro* (Chipoy et al., 2007; Brounais et al., 2008) sur la lignée d'ostéosarcome OSRGA. Induction de la mort en association avec la staurosporine par test XTT. Induction de la caspase 3 en association avec la doxorubicine.

Cet effet est dû à l'activation de p53, STAT5 et à l'augmentation du ratio Bax/Bcl2 pour les lignées p53 wild-type (Chipoy et al., 2007). En effet, Bax (pro-apoptotique) et Bcl2 (anti-apoptotique) contrôlent la voie mitochondriale de l'apoptose avec le relargage du cytochrome c (cyt c), l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3 effectrice de l'apoptose (Figure 26). Seul l'IL6+IL6Rs présente également ce type d'activité (Brounais et al., 2008).

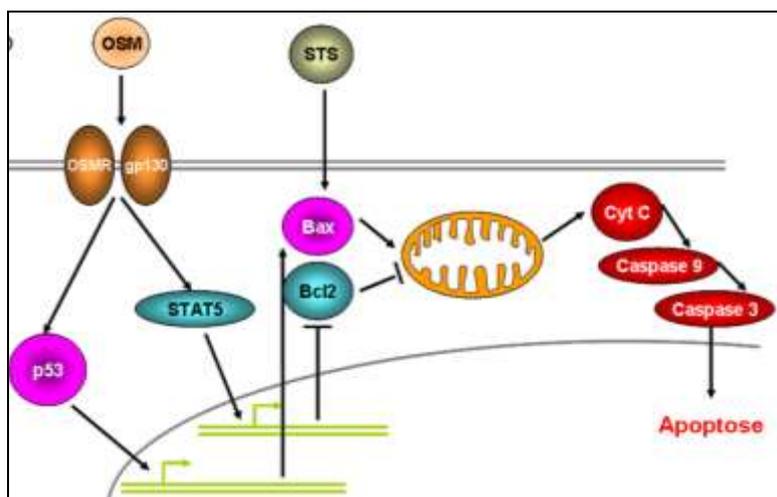


Figure 26: Mécanismes d'action de l'OSM sur l'apoptose des ostéosarcomes

d. Etudes in-vivo

Cette synergie entre OSM et inducteur de mort a également été observée in vivo. Dans un modèle syngénique d'ostéosarcome de rat en site osseux, l'association d'OSM (administré par adénovirus) avec la Midostaurine (un dérivé de la Sts) est capable de réduire le développement de la tumeur primaire ainsi que la dissémination métastatique pulmonaire et d'augmenter la survie (Figure 27). L'OSM a donc un effet anticancéreux direct sur les ostéosarcomes (Brounais et al., 2008).

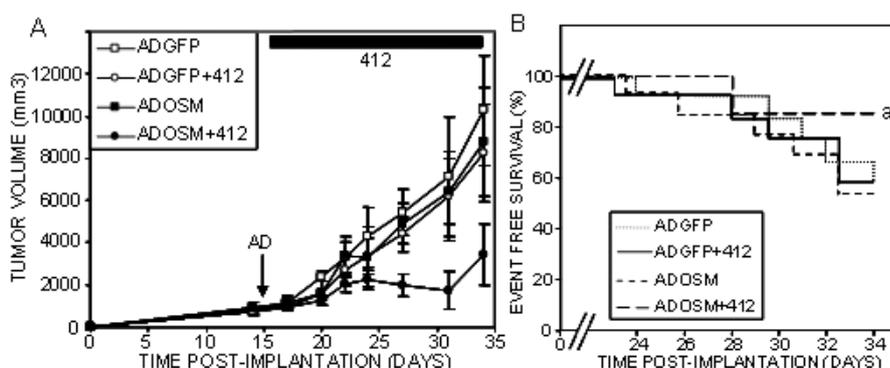


Figure 27 : Effets de l'OSM in vivo sur le modèle d'ostéosarcome chez le rat (Brounais et al., 2008). A : Diminution du volume tumoral. B : Augmentation de la survie.

(ADOSM : adénovirus codant l'OSM ; 412 : midostaurine).

e. Applications

L'OSM apparaît alors comme un adjuvant potentiel pour améliorer les traitements actuels de l'ostéosarcome. Il reste néanmoins des interrogations importantes car l'OSM pourrait également avoir un effet pro-métastatique en diminuant l'adhésion des cellules tumorales, en augmentant leur migration, et en favorisant l'angiogenèse (Brounais et al., 2008). De plus, de sérieux effets secondaires ont été observés avec les fortes doses d'OSM, comme une inflammation généralisée et une perte osseuse trabéculaire (Brounais et al., 2008).

2. Objectifs

Les ostéosarcomes sont des cellules différenciées dans la voie ostéoblastique, les chondrosarcomes dans la voie chondrocytaire et les sarcomes d'Ewing sont très peu différenciés ; chaque stade de différenciation étant caractérisé par différents marqueurs.

Si l'effet de l'OSM sur les ostéosarcomes a déjà été étudié, son rôle potentiel sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des sarcomes d'Ewing et chondrosarcomes n'est pas connu, seuls quelques gènes surexprimés dans les chondrocytes par l'OSM ont été répertoriés (Barksby et al., 2006).

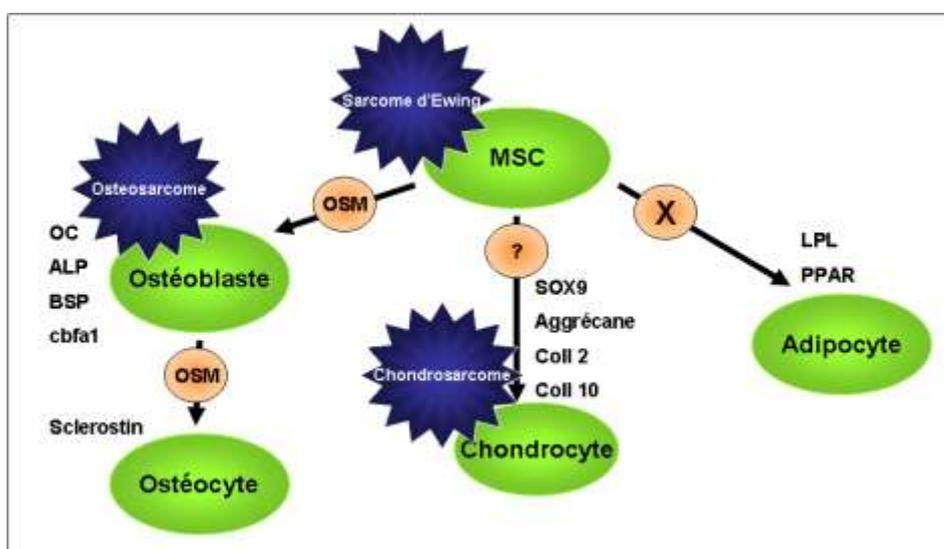


Figure 28: OSM et Différenciation des cellules souches mésenchymateuses

L'objectif de cette étude est de déterminer les différences et les similarités de réponse de lignées de chondrosarcome et de sarcome d'Ewing par rapport aux ostéosarcomes. L'OSM exerce-t-il des effets différents selon le niveau de différenciation des lignées ou selon d'autres critères qui seront à déterminer et notamment quel est le rôle de la protéine de fusion EWS-FLI1 dans les sarcomes d'Ewing ? Outre ces objectifs fondamentaux, l'OSM peut-il avoir un intérêt thérapeutique comme adjuvant dans les chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing, comme cela a été indiqué pour les ostéosarcomes ?

3. Mise en oeuvre

L'effet de l'OSM sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose in vitro sera analysé sur 7 lignées de sarcomes d'Ewing humains, 1 lignée de chondrosarcome humain et 1 lignée de chondrosarcome de rat. La spécificité de l'OSM par rapport à d'autres cytokines de la famille de l'IL6 sera également étudiée. Puisque l'OSM présente également des effets pro-tumoraux sur les ostéosarcomes (perte d'adhésion, augmentation de la migration), ces tests seront réalisés sur les lignées de sarcomes d'Ewing et de chondrosarcome.

II. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

a. Milieux

Les milieux et solutions utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant :

<i>Dénomination</i>	<i>Fournisseur</i>
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biowhittaker
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Biowhittaker
Ham's F12	Biowhittaker
Sérum de veau fœtal (SVF)	Dutscher
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Biowhittaker
Pénicilline Streptomycine utilisé à 1%	Biowhittaker
Trypsine-EDTA (Ethylène Diamine Tetraacetic acid) 0,5g/L-0,2 g/L	Biowhittaker
Trypsine 0,25%	Biowhittaker
DMSO (DiMethylSulfOxyde)	Sigma
Collagénase A	Roche

Tableau II : Milieux et solutions utilisés

b. Cellules

Les cellules sont incubées en étuve à 37°C et 5% de CO₂ et les manipulations s'effectuent sous hotte à flux laminaire vertical. Le repiquage des lignées est réalisé de la manière suivante : lavage du tapis au DPBS, incubation 5 minutes à 37°C dans 40µL/cm² de trypsine EDTA pour décoller les cellules, arrêt de l'action de la trypsine par du milieu de culture supplémenté en SVF, centrifugation de la suspension cellulaire, puis mise en culture d'un nombre approprié de cellules.

Les lignées cellulaires utilisées sont indiquées dans le tableau suivant :

	<i>Espèce</i>	<i>Type cellulaire</i>	<i>Origine – Diagnostic initial</i>	<i>Milieu de culture</i>
A673	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type I	Rhabdomyosarcome femme 15 ans	DMEM + 10% SVF
TC71	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type I	Tumeur Ewing humérus récurrente du site primaire homme 22 ans	RPMI + 10% SVF
SKES1	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type II	Ewing osseux homme 18 ans	DMEM + 10% SVF
RDES	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type II	Ewing humérus homme 19 ans	DMEM + 10% SVF
SKNMC	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type I	Métastase neuroblastome supraorbital femme 14 ans	RPMI + 10% SVF
EW24	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type I	Inconnue	RPMI + 10% SVF
TC32	humain	Sarcome Ewing EWS-FLI1 type I	Inconnue	DMEM + 10% SVF
SW1353	humain	Chondrosarcome	Chondrosarcome osseux primaire grade II humérus femme 72 ans	DMEM + Ham'sF12 (50/50) + 10% SVF
SRC	rat	Chondrosarcome	Swarm Rat Chondrosarcoma	DMEM + 10% SVF
OSRGa	rat	Ostéosarcome	Ostéosarcome radioinduit (Thiéry et al, 1982)	DMEM + 10% SVF
Mg63	humain	Ostéosarcome	Ostéosarcome homme 14 ans	DMEM + 10% SVF

Tableau III : Caractéristiques des lignées cellulaires étudiées

Pour la culture primaire de tumeur de Swarm Rat Chondrosarcoma (SRC), les cellules sont obtenues à partir de fragments de tumeurs SRC traités 1h par collagénase (1mg/mL en DPBS) et 1h par collagénase (0,5mg/mL) et trypsine (0,12% en DPBS). Les cellules SRC utilisées avaient moins de 13 passages.

Les MSC humaines ont été obtenues à partir de moelle osseuse de crête iliaque (service d'orthopédie du CHU de Nantes) et préparées au sein du laboratoire. Les chondrocytes humains ont été obtenus à partir de cartilage articulaire (fémur)(service d'orthopédie du CHU de Nantes) et préparés par la société Atlantic Bone Screen.

c. Cytokines

Les différentes cellules sont traitées avec les cytokines en respectant notamment les spécificités d'espèce qui existent pour l'OSM et l'IL-31 (Tableau IV).

<i>Cytokine</i>	<i>Origine</i>	<i>Utilisation sur cellules</i>	<i>[C] utilisation</i>	<i>Fournisseur</i>
OSM	humain	humaines	50 ng/mL	R&D
OSM	souris	rat	100 ng/mL	R&D
IL6	humain	humaines et rat	50 ng/mL	R&D
IL6Rs	humain	humaines et rat	50 ng/mL	R&D
IL11	humain	humaines et rat	50 ng/mL	R&D
IL31	humain	humaines	50 ng/mL	Inserm U564, Angers
LIF	humain	humaines et rat	50 ng/mL	U892, Nantes

Tableau IV : Cytokines utilisées

2. Tests cellulaires

a. Test de prolifération XTT

Cette technique est un test colorimétrique utilisé pour évaluer la prolifération et la viabilité cellulaire. Le sel de tetrazolium XTT est métabolisé en formazan orange par les mitochondries des cellules viables. La mesure de la densité optique (DO) à 490 nm est donc proportionnelle au nombre de cellules viables. Le test est réalisé sur plaque 96 puits.

Les cellules sontensemencées à J1 à raison de 1500 à 6000 cellules par puits selon les lignées (pour atteindre 70% de confluence à 5 jours) puis mises en contact à J2 avec les cytokines à tester. A J4 11µL par puits de Staurosporine (STS ; Calbiochem) sont ajoutés pour une gamme allant de 0 à 1000nM. A J5 (16 heures après l'ajout de STS) 50µl par puits de solution XTT (Cell

prolifération Kit II, Roche) préparée au 1/50 sont déposés. Après 3 à 6 heures d'incubation à 37°C, la lecture de la DO est réalisée au lecteur de plaques VICTOR 2 (Beckman).

Ce protocole permet d'étudier l'effet des cytokines seules sur la prolifération et l'apoptose ainsi que leur capacité à sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par la STS (Chipoy et al., 2007).

b. Comptage de prolifération et d'apoptose

Le comptage est réalisé en utilisant la méthode d'exclusion au bleu de trypan puisque ce dernier entre dans toutes les cellules mais est exclu des cellules viables par un processus ATP-dépendant : les cellules viables apparaissent réfringentes et les cellules mortes bleues. Le protocole permet donc de discerner les effets sur la prolifération des effets sur l'apoptose.

Pour le comptage de prolifération, les cellules sontensemencées en plaque 24 puits avec 10000 cellules par puits puis sont décollées, comptées, repiquées et traitées deux fois par semaine pendant 18 jours. Le comptage des cellules du surnageant et du tapis cellulaire est réalisé sur cellule de Malassez.

Pour le comptage d'apoptose, les cellules sontensemencées en plaque 24 puits avec 10000 cellules par puits à J1, traitées par l'OSM à J2, puis par la STS à J4. Le comptage des cellules du surnageant et du tapis cellulaire est réalisé sur cellule de Malassez à J5.

Bleu de trypan (Sigma)

Bleu trypan 0,4%

Chlorure de sodium 0,81%

Phosphate de potassium 0,06%

c. Test d'adhésion

Ce test est une cinétique de l'adhésion des cellules en 2h sur différents supports déposés sur plaque (Tableau V). 50µL de support d'adhésion sont déposés par puits à la concentration adaptée et après 1 heure à température ambiante, les puits sont rincés au PBS.

Après 3 jours de prétraitement ou non avec l'OSM, les cellules sontensemencées en même temps en plaque 96 puits. A chaque temps de la cinétique, dans les puits correspondants, les cellules non adhérees sont éliminées par retrait du milieu et rinçage au PBS. A la fin de la cinétique, le % de cellules adhérees dans chaque puits est évalué par test XTT.

	<i>Solution de coating</i>	<i>Fournisseur</i>
Vitronectine	0,8 µg/mL en PBS	Sigma
Fibronectine	8 µg/mL en PBS	Sigma
Collagène I	0,15 mg/mL en Ac acetique 0,02N	BD

Tableau V : Supports d'adhésion

d. Test de migration

Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits et portées à confluence. Après 15 minutes ou 3 jours d'OSM et/ou 1 jour de culture en milieu appauvri en SVF, les cellules sont décollées sur une bande d'environ 1 mm en utilisant un cône. La migration des cellules dans cette cicatrice est observée sur 24 à 48 heures par microscopie optique.

3. Etude des ARNm

La technique de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) est utilisée dans cette étude pour mettre en évidence et comparer l'expression de gènes d'intérêt. Cette technique consiste dans un premier temps en l'extraction des ARN totaux exprimés par la cellule dans des conditions données, puis ces ARN sont rétrotranscrits en ADNc afin d'amplifier par PCR les différents gènes d'intérêt et d'en évaluer le niveau d'expression.

a. Extraction de l'ARN

Les tapis cellulaires sont lysées par 1 mL de réactif Trizol (Invitrogen) puis l'ARN est séparé des autres constituants cellulaires grâce au chloroforme et à l'isopropanol selon le protocole suivant.

A la solution de lyse par le Trizol est ajouté 0,2 mL de chloroforme [incubation 2 minutes à température ambiante (TA)], puis l'ensemble est centrifugé (12000g/15min/TA). Trois phases peuvent être distinguées, la phase supérieure aqueuse qui contient l'ARN est récupérée. L'ARN est précipité par 0,5 mL d'isopropanol (incubation 10 minutes, TA), puis centrifugé (12000g/10min/4°C). Le culot est rincé par 1 mL d'éthanol 75% (incubation 10 min, TA) puis à nouveau centrifugé (7500g/10min/4°C). Le culot est séché à l'air ambiant, puis repris dans 20µL d'eau stérile. Les solutions finales sont conservées à -20°C

b. Dosage de l'ARN

L'ARN est dosé au spectrophotomètre à 260nm. L'ARN, dilué au 1/100ème dans de l'eau stérile est quantifié par mesure de l'absorbance par rapport à l'eau seule. La concentration en ARN total est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration en ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = DO_{260} \times 0,04 \text{ (coefficient d'extinction molaire)} \times \text{facteur de dilution}$$

c. Reverse transcription

L'objectif de la RT est de transformer l'ARN issu des cellules en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la Moloney Murine Leukemia Virus-Retro Transcriptase (MMLV-RT ; Invitrogen), une ADN polymérase synthétisant un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN.

L'ADN complémentaire est synthétisé à partir de 2 à 5 µg d'ARN total dans un volume final de 50µL contenant de l'eau, du tampon 5X, 10mM de DTT (Dithiothreitol, Invitrogen), 0,5 µg de Randoms Primers (Promega, Madison, USA), 0,5 mM de dNTP (Eurobio, Courtaboeuf, France), 20 U de RNase out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) (Invitrogen) et 400 U de MMLV-RT. La réaction se fait à 37°C pendant 1 heure.

d. PCR semi-quantitative

La PCR est utilisée pour réaliser l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN précis. Cette technique utilise de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase : pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'un ADN matrice à partir d'une amorce. La Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante, permet l'élongation de l'ADN à partir de deux amorces sens et antisens encadrant la séquence d'ADN à amplifier. La synthèse des brins d'ADN complémentaires est réalisée avec les éléments de base que sont les dNTPs.

Une PCR correspond à la succession de plusieurs cycles comportant chacun 3 étapes :

1. La dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95°C,
2. L'hybridation des amorces de 50°C à 65°C
3. L'élongation des brins complémentaires à 72°C par la Taq Polymérase

Au fil des cycles, la quantité d'ADN double brin borné par les amorces augmente de façon exponentielle.

Les PCR classiques sont réalisées sur 2µL de cDNA dans 50µL de milieu réactionnel contenant eau, tampon, 0,4mM de chaque primer (tableau VI), 3mM MgCl₂, 0,8mM dNTP et 1,25U Taq Gold Polymerase (Roche) avec 40 à 45 cycles du type 95°C(15-30s) / 58-62°C(30s) / 72°C(30s).

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose à 1,8%. Après migration à 100 V, le gel est placé 15 minutes dans un bain de GelRed (Biotium). Puis la bande contenant l'ADNc amplifié est visualisée sous UV. Le gène 18s est un gène de référence, dont l'expression est stable en fonction des traitements subis par les cellules, qui permet de vérifier le chargement initial en ARN. Les primers utilisés et leurs conditions validées sont énumérés dans le tableau VI.

e. PCR quantitative

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant par la mesure de l'intensité de fluorescence du Sybr green intercalé dans les produits de PCR double brin. On recherche le nombre de cycles nécessaires (Ct pour « Cycle Threshold ») pour que la quantité d'ADN dépasse un seuil de fluorescence établi.

Les primers sont tout d'abord validés sur une gamme de concentration d'ADNc pour vérifier la linéarité de la droite de quantification, l'absence de dimères de primers sur la courbe de fusion et connaître l'efficacité de la réaction (Les Ct sont placés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité).

Pour tous les échantillons la qPCR est réalisée sur des gènes de référence (HPRT, CYC1) et sur les gènes d'intérêt en plaque 96 puits adaptée à l'appareil Chromo 4 (Biorad) dans un volume final de 10µL (2µL de cDNA dilué au 1/20^{ème}, 5µL de Mix (Sybr green Supermix Biorad) et 0,6µL de chaque primer à 5mM).

La quantification absolue d'ADN contenu dans un échantillon est déterminée par la formule (1), puis on établit un rapport entre la quantité d'ADN de cet échantillon et celle d'un témoin, qui n'a pas subi de traitement (2). Cette quantification relative est alors corrigée par celle d'un gène de référence (qui n'est pas induit par le traitement) pour éliminer les effets de fluctuations.

$$Q_o = \frac{Q_{ct}}{E^{ct}} \quad (1) \quad R = \frac{Q_{ct_{ech}}}{Q_{ct_{tem}}} \quad (2)$$

Soit

$$R = E^{(ct_{ech} - ct_{tem})}$$

Q: quantité d'ADN
n: indice du nième cycle
E: efficacité de la réaction

f. Contrôles

Les contrôles positifs ou négatifs qui ont pu être utilisés selon les cas sont les suivants :

- Ostéosarcomes de rat (OSRGa) ou humain (Mg63)
- Chondrocytes de rat (mis en culture de cartilage de genou, Atlantique Bone Screen, Nantes) ou humains (obtenus lors d'une rhinoplastie, Inserm U791, Nantes)
- Ostéoblastes humains (Promocell)

Nom	Séquence des oligonucléotides	conditions	Taille amplicon (pb)
Marqueurs Ostéoblastiques			
OC rat	S : 5' catgaggacctctctctc 3' AS : 5' cctaaacggtggtgcatag 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	302
ALP rat	S : 5' cctttgtggctctcctcaag 3' AS : 5' ctggccttctcatccagttc 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	451
BSP rat	S : 5' atggagatggcagatgttcg 3' AS : 5' gttcctctgcacctgcttc 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	439
Marqueurs chondrocytaires			
Coll 2A1 rat	S : 5' ctgggtctctggtccatt3' AS : 5' cgagaaccttgagcaccttc 3'	95°C(15s) 55°C(30s) 45cycles 72°C(30s)	477
Coll 10A1 rat	S : 5' atatctctgggatccagtc 3' AS : 5' ttacccctggttagcactg 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	482
SOX9 rat	S : 5' tgcagcacaagaagaccac 3' AS : 5' cggcaggtattggtcaaac 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	410
Coll 2A1 humain	S : 5' atgacaatctggtcccaac 3' AS : 5' tgcaacggattgtgtttt 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	411
Coll 10A1 humain	S : 5' aatccccacagcataaaag 3' AS : 5' tcctgttccaggttttc 3'	95°C(30s) 58°C(30s) 45cycles 72°C(30s)	409
SOX9 humain	S : 5' agaaggaccaccggattac 3' AS : 5' cggcaggtactggtcaaac 3'	95°C(30s) 62°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	401
Récepteurs des cytokines de la famille de l'IL6			
Gp130 rat	S : ACCATGTTGCCGTTTCCTAAG AS : GTGGGCTGGGTTTCACTTTA	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	462
OSMRB rat	S : GGAACCTGGGATAGACACGA AS : TGTCTGGCTCCAGATCACTG	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	421
LIR rat	S : GCATGTTTGTGGTGACCAAG AS : ATGTACACGACCTGGGAAGC	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	454
IL6R rat	S : TGCAGGAGTAAAGCATGTG AS : GAGGAACCAGGAGGAAGGTC	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	423
Gp130 humain	S : TCCTTTGGAAGGTGGAGCTTG AS : AACTCGTGTGGAAGACATTGC	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	524
OSMRB gp180 humain	S : ACTGCCTTGGGGTGGTCTAA AS : GGCATGATGGCATTGTGG	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	270
LIFR gp190 humain	S : GGACTGACTGCATTGCACAGATG AS : ACCCTGTCTGTTCCACTTTAGG	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	502
IL6R gp80 humain	S : ACGCCTTGGACAGAATCC AS : TGGTCGAGGTATTGTCA	95°C(30s) 60°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	393 299
Gpl humain	Fourni par l'Inserm U564, Angers	95°C(30s) 55°C(30s) 40cycles 72°C(30s)	250
Gène de fusion des Sarcomes Ewing			
EWS-FLI1 humain (PCR quantitative)	S : GCCAAGCTCCAAGTCAATATAGC AS : GAGGCCAGAATTCATGTTATTGC	95°C(15s) 60°C(30s) 40cycles 79°C(30s)	109

Tableau VI : Primers utilisés pour les RT-PCR

4. Etude des protéines

a. Réalisation des lysats protéiques

Les lysats cellulaires sont réalisés en plaque 6 puits sur des cellules à environ 70% de confluence. Les cellules sont lysées par 30 minutes d'incubation à 4°C en présence de 200µL de tampon de lyse. Les lysats cellulaires sont ensuite récupérés en tube puis centrifugés à 12000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C. Les lysats sont alors conservés à -20°C.

Tampon de lyse RIPA

Chlorure de sodium (Merck) 150 mM

Tris pH7,4 (Merck) 50 mM

Nonidet P-40 (Sigma) 1%

Sodium déoxycholate (Sigma) 0,25%

Sodium fluoride (Sigma) 1mM

Sodium orthovanadate (Sigma) 1mM

Glycerol (Sigma) 10%

A ajouter extemporanément :

Protease inhibitor cocktail (Roche) 25X

Phenylmethylsulfonylfluoride (Sigma) 0,5mM

b. Dosage protéique

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

c. Western blot

La technique de Western blot permet de détecter la présence d'une protéine et d'évaluer son niveau d'expression. Les étapes sont les suivantes :

- Dépôt de 25µg de lysat cellulaire (dilué au demi dans le bleu de chargement et porté à ébullition 5 minutes) par puits dans un gel de 10 ou 12% de polyacrylamide

- Migration et séparation par électrophorèse en fonction du poids moléculaire sur un gel composé de 2 parties (le gel de séparation surmonté du gel de concentration) dans un tampon dénaturant avec une intensité de 10mA par gel

- Transfert sur membrane de PDVF (polyfluorure de vinylidène ImmobilonTM, Millipore) en cuve de transfert contenant le tampon de transfert par un courant de 100mA sur 2h ou 40mA sur 16h

- Saturation des membranes 1h en PBS, Tween 0,05%, BSA 3%

- Incubation avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée toute la nuit (tableau V) puis lavages

- Incubation 1h avec l'anticorps secondaire spécifique de l'espèce de l'anticorps primaire en PBS, Tween 0,05%, lait 5% (Tableau V)

- Révélation par une solution West Signal Pico (Pierce)

- Mesure de la Chemiluminescence sur G-box (Syngene)

<i>Protéine</i>	<i>Espèce</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Taille (kDa)</i>	<i>Dilution (1/n)</i>	<i>Ac 2nd au 1/n</i>
P21	H	Oncogene	19	100	Souris 5000
P21	R	Pharmingen	19	500	Souris 5000
P27	H R	BD	27	500	Souris 5000
pSTAT3 tyr 105	H R	Cell signaling	86	1000	Lapin 10000
Total STAT3	H R	Cell signaling	86	10000	Souris 5000
pERK 1/2	H R	Cell signaling	42 44	1000	Souris 5000
Bax	R	Cell signaling	20	1000	Lapin 10000
Bcl2	R	Calbiochem	28	200	Souris 5000
Caspase 9	R	Cell signaling	17 38 40 51	1000	Lapin 10000
P-p53	R	Cell signaling	53	1000	Lapin 10000
EWS	H	Santa cruz	90 (EWS) 51 (EWS-FLI1)	1000	Lapin 10000
Actine	R H	Sigma	49	12000	Lapin 10000

Tableau VII: Anticorps de Western blot utilisés (H :humain et R :rat)

<p><u>Gel de concentration</u></p> <p>Acrylamide/bis-acrylamide (Sigma) 5%</p> <p>Tris pH 6,8 (Sigma) 125mM</p> <p>Sodium Dodecyl Sulfate : SDS (Sigma) 0,1%</p> <p>Ammonium persulfate : APS (Sigma) 0,1%</p> <p>Tetraméthyléthylènediamine : TEMED (Sigma) 0,1%</p>	<p><u>Bleu de chargement</u></p> <p>Tris-HCl pH6,8 (Sigma) 62,5mM</p> <p>Glycerol (Sigma) 25%</p> <p>SDS (Sigma) 2%</p> <p>Bleu de bromophenol (Sigma) 0,01%</p> <p>B-mercaptoethanol (Sigma) 5%</p>	<p><u>Tampon de migration</u></p> <p>Tris (Sigma) 25mM</p> <p>Glycine (Merck) 192mM</p> <p>SDS (Sigma) 0,1%</p> <p><u>Tampon de transfert</u></p> <p>Tris (Sigma) 25mM</p> <p>Glycine (Merck) 192 mM</p> <p>Méthanol (Grosseron) 20%</p>
<p><u>Gel de séparation</u></p> <p>Acrylamide/bis-acrylamide (Sigma) 10 ou 12%</p> <p>Tris pH 8,8 (Sigma) 375mM</p> <p>Sodium Dodecyl Sulfate : SDS (Sigma) 0,1%</p> <p>Ammonium persulfate : APS (Sigma) 0,1%</p> <p>Tetraméthyléthylènediamine : TEMED (Sigma) 0,04%</p>	<p><u>Tampon de lavage</u></p> <p>Phosphate buffered saline : PBS (Eurobio) 1X</p> <p>Tween (Sigma) 0,05%</p>	

d. Activité caspase 3

L'activité de la caspase 3 est mesurée par une technique fluorimétrique (Promega). Le substrat CPP32 est marqué par un fluorochrome qui est libéré quand la caspase 3 est activée. La fluorescence détectée à 460 nm est alors proportionnelle à la quantité de substrat clivé.

Ce test est réalisé en plaque 96 puits noire. Dans chaque puits est déposé 32µL de Caspase buffer, 10µL de DTT 100mM, 46µL d'eau distillée et 10µL de Lysat ou de solution de RIPA. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 2µL de substrat CPP32 à 2,5mM sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est alors incubée 1h à 37°C puis l'absorbance est lue au spectrophotomètre VICTOR 2.

5. Inhibition de EWS-FLI1

Le clone A673 1c, transfecté stablement par un ShRNA EWS-FLI1, a été fourni par O. Delattre, Institut Curie, Paris (Tirode et al., 2007). Ces cellules sont maintenues sous pression sélective par Blasticidine (20µg/mL, Invitrogène) et Zéocine (200µg/mL, Invitrogène). Le ShEWS-FLI1 est induit par la Doxycycline (1µg/mL, Clontech) de manière indirecte par blocage du répresseur tet (Figure 22).

Le Sh (Short hairpin) est une séquence d'ARN en épingle à cheveux utilisée pour bloquer l'expression d'un gène par le mécanisme d'ARN interférence. La ShRNA est introduit dans les cellules par un vecteur plasmidique, intégré au génome de la cellule hôte puis sera transmis aux cellules filles (transfection stable). Le ShRNA est clivé par la machinerie cellulaire en siRNA, se fixe à la séquence d'ARNm qui lui est spécifique (ici : le transcrite EWS-FLI1 de type I) et recrute le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) afin de cliver cet ARNm et donc de le dégrader (Figure 22).

La séquence du ShEWS-FLI1 est :

Sens : 5'-GATCCCGGCAGCAGAACCCCTTCTTATTCAAGAGATAAGAAGGGTTCTGCTGCCTTTTTGGAAA-3'

Antisens : 5'-AGCTTTTCCAAAAAGGCAGCAGAACCCCTTCTTATCTCTTGAATAAGAAGGGTTCTGCTGCCGG-3'

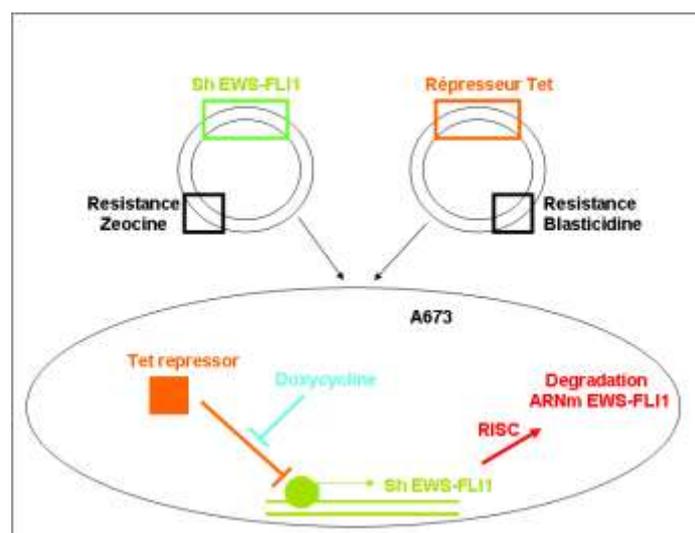


Figure 29 : Schéma du mécanisme d'action du ShEWS-FLI1 inducible par la doxycycline

6. Analyse statistique

La moyenne est mesurée sur au moins trois valeurs et présentée avec l'écart type. Le Test de Mann Whitney a été utilisé pour comparer 2 groupes de valeurs entre elles et établir une probabilité statistique. Il s'agit d'un test non paramétrique d'identité portant sur deux échantillons indépendants issus de variables numériques ou ordinales.

III. Résultats

1. Screening de la réponse des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing aux cytokines de la famille de l'Interleukine 6

a. Test de prolifération

La prolifération cellulaire de toutes nos lignées de sarcome d'Ewing et de chondrosarcome a tout d'abord été analysée par des tests XTT après 3 jours de traitement avec différentes cytokines de la famille de l'IL6 (Figure 30). L'IL31 n'a pas pu être testée sur les cellules SRC car cette cytokine chez le rat n'est pas disponible pour l'instant, et l'IL31 humaine ou murine ne permettent pas de stimuler des cellules de rat (informations données par H. Gascan, Inserm U564, Angers).

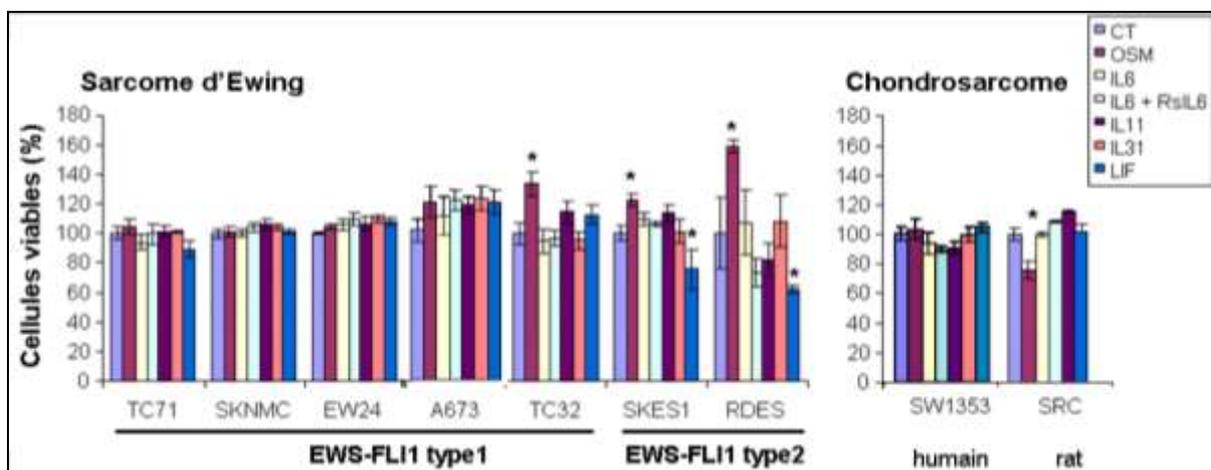


Figure 30 : Effets des cytokines de la famille de l'IL6 sur la prolifération des lignées de sarcome d'Ewing et chondrosarcome. Résultats obtenus après 3 jours de traitement et déterminés par test XTT. Pour chaque lignée le nombre de cellules viables est arbitrairement fixé à 100 pour la condition non traitée. (* : $p < 0,05$, une expérience en quintuplet, représentative de 2 expériences indépendantes, est montrée)

Pour les sarcomes d'Ewing, l'OSM apparaît pro-prolifératif sur les cellules TC32 (EWS-FLI1 type 1), SKES1 et RDES (EWS-FLI1 type 2) et sans effet significatif sur les cellules A673, TC71, SKNMC et EW24. Pour les chondrosarcomes, l'OSM est anti-prolifératif sur la lignée de rat SRC mais n'a pas d'effet sur les cellules humaines SW1353.

Le LIF est anti-prolifératif sur les cellules RDES et SKES1 (Sarcome d'Ewing EWS-FLI1 type 2) mais n'a pas d'effet sur les autres lignées cellulaires.

L'IL6 seule ou en association avec son récepteur soluble (IL6Rs), l'IL11 ou l'IL31 n'ont pas d'effet significatif sur la prolifération de ces cellules.

L'OSM et le LIF apparaissent donc comme les cytokines de type IL6 les plus actives sur nos lignées ; les cytokines de la famille de l'IL6 ont donc des spécificités d'action. L'effet de l'OSM est cependant très différent selon le type de tumeur : anti-prolifératif sur un chondrosarcome mais pro-prolifératif sur 3 sarcomes d'Ewing.

b. Récepteurs des cytokines

Pour tenter de comprendre les différences de réponse aux diverses cytokines de la famille de l'IL6, les transcrits de certains récepteurs (gp130, OSMRB, LIFR, IL6R et gpl) ont été analysés dans les lignées de chondrosarcome et de sarcome d'Ewing (Figure 31). Par rapport aux cytokines testées en prolifération, il manque l'analyse de l'IL-11R qui n'a pas été validée au laboratoire.

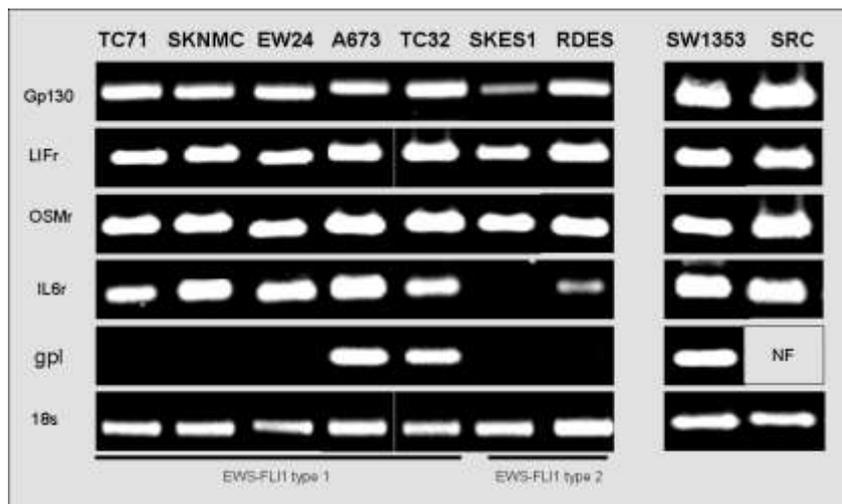


Figure 31: Expression des transcrits des chaînes réceptrices des cytokines de la famille de l'IL6 déterminée par PCR semi-quantitative. (NF = Non fait)

L'analyse du taux relatif d'expression entre les lignées (en sachant que l'on ne peut pas comparer SRC avec les autres puisqu'il s'agit de cellules de rat ayant été analysées avec des primers spécifiques) montre que la gp130 et l'IL6R sont plus faiblement exprimés dans les cellules SKES1. Les cellules RDES présentent également un taux plus faible d'ARNm pour l'IL6R. Ces deux lignées cellulaires sont des Sarcomes d'Ewing contenant la protéine de fusion EWS-FLI1 de type 2. L'analyse en PCR quantitative montre que les taux de LIFR et OSMRB sont également plus faibles dans les sarcomes d'Ewing de type 2 (résultats préliminaires non montrés).

Les transcrits gpl ne sont pas exprimés dans plusieurs lignées (TC71, SKNMC, EW24, SKES1 et RDES) pouvant expliquer leur absence de réponse.

Cependant pour de nombreuses lignées, l'absence de réponse aux cytokines de type IL6 n'est pas liée à une absence de récepteur. De plus, les effets pro- ou anti-prolifératifs de l'OSM et du LIF ne sont pas associés à une expression plus forte de leurs récepteurs. Au contraire, on peut suggérer que dans les sarcomes d'Ewing de type 2, la forte réponse à ces cytokines corrèle avec une faible expression des chaînes réceptrices gp130, LIFR et OSMRB.

c. Signalisation

Afin de déterminer si les récepteurs à l'OSM et au LIF sont exprimés et fonctionnels à la surface de ces cellules, l'activation de STAT3 et ERK 1/2 a été analysée.

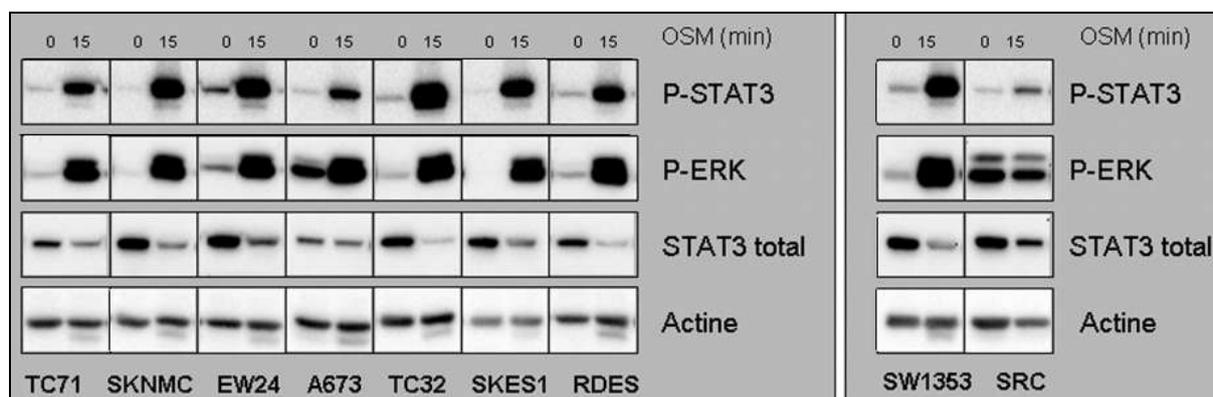


Figure 32 : Activation de STAT3 et ERK 1/2 par l'OSM. Les cellules ont été traitées 15 min par l'OSM, puis les lysats cellulaires ont été analysés par western blot pour les protéines indiquées. On peut noter que l'anticorps anti-STAT3 total ne reconnaît pas la forme phosphorylée de STAT3.

L'OSM, dans toutes les lignées de chondrosarcome et de sarcome d'Ewing, induit la phosphorylation en 15 minutes de STAT3 et ERK 1/2, sauf dans les cellules SRC où la phosphorylation de ERK 1/2 n'est pas augmentée par l'OSM (Figure 32).

Les taux d'activation de STAT3 et ERK 1/2 par l'OSM diffèrent selon les lignées mais ne sont pas plus forts dans les lignées sensibles versus les lignées résistantes à l'OSM. De même, le taux basal de ces protéines diffère entre les lignées, mais n'est pas en lien avec l'effet pro-prolifératif, anti-prolifératif ou l'absence de réponse à l'OSM. On peut cependant noter que la seule lignée présentant un effet anti-prolifératif avec l'OSM (SRC) présente le plus faible taux d'activation de STAT3 par cette cytokine ainsi que le plus fort taux constitutif de ERK 1/2 phosphorylé.

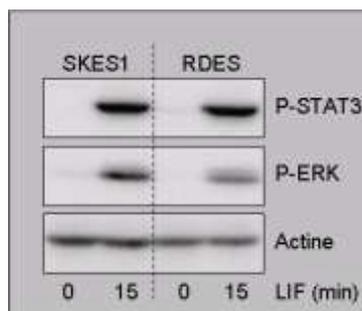


Figure 33 : Activation de STAT3 et ERK 1/2 par le LIF. Les cellules ont été traitées 15 min par le LIF, puis les lysats cellulaires ont été analysés par western blot pour les protéines indiquées.

Le LIF montrait un effet anti-prolifératif sur les cellules SKES1 et RDES : en 15 minutes de traitement avec cette cytokine, STAT3 et ERK 1/2 sont activés, un signal est bien transduit dans ces lignées (Figure 33). Cependant, la transduction de signal induite par le LIF est identique à celle induite par l'OSM, qui sur ces cellules, a une activité inverse pro-proliférative.

2. Activité de l'OSM sur la Prolifération

a. Effets à court terme

En 3 jours de traitement par les cytokines de type IL6, les seuls effets significatifs sont l'effet pro-prolifératif de l'OSM sur les sarcomes d'Ewing de type 2 et les TC32, l'effet anti-prolifératif de l'OSM sur la lignée de chondrosarcome de rat SRC et l'effet anti-prolifératif du LIF sur les cellules SKES1 et RDES (Figure 30). Dans un premier temps, ces résultats ont été vérifiés par de nouveaux tests XTT réalisés sur 3 jours de traitement (Figure 34a ; moyenne de 3 nouvelles expériences).

b. Effets à long terme

Afin d'étendre ces résultats sur une plus longue période de traitement et d'analyser les effets de l'OSM et du LIF sur la mort cellulaire, les cellules ont ensuite été traitées pendant 18 jours avec ces cytokines et analysées 2 fois par semaine par coloration au bleu trypan.

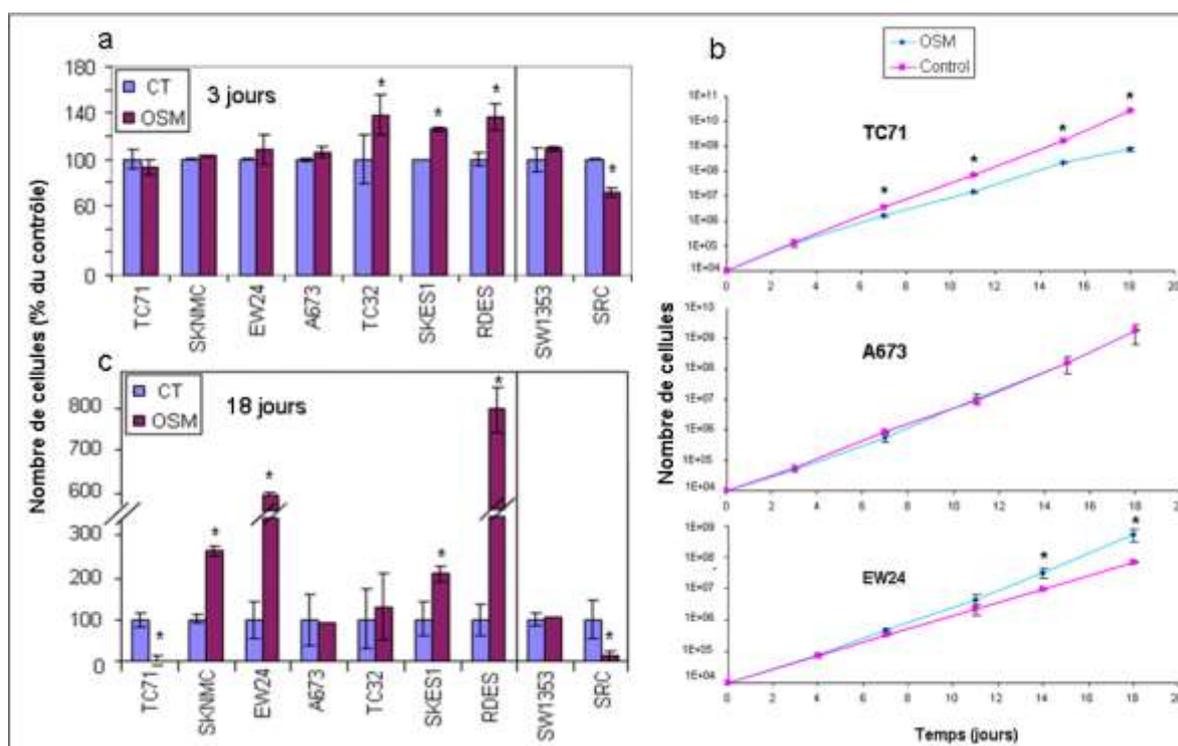


Figure 34: Prolifération des sarcomes d'Ewing et chondrosarcomes. a- Synthèse de la prolifération des lignées en 3 jours de traitement par l'OSM mesuré par test XTT (moyenne sur 3 expériences en triplicate, $*p < 0,05$) ; b- Exemples de cinétique de prolifération de sarcomes d'Ewing traités par l'OSM mesuré par comptage au bleu trypan (résultats représentés en échelle logarithmique) ; c- Synthèse de la prolifération des lignées après 18 jours de traitement à l'OSM déterminé par comptage au bleu trypan.

Sur cette période, aucune mort cellulaire n'a été observée (résultats non montrés). L'effet pro-prolifératif de l'OSM est confirmé sur les cellules SKES1 et RDES, mais pas sur les TC32 (Figure 34c). L'OSM apparaît également pro-prolifératif après 18 jours sur les cellules SKNMC et EW24 (Figures 34b et c), alors qu'aucun effet n'avait été identifié sur ces cellules en 3 jours

(Figure 34a). L'effet anti-prolifératif de l'OSM est confirmé sur les cellules SRC (Figure 34c) et est maintenant mis en évidence sur les cellules TC71 (Figures 34b et c). Pour les cellules SW1353 et A673, l'OSM n'a pas d'effet sur la prolifération au deux temps étudiés.

Pour le LIF, l'effet anti-prolifératif n'a pas été confirmé sur les cellules SKES1 et RDES après 18 jours (résultats non montrés).

Ces résultats indiquent donc qu'au sein des cytokines de type IL6, l'OSM est une cytokine majeure contrôlant, à court terme et/ou à long terme, la prolifération des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing.

c. Etude de protéines du cycle cellulaire

L'objectif est alors de comprendre les mécanismes par lesquels une même cytokine peut moduler soit positivement, soit négativement, la prolifération de ces cellules. Il est déjà reconnu dans la littérature, notamment pour les ostéosarcomes, que l'induction de p21 est responsable de l'inhibition de prolifération par l'OSM (Figure 24)(Bellido et al., 1997). Dans les hépatocarcinomes, l'OSM induit un autre inhibiteur du cycle cellulaire, la p27 (Klausen et al., 2000). Nous avons donc étudié l'induction de 3 protéines impliquées dans le cycle cellulaire (p21, p27 et cycline D1) lors du traitement des cellules par l'OSM.

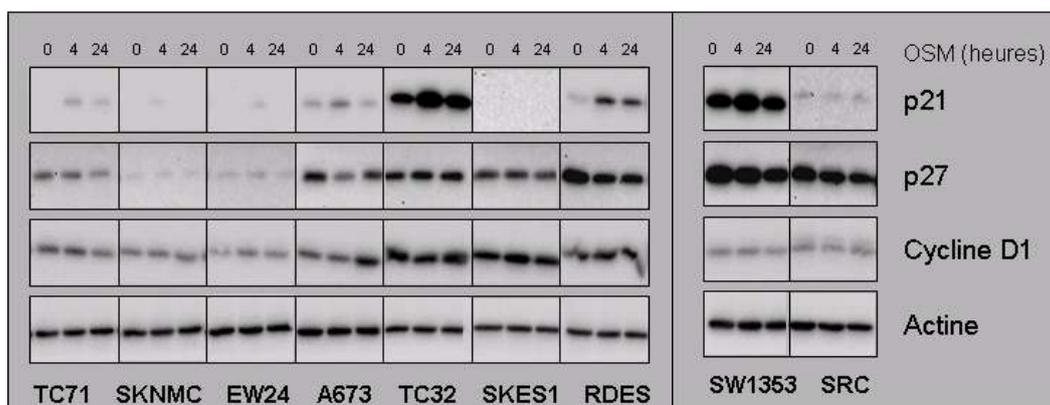


Figure 35: Induction de p21, p27 et cycline D1 dans les chondrosarcomes et les sarcomes d'Ewing , déterminé par Western blot, l'actine sert de contrôle de chargement.

Aucune induction de la protéine p27 ou de la cycline D1 n'a pu être observée dans les lignées testées.

L'étude de p21 par western blot montre une induction de cette protéine dans les cellules TC71 mais pas dans les cellules SRC, alors que l'OSM inhibe la prolifération de ces deux lignées. Pour les SRC, il s'agirait alors d'un mécanisme indépendant de p21. P21 est également induit par l'OSM dans les cellules RDES alors qu'il a un effet pro-prolifératif sur ces cellules. On peut également noter une induction transitoire de p21 après 4h de traitement par l'OSM dans les cellules SKNMC, EW24, A673 et TC32, sans lien apparent avec l'effet de l'OSM sur la prolifération. Enfin, il existe des différences de taux basal pour p21 mais cela n'est pas corrélé avec un effet pro- ou anti- prolifératif de l'OSM (Figure 35).

Les données de bibliographie montrent que la protéine de fusion EWS-FLI1 inhibe l'expression de p21 en bloquant directement son promoteur (Nakatani et al., 2003). Ceci n'est pas retrouvé dans les sarcomes d'Ewing testés car ni les taux de base ni les taux induits par l'OSM n'apparaissent plus faibles que ceux observés dans les chondrosarcomes (Figure 35) ou les ostéosarcomes (données non montrées).

En conclusion, il n'existe pas de corrélation exacte entre l'induction de p21 par l'OSM et l'effet de cette cytokine sur la prolifération, suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la prolifération par l'OSM.

3. Activité de l'OSM sur l'Apoptose

Comme indiqué précédemment par les tests au bleu trypan, l'OSM seul n'induit pas de mort cellulaire. Cependant sur les ostéosarcomes, l'OSM sensibilise les cellules à l'apoptose induite par différents inducteurs de mort telle la staurosporine (Chipoy et al., 2007).

a. Sarcomes d'Ewing et SW1353

Sur les 7 lignées de sarcome d'Ewing et sur les cellules SW1353, aucun effet proapoptotique de l'OSM associé à la STS n'a été observé (résultat montré uniquement pour la lignée EW24, Figure 36).

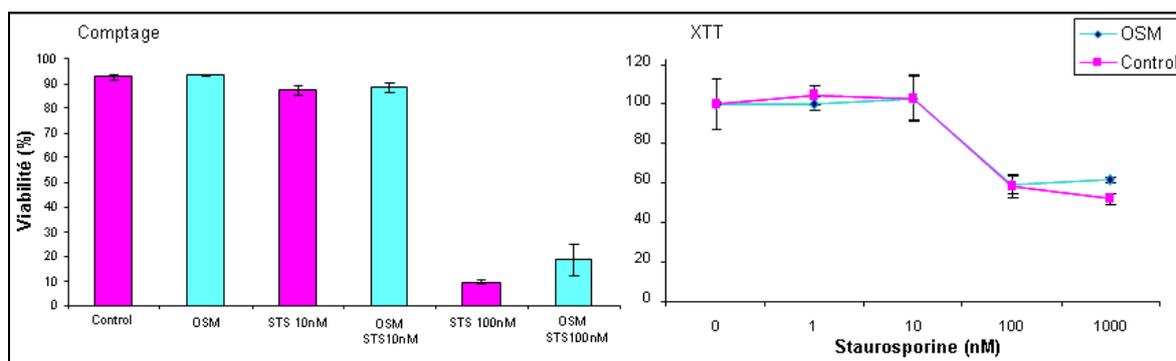


Figure 36 : Viabilité des cellules EW24 mesurée par XTT ou comptage au bleu trypan après 3 jours de traitement à l'OSM et 16 heures de Staurosporine.

b. SRC

En revanche dans la lignée SRC, l'OSM sensibilise significativement les cellules à la mort induite par la STS dès 100 nM (Figure 37).

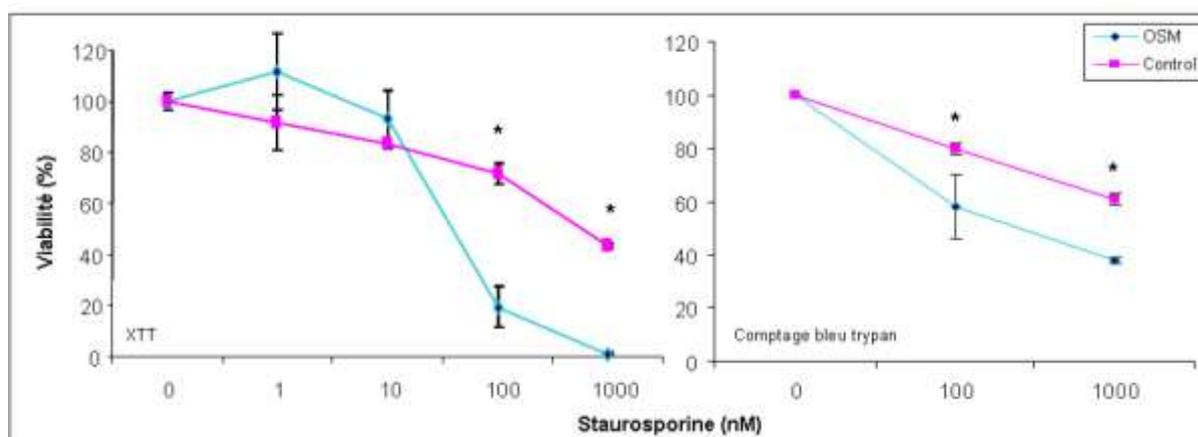


Figure 37 : Viabilité des cellules SRC mesurée par XTT ou comptage au bleu trypan après 3 jours de traitement à l'OSM et 16 heures de Staurosporine. * $p < 0,05$

c. Etude de protéines de la voie mitochondriale de l'apoptose

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels l'OSM sensibilise à l'apoptose les cellules SRC, différentes protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose ont alors été analysées : P-p53 (forme phosphorylée donc active de p53), Bax, Bcl2, caspase 9 et caspase 3. Ces protéines avaient déjà été impliquées dans l'apoptose induite par l'OSM dans les ostéosarcomes p53 wild type (Figure 26).

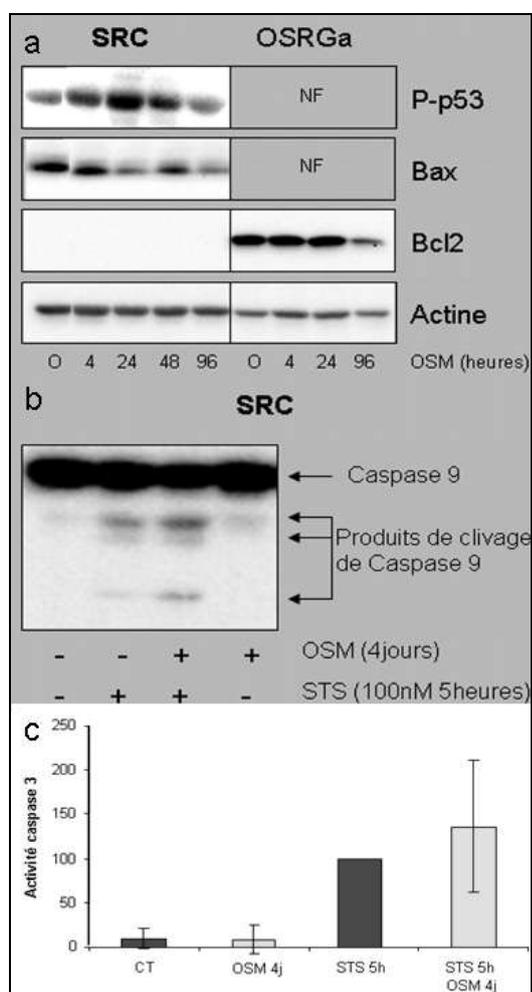


Figure 38: Induction des protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules SRC.

a- Western blot de P-p53, Bax et Bcl2 sur des SRC ou OSRGa traitées de 0 à 4 jours par l'OSM (NF= Non Fait)

b- Western blot de la caspase 9 dans les cellules SRC après traitement par OSM et/ou STS

c- Quantification de l'activité caspase 3 dans la lignée SRC déterminée par un test fluorimétrique.

Valeurs rapportées à 100 pour la Staurosporine seule. Moyenne réalisée sur 3 expériences indépendantes.

Comme dans les ostéosarcomes, l'OSM induit l'activation (phosphorylation) de p53 dans les SRC mais celle-ci est transitoire, avec un pic d'induction à 24h (Figure 38a). De plus, l'activation de p53 ne se traduit pas par une élévation d'expression de Bax (protéine pro-apoptotique) qui est même légèrement réduite (Figure 38a). Contrairement à l'ostéosarcome OSRGa, Bcl2 (protéine anti-apoptotique) n'est pas détectable dans les cellules SRC. L'OSM associée à la STS augmente le clivage de la caspase 9, indiquant l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure 38b). L'activation de la caspase 3, effectrice de l'apoptose, est cependant variable selon les expérimentations : elle apparaît plus activée dans les conditions OSM+STS mais de manière non significative (Figure 38c).

En résumé, l'OSM sensibilise uniquement la lignée SRC à la mort induite par la staurosporine. La voie mitochondriale de l'apoptose semble activée (activation de p53 et de la caspase 9), mais sans augmentation du ratio Bax/Bcl2.

4. Activité de l'OSM sur les caractéristiques cellulaires

Sur les ostéosarcomes, l'inhibition de prolifération et la sensibilisation à l'apoptose par l'OSM sont associées à des changements morphologiques et à l'induction de la différenciation (Chipoy et al., 2004 ; Chipoy et al., 2007 ; Brounais et al., en révision). Cependant, l'OSM induit également une diminution d'adhésion et une augmentation de la migration de ces cellules, ce qui pourraient favoriser la dissémination métastatique (Brounais et al., 2008). De même dans le cancer du sein, l'OSM induit la différenciation, des changements morphologiques, une perte d'adhésion et une augmentation de la migration (Jorcyk et al., 2006).

L'effet de l'OSM sur la morphologie, la différenciation, l'adhésion et la migration a donc été analysé sur les lignées de chondrosarcome et sarcome d'Ewing.

a. SRC

- Morphologie

Dès 3 jours de traitement avec l'OSM, les cellules SRC deviennent plus compactes : on observe une élévation du rapport nucléo-cytoplasmique (Figure 39).

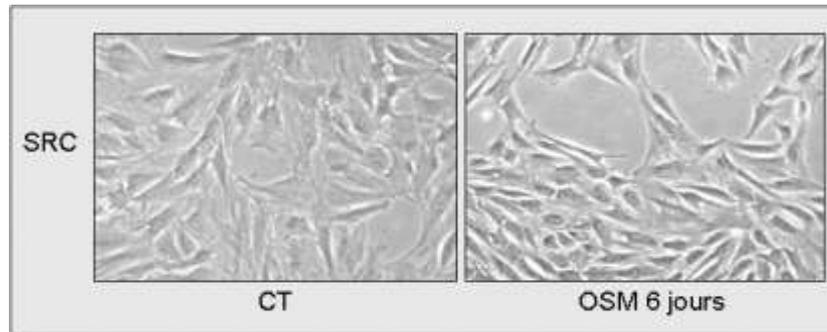


Figure 39 : Morphologie des cellules SRC. Photographie des cellules SRC en condition non traitée (CT) ou traitée (OSM) par microscopie optique x100

- Différenciation

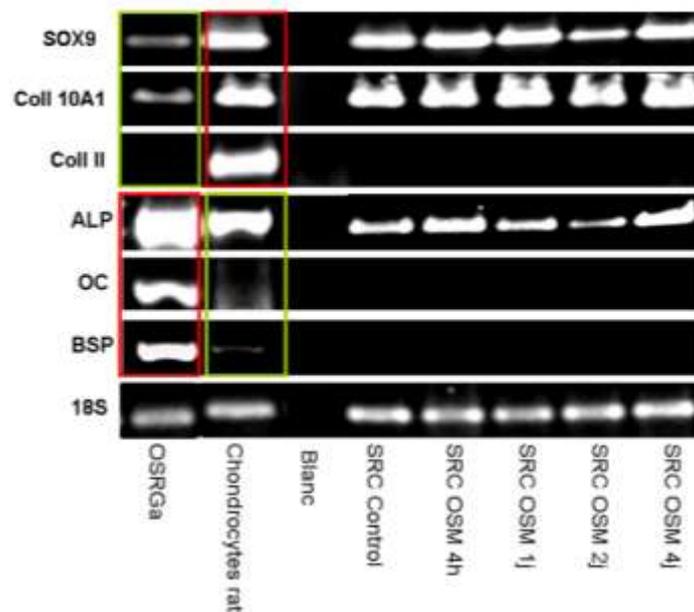


Figure 40 : Marqueurs de différenciation des cellules SRC. Analyse par RT-PCR des transcrits des marqueurs chondrocytaires (SOX9, Coll 10 et Coll 2) et ostéoblastiques (ALP, OC et BSP) après 0 à 4 jours de traitement par l'OSM

L'analyse par RT-PCR de divers marqueurs chondrocytaires (SOX9, Coll2, Coll10) ou ostéoblastiques (ALP, OC, BSP) indique tout d'abord que les cellules SRC sont SOX9 et Coll10 positives mais Coll2 négatives (Figure 40). Les cellules SRC expriment également un faible taux d'ALP, un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique, mais pas l'OC ou la BSP, des marqueurs plus tardifs de la différenciation ostéoblastique. Les cellules SRC présentent donc un statut de différenciation proche des chondrocytes non tumoraux mais pas de l'ostéosarcome OSRGa. Ce statut de différenciation chondrocytaire n'est pas modifié par le traitement par l'OSM (Figure 40). De même, l'expression des marqueurs ostéoblastiques n'est pas modifiée par l'OSM.

- Adhésion et migration

La capacité d'adhésion des cellules SRC a été étudiée sur différents supports reflétant la matrice osseuse (collagène I) ou le tissu conjonctif en général (fibronectine, vitronectine). L'adhésion sur plastique non traité ou traité par la fibronectine ou vitronectine est diminuée de façon importante par l'OSM (Figure 41 ; diminution supérieure à 60% après 30 min). Après 2 heures, la perte d'adhésion induite par l'OSM est toujours significative sur fibronectine et vitronectine. L'adhésion des cellules SRC sur collagène I est moins importante que sur les autres supports et l'OSM ne réduit cette capacité de façon significative qu'après 90 min d'adhésion.

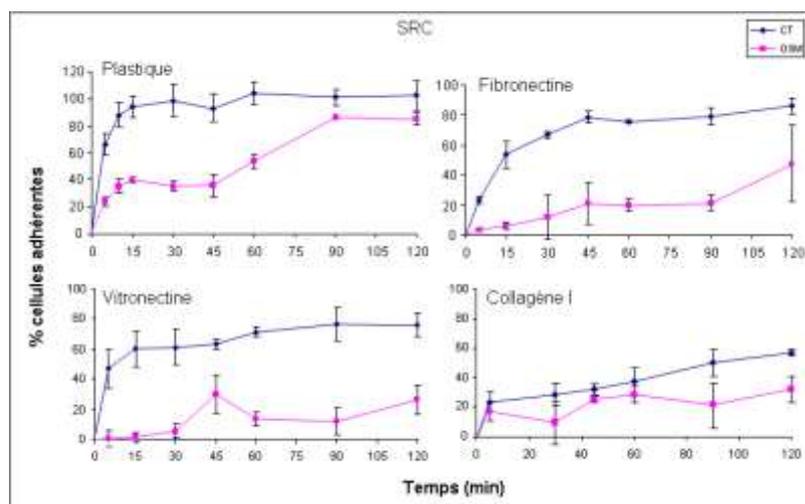


Figure 41 : Adhésion des cellules SRC. Cinétique d'adhésion réalisée sur 2 heures sur 4 supports différents. Les cellules OSM ont été prétraitées pendant 3 jours par l'OSM

Cette réduction d'adhésion peut expliquer le changement de morphologie, comme le montrent les photos prises dès 30 minutes d'adhésion où l'OSM diminue fortement l'étalement des cellules (Figure 42).

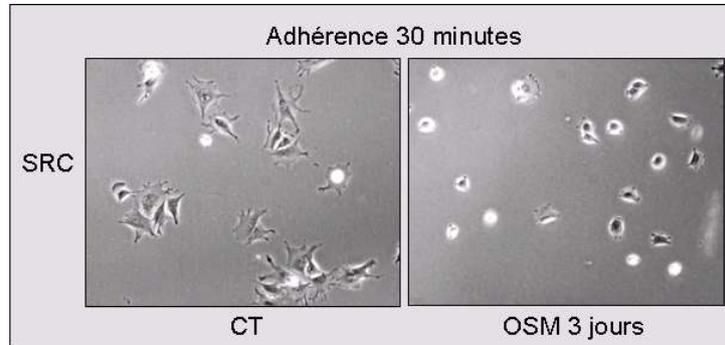


Figure 42 : *Morphologie des cellules SRC 30 minutes après leur ensemencement. Photographie des cellules en condition non traitée (CT) ou traitée (OSM 3 jours), sur support plastique, par microscopie optique x100*

Cette réduction d'adhésion peut aussi avoir pour conséquence in vivo une facilitation de la dissémination métastatique de la tumeur. Mais contrairement aux ostéosarcomes, si l'adhésion des SRC est diminuée, la capacité de migration des cellules se semble pas modifiée par l'OSM aussi bien après 15 minutes (Figure 43) ou 3 jours de traitement par l'OSM ou en diminuant les quantités de sérum dans le milieu (résultats non montrés).

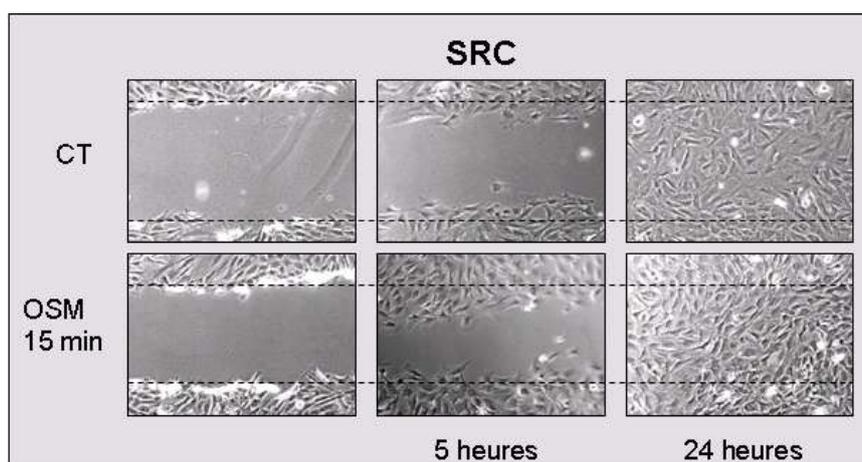


Figure 43 : *Migration des cellules SRC. La cicatrice dans le tapis cellulaire est réalisée 15 minutes après le traitement par l'OSM et le comblement de cette cicatrice est observé sur 24 heures par microscopie optique x100.*

Sur les cellules SRC, l'OSM montre donc des propriétés anticancéreuses intéressantes en induisant à la fois une action antiproliférative et une sensibilisation à l'apoptose. Toutefois il faut rester vigilant sur un potentiel pouvoir métastatique par perte d'adhésion cellulaire.

b. SW1353

- Morphologie

En présence d'OSM, les cellules de chondrosarcome SW1353 s'allongent dès 3 jours de traitement (Figure 44). Cette morphologie ressemble à celle des ostéosarcomes traités par l'OSM (Chipoy et al., 2004).

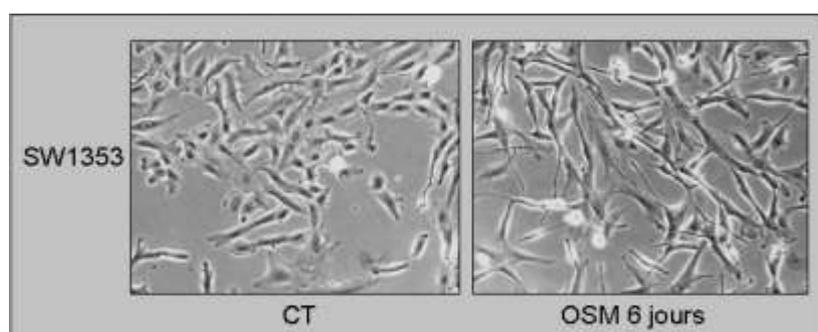


Figure 44 : Morphologie des cellules SW1353. Photographie des cellules SW1353 en condition non traité (CT) ou traité (OSM) par microscopie optique x100

- Différenciation

Par RT-PCR, le chondrosarcome SW1353 apparaît SOX9, Coll10 et Coll2 positif. Cette lignée apparaît proche des chondrocytes non transformés contrairement à l'ostéosarcome Mg63. En 4 jours de traitement, l'expression des marqueurs chondrocytaires, reflétant le statut de différenciation, n'est pas significativement modifiée par l'OSM (Figure 45).

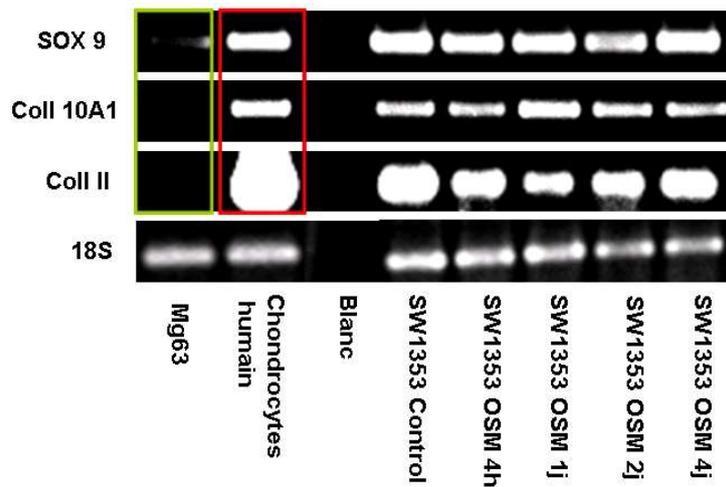


Figure 45 : Marqueurs de différenciation des cellules SW 1353. Analyse par RT-PCR des transcrits des marqueurs chondrocytaires (SOX9, Coll 10 et Coll 2) après 0 à 4 jours de traitement par l'OSM

- Adhésion et migration

L'OSM ralentit l'adhésion des cellules SW1353 sur les 2 supports testés (plastique non traité et traité par la fibronectine) mais cet effet est moins important que pour les SRC (Figure 46). L'OSM ne modifie pas la migration des cellules SW1353 après 15 minutes ou 3 jours de traitement par l'OSM (résultats non montrés).

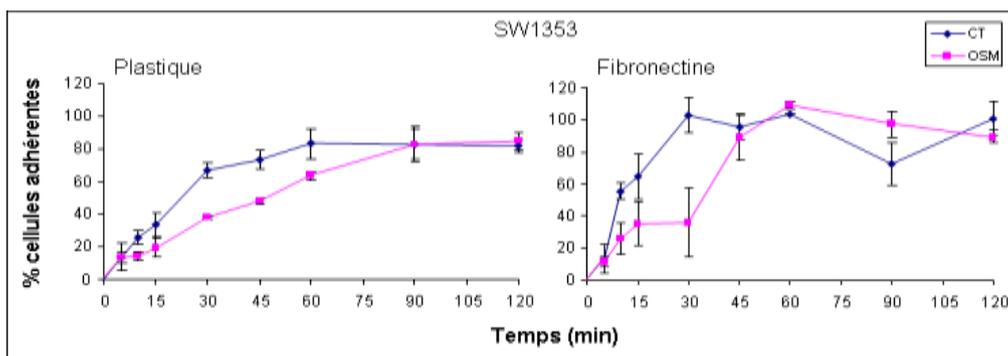


Figure 46 : Adhésion des cellules SW1353. Cinétique d'adhésion réalisée sur 2 heures sur 2 supports. Les cellules OSM ont été prétraitées pendant 3 jours par l'OSM.

La diminution d'adhésion des cellules SRC et SW1353 lors du traitement par l'OSM apparaît alors comme un point commun des chondrosarcomes.

c. Lignées de Sarcome d'Ewing

- Morphologie

Pour toutes les lignées de sarcome d'Ewing, l'OSM ne modifie pas la morphologie caractéristique de ces petites cellules rondes ; seules les TC71 forment quelques prolongements quand elles sont traitées avec l'OSM (Figure 47).

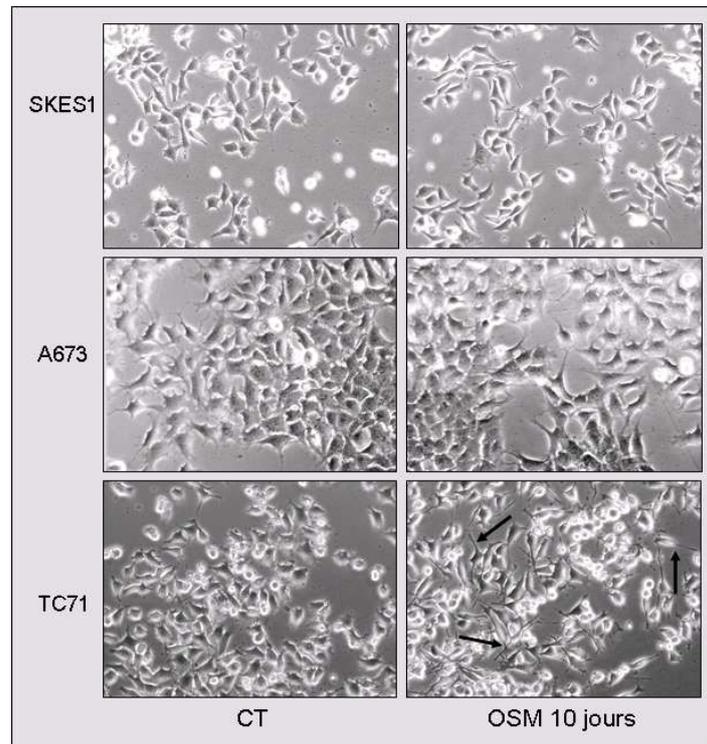


Figure 47 : Morphologie de lignées de Sarcome d'Ewing. Photographie des cellules SKES1, A673 et TC71 en condition non traitée (CT) ou traitée (OSM) par microscopie optique x100

- Différenciation

Etant donné que l'OSM n'induit pas d'inhibition de prolifération, ne sensibilise pas à l'apoptose et n'induit pas de changement morphologique sur les sarcomes d'Ewing, l'effet de l'OSM sur les marqueurs chondrocytaires et ostéoblastiques n'a pas été étudié sur ces cellules.

- Adhésion et migration

Pour établir une comparaison avec les chondrosarcomes, l'analyse de l'adhésion et la migration a été étudiée sur 3 lignées de sarcome d'Ewing, répondant différemment du point de vue de la prolifération. L'OSM ne modifie ni l'adhésion des lignées de sarcomes d'Ewing analysées (A673, RDES et TC71, Figure 48) ni leur capacité de migration après 15 minutes ou 3 jours de traitement par l'OSM (résultats non montrés).

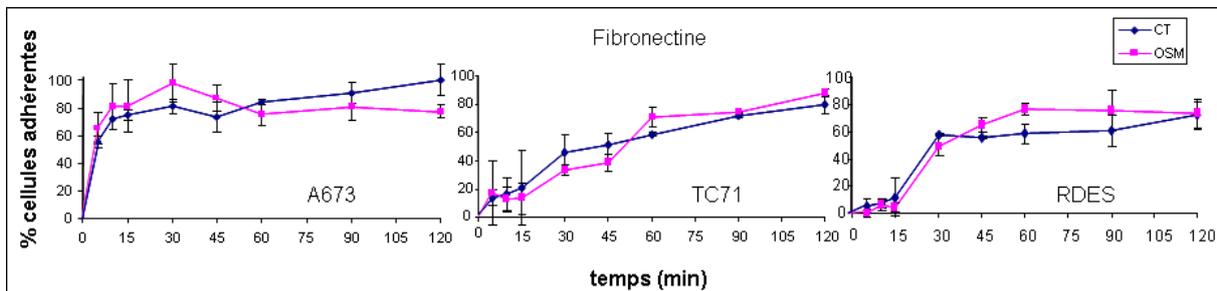


Figure 48 : Adhésion de 3 lignées de Sarcome d'Ewing : A673, TC71 et RDES. Cinétique d'adhésion réalisée sur 2 heures sur 1 support (fibronectine). Les cellules OSM ont été prétraitées pendant 3 jours par l'OSM.

Quelque soit l'effet de l'OSM sur la prolifération, la capacité de l'OSM à diminuer l'adhésion des cellules apparaît donc spécifique aux chondrosarcomes et ostéosarcomes.

5. Hypothèses sur la spécificité de réponse des cellules de sarcome d'Ewing à l'OSM

Au sein des tumeurs osseuses primitives, les sarcomes d'Ewing présentent une réponse à l'OSM originale. Cette cytokine augmente la prolifération de 5 lignées sur 7, ne sensibilise pas les cellules à l'apoptose et n'induit pas de changement morphologique. De plus, les récepteurs à l'OSM sont normalement exprimés et sont fonctionnels puisqu'ils permettent l'activation de

STAT3 et ERK 1/2 par l'OSM. Cette réponse cellulaire ressemble à celle observée sur les fibroblastes normaux où l'OSM augmente également la prolifération (Grant et Begley, 1999). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet pro-prolifératif de l'OSM, le rôle de l'oncogène EWS-FLI1 et la faible différenciation de ces cellules ont été analysés.

a. Etude du rôle de EWS-FLI-1

Pour étudier le rôle de EWS-FLI1, nous avons utilisé des cellules A673 modifiées pour exprimer un shRNA EWS-FLI1 inductible par la doxycycline (DOX)(Tirode et al., 2007). Dans ces cellules A673 1c, le traitement par la DOX permet de diminuer le taux du transcrit EWS-FLI1 de 55% dès 24 heures (Figure 49a) ainsi que de la protéine de fusion (Figure 49b).

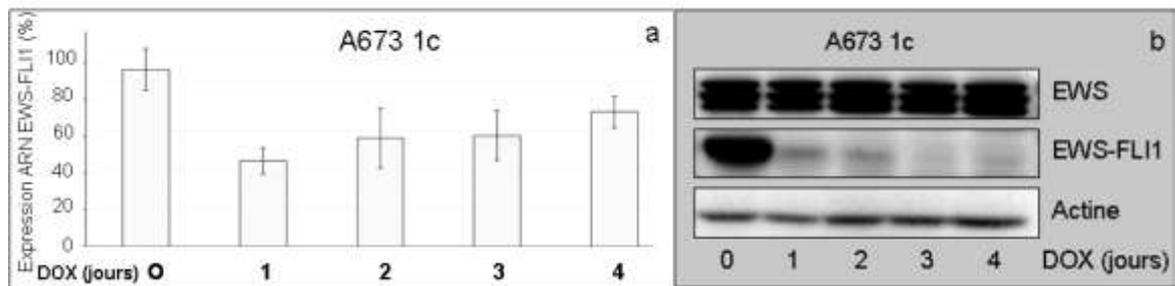


Figure 49: Taux d'expression de EWS-FLI1 dans les cellules A673 1c traitées par la DOX.

a- PCR quantitative de EWS-FLI1 dans la lignée A673 1c lors du traitement par doxycycline

b- Western blot de l'expression de la protéine de fusion dans les A673 1c après traitement par la doxycycline. L'expression de l'actine et de EWS à partir de l'allèle non transloqué démontre la spécificité du shRNA EWS-FLI1.

Après avoir vérifié la diminution d'expression de EWS-FLI1 dans ces cellules par la doxycycline, leur réponse à l'OSM en prolifération a été comparée à des cellules non traitées par la doxycycline.

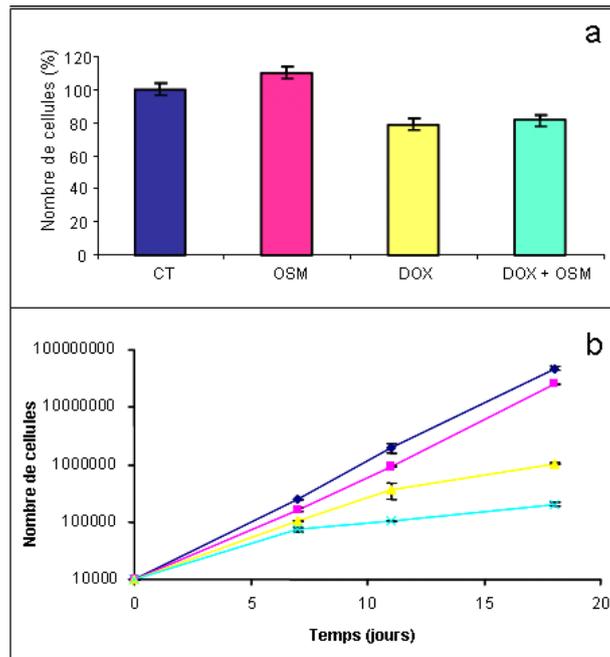


Figure 50: Effets de l'OSM sur la prolifération des cellules A673 1c. a- Prolifération des cellules A673 1c en présence ou non de doxycycline (4 jours), et d'OSM (3 jours) déterminé par test XTT. b- Prolifération des cellules A673 1c en présence ou non de doxycycline et d'OSM mesuré sur 18 jours par comptage au bleu trypan

Sur 3 jours de traitement par la DOX, la réduction de EWS-FLI1 ne fait pas apparaître l'effet anti-prolifératif de l'OSM (Figure 50a). Cependant, après 11 jours de traitement par la DOX, l'effet anti-prolifératif de l'OSM est significativement augmenté par rapport au contrôle sans DOX (Figure 50b). Après 18 jours, l'OSM inhibe la prolifération de 81% en présence de DOX, contre seulement 47% en absence de DOX ($p < 0,03$ entre ces deux conditions).

Il faut noter que l'OSM en absence de DOX apparaît légèrement anti-prolifératif sur les cellules A673, contrairement aux résultats obtenus précédemment qui ne montraient aucun effet de l'OSM (Figure 34). Une dérive des cellules en culture est possible.

On peut noter également que la DOX seule induit une diminution importante de la prolifération (Figure 50b), comme observé précédemment (Tirode et al., 2007).

Au bout de 18 jours de traitement par la doxycycline et l'OSM, les cellules deviennent également sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine contrairement à des cellules non traitées par la doxycycline (Figure 51).

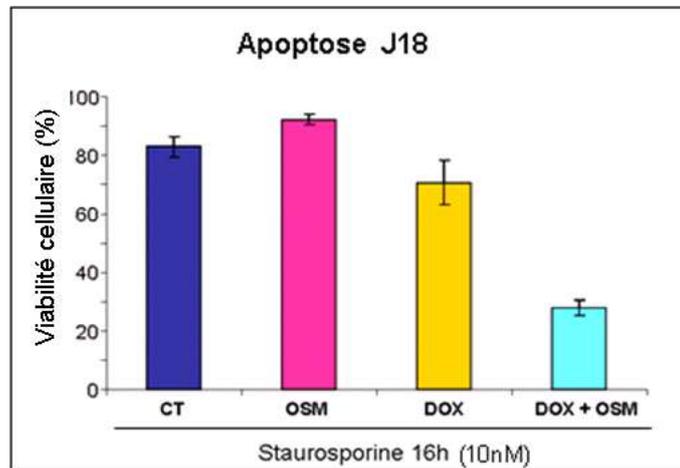


Figure 51 : Effets de l'OSM sur la mort des cellules A673 1c. Comptage au bleu trypan des cellules A673 1c traitées 18 jours par l'OSM et la doxycycline, puis avec la Staurosporine pendant 16 heures.

b. Etude du rôle du statut de différenciation

Les résultats sur les cellules A673 1c suggèrent que EWS-FLI1 ne bloque pas directement les effets anti-prolifératif de l'OSM mais après 11 jours d'inactivation de cet oncogène, les cellules se sont vraisemblablement différenciées (Tirode et al., 2007) et deviennent alors sensibles à l'inhibition de prolifération par l'OSM et à son effet pro-apoptotique en association avec un inducteur de mort.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'OSM sur la prolifération de MSC humaines (cellules peu différenciées correspondant aux sarcomes d'Ewing), et de chondrocytes humains (cellules différenciées correspondant aux chondrosarcomes).

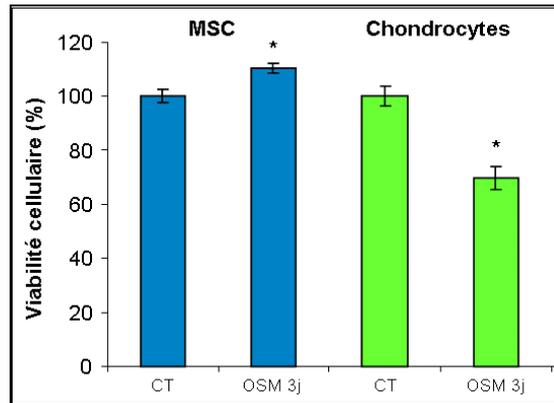


Figure 52 : Prolifération de cellules non tumorales humaines traitées par l'OSM.

*Le résultat est déterminé par test XTT après 3 jours de traitement par l'OSM et réalisé en quintuplet. * $p < 0,05$*

L'OSM augmente légèrement (10%) mais significativement la prolifération des MSC, alors qu'il est clairement anti-prolifératif sur les chondrocytes (Figure 52), confirmant le rôle clé du statut de différenciation des cellules dans la réponse à l'OSM.

CONCLUSION

Parmi les cytokines de la famille de l'IL6 testées, l'OSM et le LIF présentent des effets significatifs sur la prolifération de certaines lignées de chondrosarcome et sarcome d'Ewing lors du screening par test XTT. Les effets du LIF et de l'OSM sont alors analysés sur 18 jours et montrent que l'OSM est la seule cytokine ayant des effets à court terme et/ou à long terme, ce qui justifie son étude spécifique. Bien sûr, nous ne pouvons pas exclure totalement que les autres cytokines de cette famille ne présentant pas d'effet sur la prolifération à court terme aient des effets à plus long terme comme cela a été observé avec l'OSM sur 3 sarcomes d'Ewing.

OSM et prolifération

L'effet de l'OSM sur la prolifération a été analysée par deux techniques que sont le test XTT et le comptage au bleu de trypan. D'autres techniques pourraient être utilisées pour confirmer ces résultats : l'incorporation de thymidine tritiée ou de BRDU (Bromodeoxyuridine). L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux devra également être envisagée afin de confirmer le blocage en phase G1 quand l'OSM est anti-prolifératif et préciser l'impact sur le cycle quand l'OSM est pro-prolifératif.

En ce qui concerne les chondrosarcomes, l'OSM inhibe significativement la prolifération à court terme et à long terme des cellules SRC mais est sans effet sur la prolifération des SW1353. Sur les sarcomes d'Ewing, l'OSM est pro-proliférative dans 5 lignées (dont les 2 sarcomes d'Ewing de type 2), et anti-proliférative dans 1 lignée à long terme (les TC71). De façon générale, ces résultats indiquent que l'activité de l'OSM sur la prolifération peut soit s'amplifier soit disparaître après plusieurs jours de traitement. Quand l'effet est amplifié par un traitement plus long, il peut s'agir d'une augmentation dans le temps de l'expression / activation des récepteurs, voies de transduction et gènes utilisés par l'OSM, ou de la disparition d'un inhibiteur. Inversement, quand l'effet est visible à court terme uniquement, il peut s'agir d'une perte du récepteur ou de l'induction d'un inhibiteur. Des études ultérieures préciseront ces mécanismes.

L'OSM est une cytokine anti-proliférative pour les ostéosarcomes, induisant p21 et un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Chipoy et al., 2004 ; Bellido et al., 1997). L'étude de p21 sur 24 heures dans toutes les lignées ne révèle aucune corrélation avec l'effet de l'OSM sur la prolifération. Il serait cependant intéressant d'analyser si l'expression de cette protéine est modifiée à plus long terme. De même, l'étude d'autres protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération devra être réalisée. Etant donné le nombre important de protéines candidates, une approche par puces à ADN (pan-génomiques ou plus dédiées) semble justifiée. D'ors et déjà, il ne semble pas que la p27 ou la cycline D1 soient impliquées dans les effets de l'OSM sur la prolifération.

OSM et apoptose

L'OSM seule n'induit pas la mort des cellules d'ostéosarcome mais elle sensibilise ces cellules à l'apoptose induite par la Staurosporine : la protéine p53 est activée et le ratio Bax/Bcl2 est augmenté par l'OSM, permettant alors à de faibles doses de STS d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose (Chipoy et al., 2007).

Pour les cellules de chondrosarcome et de sarcome d'Ewing testées, l'OSM n'induit un effet pro-apoptotique que sur les SRC, avec une efficacité comparable à celle observée sur les ostéosarcomes. Là aussi, l'OSM seule n'induit pas la mort des SRC, mais elle sensibilise les cellules à l'apoptose induite par de faibles concentrations de STS (100nM). La voie mitochondriale de l'apoptose semble activée (activation de p53 et de la caspase 9), mais sans augmentation du ratio Bax/Bcl2 et sans activation significative de la caspase 3. Ces résultats pourraient être vérifiés par l'analyse du relargage de cytochrome c. L'apoptose pourrait être induite via d'autres protéines de la famille Bcl2 telles que Bim ou Bad et d'autres caspases effectrices comme la caspase 7. De même, d'autres voies de mort cellulaire peuvent être activées dans les cellules SRC (autophagie, sénescence...) et devront être analysées.

OSM et caractéristiques cellulaires

L'OSM modifie la morphologie, induit la différenciation, inhibe l'adhésion et favorise la migration des ostéosarcomes (Chipoy et al., 2004 ; Brounais et al., 2008). D'après notre étude, l'OSM modifie la morphologie, sans induire la différenciation, des chondrosarcomes mais pas des sarcomes d'Ewing.

Les résultats sur la différenciation ont été obtenus par RT-PCR semi-quantitative et doivent maintenant être confirmés par des tests plus fonctionnels (par exemple l'analyse de la matrice cartilagineuse par coloration bleu alcian). Nous avons alors recherché si les changements de morphologie en présence d'OSM étaient associés à des modifications d'adhérence ou de migration. Sur différentes protéines matricielles telles que fibronectine ou vitronectine, l'OSM a un effet anti-adhésion significatif pour les 2 lignées de chondrosarcome mais pas pour les sarcomes d'Ewing. La migration des cellules, analysée par un test de « cicatrice », n'est modifiée dans aucune lignée par l'OSM.

En résumé le seul effet significatif est la modification de morphologie induite sur les chondrosarcomes, qui est associée à une inhibition de l'adhésion des cellules. Ce phénomène pourrait être dû à une modification d'expression de certaines intégrines impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire, et pourrait favoriser le pouvoir métastatique des cellules (Brounais et al., 2008).

Résumé des effets observés

Tous les effets de l'OSM analysés sont résumés dans le tableau suivant.

	Origine	Lignée	EWS-FLI1	Prolifération 3 jours	Prolifération 18 jours	morphologie	différenciation	adhésion	migration	apoptose	p53
Chondrosarcome	rat	SRC	Non	-	-	Compacte	Non	inhibition	Non	Sensibilisé	OK
	humain	SW1353		0	0	Allongée		inhibition	Non	Non	muté
Sarcome Ewing	humain	TC71	Type 1	0	-	Dendritique?	?	Non	Non	Non	muté
		SKNMC		0	+	Pas de modification		?			muté
		EW24						?			OK
		A673		0	0	Non		Non	muté		
		TC32		+	0	?		OK			
		SKES1	Type 2	+	+	Pas de modification		?			muté
		RDES						Non	Non		muté

Tableau IIIII : Résumé des effets de l'OSM sur toutes les lignées cellulaires étudiées

+ : pro-prolifératif ; - : anti-prolifératif ; 0 : pas d'effet sur la prolifération ; ? : non analysé,

OK : fonctionnel

Il apparaît alors clairement des réponses différentes des chondrosarcomes par rapport aux sarcomes d'Ewing mais également au sein d'un même type tumoral. Les effets observés sur les cellules SRC ressemblent à ceux sur les ostéosarcomes. Les cellules SW1353 sont moins sensibles à l'OSM que les SRC puisque seules la morphologie et l'adhérence sont modifiées.

La réponse de lignées de Sarcome d'Ewing apparaît originale et notamment la résistance et l'effet pro-prolifératif de l'OSM paraissent intéressants à approfondir. L'objectif est alors de comprendre les mécanismes influençant la réponse à l'OSM.

Récepteur

Les sous unités formant les deux types de récepteur de l'OSM sont exprimés dans toutes les lignées testées, ceci n'explique donc pas les différences de réponse des lignées.

L'OSM peut potentiellement exercer son action par les deux types de récepteur, OSMRB+gp130 ou LIFR+gp130, mais puisque le LIF n'a pas le même effet que l'OSM sur la prolifération, on peut penser que l'OSM transduit le signal par le récepteur OSMRB+gp130 qui lui est spécifique. On pourrait vérifier cette hypothèse en utilisant un inhibiteur de l'OSMRB ou du LIFR (Anticorps anti-récepteur ou cytokine antagoniste).

Voies de signalisation

STAT3 et ERK1/2 sont activés par l'OSM dans toutes les lignées, le récepteur est donc fonctionnel.

Les différences d'activation de STAT3 et ERK1/2 ne permettent pas d'expliquer les différences de réponse des lignées.

Il a déjà été montré que STAT3 était fréquemment activé dans les sarcomes d'Ewing de manière constitutive, et ceci serait en lien avec la pathogenèse mais pas avec EWS-FLI1 (Lai et al., 2006). L'activation constitutive de ERK1/2 a également été observée dans les sarcomes d'Ewing et aurait un rôle dans l'activité oncogénique de la protéine de fusion EWS-FLI1 et ce d'autant plus dans les types 2 (Silvany et al., 2000). Cependant, les différences de taux constitutif de STAT3 ou ERK1/2 activé ne corrélerent pas avec l'effet de l'OSM et par exemple l'activation constitutive de ERK1/2 dans les cellules SRC n'empêche en rien l'activité anti-proliférative de l'OSM.

Statut p53

Comme dans la majorité des tumeurs, l'altération de p53 dans les chondrosarcomes est corrélée avec une plus grande agressivité (Oshiro et al., 1998). Dans les SRC, p53 est activée par l'OSM (et donc vraisemblablement sauvage) et ces cellules sont sensibles à l'OSM, alors que p53 est mutée et non fonctionnelle dans les SW1353 (Brodowicz et al., 1999) qui sont résistantes à l'OSM (tableau VIII). De même, l'OSM inhibe la prolifération des chondrocytes non transformés. La différence de réponse entre les SW1353, les SRC et les chondrocytes peut donc être liée à leur statut p53 (muté / fonctionnel) comme cela avait déjà été observé dans les ostéosarcomes (Chipoy et al., 2007). En revanche, pour les sarcomes d'Ewing, la réponse à l'OSM n'apparaît pas liée au statut p53 (tableau VIII). En conclusion, le rôle de p53 dans la réponse à l'OSM des chondrosarcomes doit maintenant être confirmé sur un plus grand nombre de lignées.

Sur les sarcomes d'Ewing, nos résultats suggèrent que l'activité originale de l'OSM n'est pas liée à des défauts d'expression ou d'activation du récepteur, STAT3, ERK1/2, p21 ou p27 et n'est pas corrélé au statut p53, p14, p15 ou p16 (tableau VIII et données non montrées).

Rôle de EWS-FLI1 et du statut de différenciation

Nous pouvons alors classer les tumeurs osseuses primitives en deux groupes:

Les chondrosarcomes et les ostéosarcomes sont des tumeurs différenciées et l'OSM provoque un effet anti-prolifératif, une modification de la morphologie et de l'adhésion et une sensibilisation à l'apoptose. Les tumeurs présentant une p53 mutée sont cependant résistantes aux effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques de l'OSM.

Les sarcomes d'Ewing sont des tumeurs peu différenciées caractérisées par une translocation chromosomique de type EWS-FLI1 et l'OSM n'a alors pas d'effet ou un effet pro-prolifératif.

Le type de réponse pourrait donc dépendre du niveau de différenciation ou de la présence de la protéine de fusion, ces deux hypothèses ont donc été envisagées.

Dans les cellules A673 modifiées stablement pour exprimer un ShRNA EWS-FLI1 inducible par la doxycycline, le traitement par la DOX permet de diminuer significativement le taux du transcrit EWS-FLI1 (mais il reste tout de même un taux résiduel de 45%), et de manière encore plus importante, le taux de la protéine de fusion. Cette différence peut s'expliquer si l'ARN se trouve à un taux limitant. Sur 3 jours de traitement par la DOX, la réduction de EWS-FLI1 ne fait pas apparaître l'effet anti-prolifératif ou pro-apoptotique de l'OSM, cependant, après 18 jours de traitement par la DOX, l'effet anti-prolifératif et pro-apoptotique de l'OSM sont significativement augmenté par rapport au contrôle sans DOX.

Nous montrons également que l'OSM est pro-prolifératif sur les cellules peu différenciées (cellules souches mésenchymateuses et sarcomes d'Ewing) et anti-prolifératif sur les cellules différenciées (chondrocytes, chondrosarcomes) indépendamment de leur statut tumoral ou non. L'OSM a déjà été montré comme anti-prolifératif sur les ostéoblastes (Shih et Yen, 1999) (Chipoy et al, 2004). Le type de réponse à l'OSM semble donc fortement lié au niveau de différenciation.

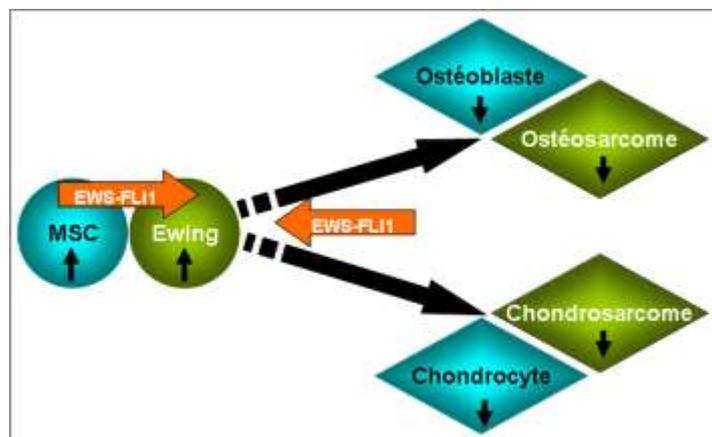


Figure 53 : Schéma de l'effet de l'OSM sur la prolifération selon le niveau de différenciation

Les flèches représentent les effets pro-prolifératifs (sur les cellules peu différenciées) ou anti-prolifératifs (sur les cellules différenciées). La protéine de fusion EWS-FLI1 permettrait la transformation tumorale des MSC et le maintien des cellules dans un statut de faible différenciation.

Nous proposons donc l'hypothèse que le contexte cellulaire de différenciation contrôle la réponse à l'OSM (Figure 54). Outre le rôle de EWS-FLI1 dans la transformation tumorale des cellules souches mésenchymateuses, la protéine de fusion n'aurait pas un effet direct (à court terme) sur l'inhibition de prolifération par l'OSM mais servirait à maintenir la cellule dans un état peu différencié responsable de la résistance à l'OSM. Le fait de bloquer cette protéine par un shRNA sur plusieurs semaines permet d'induire la différenciation et donc indirectement l'effet anti-prolifératif de l'OSM. L'effet serait donc dicté au niveau des gènes et facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire, tels que Cbfa1 ou SOX9.

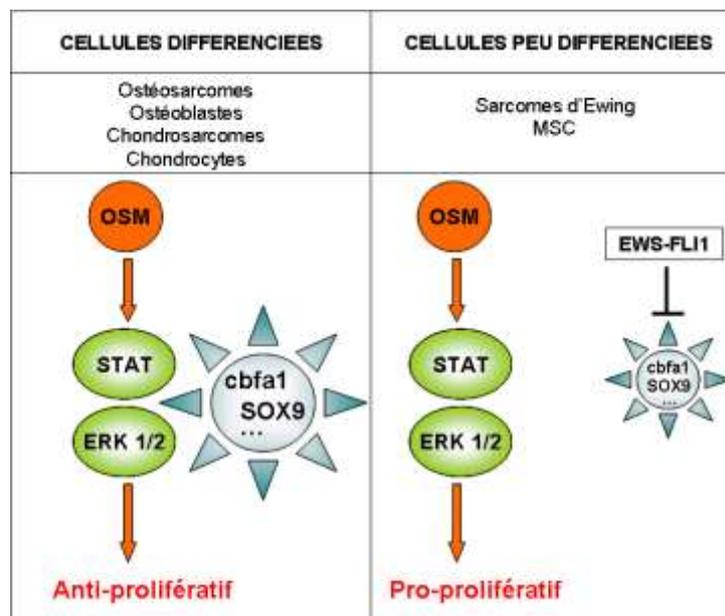


Figure 54 : Hypothèse du contexte cellulaire de différenciation.

Dans les cellules différenciées, la présence de facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation permet à l'OSM d'induire un signal anti-prolifératif. Dans les cellules non différenciées normales ou en cas de blocage de la différenciation par EWS-FLI1, l'absence de ces facteurs de transcription représente un contexte dans lequel l'OSM devient pro-prolifératif.

Perspectives d'étude

Pour approfondir l'hypothèse du rôle de EWS-FLI1 et de la différenciation dans la réponse à l'OSM, il faudrait modifier d'autres lignées de sarcome d'Ewing avec le ShEWS-FLI1 par technique lentivirale (expérimentations en cours) ou inversement analyser les effets de l'OSM sur des lignées d'ostéosarcomes ou chondrosarcomes modifiées pour exprimer EWS-FLI1. Il faudra également vérifier le niveau de différenciation de toutes les lignées testées par RT-PCR, test de minéralisation, coloration bleu alcian ou autre test caractérisant un niveau de différenciation. De plus, notre étude des marqueurs chondrocytaires n'est pas forcément un bon reflet de la réalité puisque quand les chondrocytes sont cultivés en monocouche ils peuvent se dédifférencier et perdre leurs marqueurs chondrocytaires. Il faudrait étudier ces marqueurs directement à partir des biopsies sur les modèles animaux ou dans des conditions de culture (3 dimensions, hypoxie...) permettant le maintien du phénotype chondrocytaire. Enfin, l'interaction potentielle des STATs ou kinases activés par l'OSM et les facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation (Cbfa1, SOX9...) devra être étudiée.

Puisque l'OSM est pro-proliférative sur certaines cellules, elle pourrait avoir un rôle dans l'apparition ou l'agressivité des sarcomes d'Ewing. Le dosage de l'OSM endogène pourrait être réalisé dans les surnageants de culture (si l'OSM est produit par les cellules tumorales), le sérum de patients (si l'OSM est libéré dans la circulation sanguine) ou la biopsie de tumeur (si l'OSM est produit localement par les cellules tumorales ou cellules infiltrant la tumeur comme les lymphocytes, macrophages...).

Les effets anti-prolifératifs et pro-apoptiques de l'OSM dans les chondrosarcomes devront être confirmés in-vivo. Cette cytokine sera donc testée dans la modèle de rat de chondrosarcome SRC disponible au laboratoire.

Perspectives cliniques

Cette étude ouvre des perspectives pour la clinique. Certains paramètres pourraient être utilisés comme **facteurs prédictifs** de la réponse à l'OSM, tel le statut p53 ou le niveau de différenciation des tumeurs.

Concernant l'utilisation de l'OSM dans les sarcomes d'Ewing, cette cytokine doit être considérée comme une **cible thérapeutique** de manière générale, mais dans le cas d'une inhibition de EWS-FLI1, elle pourrait devenir un agent anticancéreux intéressant.

L'OSM a un **intérêt thérapeutique** potentiel dans les ostéosarcomes et chondrosarcomes du fait de son effet anti-prolifératif et pro-apoptotique (en association avec d'autres cytotoxiques). Sur les modèles de rat d'ostéosarcome, l'OSM a prouvé son activité anti-tumorale (Brounais et al., 2008). Des études chez l'homme ont montré que L'OSM a également un rôle dans d'autres types tumoraux comme le mélanome ou le cancer du poumon.

Toutefois, il subsiste certaines **limites** à l'utilisation thérapeutique de l'OSM comme adjuvant notamment dans le cadre du chondrosarcome :

- Les données de bibliographie montrent qu'en général au sein d'un même type tumoral, les tumeurs peu différenciées ont de moins bon pronostic que les tumeurs différenciées, et notamment dans le cas des chondrosarcomes (Boeuf et al., 2008). Il se peut donc que l'OSM ne soit pas efficace sur les chondrosarcomes peu différenciés, qui sont justement ceux de moins bon pronostic.
- Les chondrosarcomes étant des tumeurs très peu vascularisées, il faudra que le mode d'administration permette à l'OSM d'atteindre les cellules tumorales au sein de la matrice cartilagineuse.

- De plus, la diminution d'adhésion des cellules tumorales traitées par l'OSM pourrait favoriser leur dissémination métastatique (bien que nous n'ayons pas détecté d'accélération de la migration).
- Une autre limite concerne les effets secondaires généraux inflammatoires de l'OSM, nécessitant une administration locale et/ou faible de cette cytokine. Actuellement, des études pharmacologiques de toxicité et de biodisponibilité de l'OSM n'ont été réalisées que chez la souris et le singe (Loy et al., 1999).
- L'action de l'OSM n'est pas spécifique des cellules tumorales puisqu'elle altère la biologie des chondrocytes et des ostéoblastes, entraînant des effets indésirables sur les tissus sains (perte osseuse, dégradation du cartilage).

L'OSM est donc une cytokine montrant des propriétés anticancéreuses très intéressantes dans divers types tumoraux, permettant d'envisager son utilisation thérapeutique en tant qu'adjuvant de chimiothérapies classiques. Toutefois, les questions de biodisponibilité, de toxicité, de résistance et de dissémination métastatique sont des problèmes primordiaux à étudier avant d'envisager son utilisation chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

139 références bibliographiques

- Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C.N., Atkinson, M., and Sayegh, M.H. 2008. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57(7): 1759-1767.
- Adams, S.L., Cohen, A.J., and Lasso, L. 2007. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol* 213(3): 635-641.
- Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V., and Ciliberto, G. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 187(4): 461-468.
- Ameglio, F., Bonifati, C., Fazio, M., Mussi, A., Trento, E., Cordial Fei, P., Donati, P., Pimpinelli, F., D'Auria, L., and Carducci, M. 1997. Interleukin-11 production is increased in organ cultures of lesional skin of patients with active plaque-type psoriasis as compared with nonlesional and normal skin. Similarity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and interleukin-8. *Arch Dermatol Res* 289(7): 399-403.
- Ando, K., Mori, K., Redini, F., and Heymann, D. 2008. RANKL/RANK/OPG: Key Therapeutic Target in Bone Oncology. *Curr Drug Discov Technol* 5(3): 263-268.
- Arvand, A., and Denny, C.T. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20(40): 5747-5754.
- Atreya, R., and Neurath, M.F. 2008. Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Curr Drug Targets* 9(5): 369-374.
- Barksby, H.E., Hui, W., Wappler, I., Peters, H.H., Milner, J.M., Richards, C.D., Cawston, T.E., and Rowan, A.D. 2006. Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes: implications for cartilage destruction and repair. *Arthritis Rheum* 54(2): 540-550.
- Baron, R. 2001. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Med.Sci.*, 12, 1260-1269.
- Barr, F.G., and Womer, R.B. 2007. Molecular diagnosis of ewing family tumors: too many fusions... ? *J Mol Diagn* 9(4): 437-440.
- Baumann, H., and Gauldie, J. 1994. The acute phase response. *Immunol Today* 15(2): 74-80.
- Bellido, T., Borba, V.Z., Roberson, P., and Manolagas, S.C. 1997. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* 138(9): 3666-3676.
- Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R.L., Schuck, A., Teot, L.A., and Juergens, H. 2006. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 11(5): 503-519.

- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jurgens, H., and Winkler, K. 2002. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 20(3): 776-790.
- Boeuf, S., Kunz, P., Hennig, T., Lehner, B., Hogendoorn, P., Bovee, J., and Richter, W. 2008. A chondrogenic gene expression signature in mesenchymal stem cells is a classifier of conventional central chondrosarcoma. *J Pathol* 216(2): 158-166.
- Boniface, K., Diveu, C., Morel, F., Pedretti, N., Froger, J., Ravon, E., Garcia, M., Venereau, E., Preisser, L., Guignouard, E., Guillet, G., Dagregorio, G., Pene, J., Moles, J.P., Yssel, H., Chevalier, S., Bernard, F.X., Gascan, H., and Lecron, J.C. 2007. Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J Immunol* 178(7): 4615-4622.
- Bozec, A., Bakiri, L., Hoebertz, A., Eferl, R., Schilling, A.F., Komnenovic, V., Scheuch, H., Priemel, M., Stewart, C.L., Amling, M., and Wagner, E.F. 2008. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* 454(7201): 221-225.
- Brodowicz, T., Wiltschke, C., Kandioler-Eckersberger, D., Grunt, T.W., Rudas, M., Schneider, S.M., Hejna, M., Budinsky, A., and Zielinski, C.C. 1999. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in soft tissue sarcoma cells by interferon-alpha and retinoids. *Br J Cancer* 80(9): 1350-1358.
- Brounais, B., Chipoy, C., Mori, K., Charrier, C., Battaglia, S., Pilet, P., Richards, C.D., Heymann, D., Redini, F., and Blanchard, F. 2008. Oncostatin M Induces Bone Loss and Sensitizes Rat Osteosarcoma to the Antitumor Effect of Midostaurin In vivo. *Clin Cancer Res* 14(17): 5400-5409.
- Brounais, B., David, E., Chipoy, C., Trichet, V., Ferré, V., Charrier, C., Duplomb, L., Berreur, M., Rédini, F., Heymann, D. and Blanchard F. Long term Oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone*. In revision
- Brown, T.J., Rowe, J.M., Liu, J.W., and Shoyab, M. 1991. Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* 147(7): 2175-2180.
- Broxmeyer, H.E., Li, J., Hangoc, G., Cooper, S., Tao, W., Mantel, C., Graham-Evans, B., Ghilardi, N., and de Sauvage, F.J. 2007. Regulation of myeloid progenitor cell proliferation/survival by IL-31 receptor and IL-31. *Exp Hematol* 35(4 Suppl 1): 78-86.
- Caplan, A.I. 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213(2): 341-347.
- Castillero-Trejo, Y., Eliazar, S., Xiang, L., Richardson, J.A., and Ilaria, R.L., Jr. 2005. Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res* 65(19): 8698-8705.
- Chen, D., Chu, C.Y., Chen, C.Y., Yang, H.C., Chiang, Y.Y., Lin, T.Y., Chiang, I.P., Chuang, D.Y., Yu, C.C., and Chow, K.C. 2008. Expression of short-form oncostatin M receptor as a decoy receptor in lung adenocarcinomas. *J Pathol* 215(3): 290-299.

- Chen, S.H., and Benveniste, E.N. 2004. Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(5): 379-391.
- Chen, S.H., Gillespie, G.Y., and Benveniste, E.N. 2006. Divergent effects of oncostatin M on astrogloma cells: influence on cell proliferation, invasion, and expression of matrix metalloproteinases. *Glia* 53(2): 191-200.
- Chipoy, C., Berreur, M., Couillaud, S., Pradal, G., Vallette, F., Colombeix, C., Redini, F., Heymann, D., and Blanchard, F. 2004. 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* 19(11): 1850-1861.
- Chipoy, C., Brounais, B., Trichet, V., Battaglia, S., Berreur, M., Oliver, L., Juin, P., Redini, F., Heymann, D., and Blanchard, F. 2007. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene* 26(46): 6653-6664.
- Chodorowska, G., Glowacka, A., and Tomczyk, M. 2004. Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 59(2): 189-193.
- Dambacher, J., Beigel, F., Seiderer, J., Haller, D., Goke, B., Auernhammer, C.J., and Brand, S. 2007. Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* 56(9): 1257-1265.
- de Alava, E., Panizo, A., Antonescu, C.R., Huvos, A.G., Pardo-Mindan, F.J., Barr, F.G., and Ladanyi, M. 2000. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am J Pathol* 156(3): 849-855.
- de Hooge, A.S., van de Loo, F.A., Bennink, M.B., de Jong, D.S., Arntz, O.J., Lubberts, E., Richards, C.D., and van den Berg, W.B. 2002. Adenoviral transfer of murine oncostatin M elicits periosteal bone apposition in knee joints of mice, despite synovial inflammation and up-regulated expression of interleukin-6 and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Am J Pathol* 160(5): 1733-1743.
- Desandes, E., Clavel, J., Berger, C., Bernard, J.L., Blouin, P., de Lumley, L., Demeocq, F., Freycon, F., Gembara, P., Goubin, A., Le Gall, E., Pillon, P., Sommelet, D., Tron, I., and Lacour, B. 2004. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer* 43(7): 749-757.
- Dillon, S.R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S.R., Haugen, H.S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J.L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D.L., Dasovich, M., Grant, F.J., Lockwood, L., Levin, S.D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parrish-Novak, J., and Gross, J.A. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5(7): 752-760.
- Ding, C., Parameswaran, V., Udayan, R., Burgess, J., and Jones, G. 2008. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 93(5): 1952-1958.
- Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., and Jorgensen, C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102(10): 3837-3844.

- Douglas, A.M., Grant, S.L., Goss, G.A., Clouston, D.R., Sutherland, R.L., and Begley, C.G. 1998. Oncostatin M induces the differentiation of breast cancer cells. *Int J Cancer* 75(1): 64-73.
- Ducy P. 2001. Contrôle génétique de la squelettogenèse. *Med.Sci.*, 12, 1242-1251.
- Ernst, M., Najdovska, M., Grail, D., Lundgren-May, T., Buchert, M., Tye, H., Matthews, V.B., Armes, J., Bhathal, P.S., Hughes, N.R., Marcusson, E.G., Karras, J.G., Na, S., Sedgwick, J.D., Hertzog, P.J., and Jenkins, B.J. 2008. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest* 118(5): 1727-1738.
- Faucheux, C., Nesbitt, S.A., Horton, M.A., and Price, J.S. 2001. Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J Exp Biol* 204(Pt 3): 443-455.
- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235(1): 176-190.
- Freyria, A.M., Courtes, S., and Mallein-Gerin, F. 2008. Differentiation des cellules souches mésenchymateuses adultes humaines : effet chondrogenique de la BMP-2. *Pathol Biol (Paris)*.
- Gaissmaier, C., Koh, J.L., and Weise, K. 2008. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury* 39 Suppl 1: S88-96.
- Ganss, B., Kim, R.H., and Sodek, J. 1999. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1): 79-98.
- Gearing, D.P., Comeau, M.R., Friend, D.J., Gimpel, S.D., Thut, C.J., McGourty, J., Brasher, K.K., King, J.A., Gillis, S., Mosley, B., and et al. 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255(5050): 1434-1437.
- Giachelli, C.M., and Steitz, S. 2000. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19(7): 615-622.
- Gonzalez, I., Vicent, S., de Alava, E., and Lecanda, F. 2007. EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med* 85(9): 1015-1029.
- Goren, I., Kampfer, H., Muller, E., Schiefelbein, D., Pfeilschifter, J., and Frank, S. 2006. Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds. *J Invest Dermatol* 126(3): 628-637.
- Grant, S.L., and Begley, C.G. 1999. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 5(9): 406-412.
- Grenier, A., Dehoux, M., Boutten, A., Arce-Vicioso, M., Durand, G., Gougerot-Pocidalò, M.A., and Chollet-Martin, S. 1999. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 93(4): 1413-1421.
- Halfter, H., Lotfi, R., Westermann, R., Young, P., Ringelstein, E.B., and Stogbauer, F.T. 1998. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 15(2): 135-147.

- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(Pt 1): 1-20.
- Herrlinger, K.R., Witthoef, T., Raedler, A., Bokemeyer, B., Krummenerl, T., Schulzke, J.D., Boerner, N., Kueppers, B., Emmrich, J., Mescheder, A., Schwertschlag, U., Shapiro, M., and Stange, E.F. 2006. Randomized, double blind controlled trial of subcutaneous recombinant human interleukin-11 versus prednisolone in active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 101(4): 793-797.
- Heymann, D., and Rousselle, A.V. 2000. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12(10): 1455-1468.
- Hirano, T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16(3-4): 249-284.
- Horn, D., Fitzpatrick, W.C., Gompper, P.T., Ochs, V., Bolton-Hansen, M., Zarling, J., Malik, N., Todaro, G.J., and Linsley, P.S. 1990. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 2(2-3): 157-165.
- Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D.E., and Triche, T.J. 2005. 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* 65(11): 4633-4644.
- Huang, H.Y., Illei, P.B., Zhao, Z., Mazumdar, M., Huvos, A.G., Healey, J.H., Wexler, L.H., Gorlick, R., Meyers, P., and Ladanyi, M. 2005. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 23(3): 548-558.
- Jaatinen, T., and Laine, J. 2007. Isolation of Hematopoietic Stem Cells from Human Cord Blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2: Unit2A 2.
- Jackson, L., Jones, D.R., Scotting, P., and Sottile, V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53(2): 121-127.
- Jaffe, N., Carrasco, H., Raymond, K., Ayala, A., and Eftekhari, F. 2002. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer* 95(10): 2202-2210.
- Jambhekar, N.A., Bagwan, I.N., Ghule, P., Shet, T.M., Chinoy, R.F., Agarwal, S., Joshi, R., and Amare Kadam, P.S. 2006. Comparative analysis of routine histology, immunohistochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and fluorescence in situ hybridization in diagnosis of Ewing family of tumors. *Arch Pathol Lab Med* 130(12): 1813-1818.
- Jorcyk, C.L., Holzer, R.G., and Ryan, R.E. 2006. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine* 33(6): 323-336.
- Karsenty, G. 2001. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* 142(7): 2731-2733.
- Klausen, P., Pedersen, L., Jurlander, J., and Baumann, H. 2000. Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 19(32): 3675-3683.

- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368(6469): 339-342.
- Kovar, H., Jug, G., Aryee, D.N., Zoubek, A., Ambros, P., Gruber, B., Windhager, R., and Gardner, H. 1997. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15(18): 2225-2232.
- Kumar, S., Chanda, D., and Ponnazhagan, S. 2008. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15(10): 711-715.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W.J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2): 165-176.
- Lacrouette, A., Nguyen, J.M., Pandolfino, M.C., Khammari, A., Dreno, B., Jacques, Y., Godard, A., and Blanchard, F. 2007. Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 26(6): 881-892.
- Lacrouette, A., Lartigue, A., Nguyen, J.M., Barbieux, I., Pandolfino, M.C., Khammari, A., Dréno, B., Paris, F., Jacques, Y., Blanchard, F., Godard, A. 2008. Responsiveness of cancer cells to Oncostatin M and/or IL-6 correlates with relapse-free survival of stage III melanoma patients treated with tumor-infiltrating lymphocytes. In press. *J. Pathol*
- Lai, R., Navid, F., Rodriguez-Galindo, C., Liu, T., Fuller, C.E., Ganti, R., Dien, J., Dalton, J., Billups, C., and Khoury, J.D. 2006. STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol* 208(5): 624-632.
- Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., and Redini, F. 2007. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 67(15): 7308-7318.
- Linsley, P.S., Kallestad, J., Ochs, V., and Neubauer, M. 1990. Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. *Mol Cell Biol* 10(5): 1882-1890.
- Lu, C., Rak, J.W., Kobayashi, H., and Kerbel, R.S. 1993. Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res* 53(12): 2708-2711.
- Lysy, P.A., Smets, F., Najimi, M., Sokal, E.M. 2008. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation*. Jun 13.
- Malaval, L., and Aubin, J.E. 2001. Biphasic effects of leukemia inhibitory factor on osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 36: 63-70.
- Malaval, L., Liu, F., Vernallis, A.B., and Aubin, J.E. 2005. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 204(2): 585-593.

- Malik, N., Kallestad, J.C., Gunderson, N.L., Austin, S.D., Neubauer, M.G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J.M., Shoyab, M., Wei, C.M., and et al. 1989. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9(7): 2847-2853.
- Manolagas, S.C., Bellido, T., and Jilka, R.L. 1995. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130. *Int J Immunopharmacol* 17(2): 109-116.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2): 115-137.
- Marie, P. 2001. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences* 17 : 1252-9
- Matsunobu, T., Tanaka, K., Matsumoto, Y., Nakatani, F., Sakimura, R., Hanada, M., Li, X., Oda, Y., Naruse, I., Hoshino, H., Tsuneyoshi, M., Miura, H., and Iwamoto, Y. 2004. The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. *Clin Cancer Res* 10(3): 1003-1012.
- Matsuo, K., and Irie, N. 2008. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 201-209.
- Metcalf, D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111(2): 485-491.
- Morikawa, Y., Tamura, S., Minehata, K., Donovan, P.J., Miyajima, A., and Senba, E. 2004. Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24(8): 1941-1947.
- Mukouyama, Y., Hara, T., Xu, M., Tamura, K., Donovan, P.J., Kim, H., Kogo, H., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. 1998. In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8(1): 105-114.
- Murphey, M.D., wan Jaovisidha, S., Temple, H.T., Gannon, F.H., Jelinek, J.S., and Malawer, M.M. 2003. Telangiectatic osteosarcoma: radiologic-pathologic comparison. *Radiology* 229(2): 545-553.
- Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., and Antoniou, J. 2006. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* 24(8): 1791-1798.
- Nakano, K., Okada, Y., Saito, K., and Tanaka, Y. 2004. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50(8): 2450-2458.
- Nakatani, F., Tanaka, K., Sakimura, R., Matsumoto, Y., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T., and Iwamoto, Y. 2003. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 278(17): 15105-15115.
- Neuner, P., Urbanski, A., Trautinger, F., Moller, A., Kirnbauer, R., Kapp, A., Schopf, E., Schwarz, T., and Luger, T.A. 1991. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 97(1): 27-33.

- Ng, G., Winder, D., Muralidhar, B., Gooding, E., Roberts, I., Pett, M., Mukherjee, G., Huang, J., and Coleman, N. 2007. Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol* 212(3): 325-334.
- O'Hara, K.A., Kedda, M.A., Thompson, P.J., and Knight, D.A. 2003. Oncostatin M: an interleukin-6-like cytokine relevant to airway remodelling and the pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 33(8): 1026-1032.
- Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., Miyajima, A., and Tsujimura, T. 2005. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 166(3): 709-719.
- Oshiro, Y., Chaturvedi, V., Hayden, D., Nazeer, T., Johnson, M., Johnston, D.A., Ordonez, N.G., Ayala, A.G., and Czerniak, B. 1998. Altered p53 is associated with aggressive behavior of chondrosarcoma: a long term follow-up study. *Cancer* 83(11): 2324-2334.
- Ouyang, L., Shen, L.Y., Li, T., and Liu, J. 2006. Inhibition effect of Oncostatin M on metastatic human lung cancer cells 95-D in vitro and on murine melanoma cells B16BL6 in vivo. *Biomed Res* 27(4): 197-202.
- Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10: 63-76.
- Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H.H., and Lerner, U.H. 2002. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 169(6): 3353-3362.
- Papachristou, D.J., Goodman, M.A., Cieply, K., Hunt, J.L., and Rao, U.N. 2006. Comparison of allelic losses in chondroblastoma and primary chondrosarcoma of bone and correlation with fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Pathol* 37(7): 890-898.
- Peretz, A. 1993. [Osteocalcin, marker of bone metabolism]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 148(1-2): 90-96; discussion 97-99.
- Poli, V., Balena, R., Fattori, E., Markatos, A., Yamamoto, M., Tanaka, H., Ciliberto, G., Rodan, G.A., and Costantini, F. 1994. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *Embo J* 13(5): 1189-1196.
- Pontikoglou, C., Delorme, B., and Charbord, P. 2008. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen Med* 3(5): 731-741.
- Queen, M.M., Ryan, R.E., Holzer, R.G., Keller-Peck, C.R., and Jorecyk, C.L. 2005. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 65(19): 8896-8904.
- Richards, C.D., Brown, T.J., Shoyab, M., Baumann, H., and Gauldie, J. 1992. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 148(6): 1731-1736.
- Richards, C.D. 2004. Matrix catabolism in arthritis: priming the guns with oncostatin M. *J Rheumatol* 31(12): 2326-2328.

- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M.L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., and Stamenkovic, I. 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65(24): 11459-11468.
- Riggi, N., and Stamenkovic, I. 2007. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254(1): 1-10.
- Robling, A.G., Castillo, A.B., and Turner, C.H. 2006. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 455-498.
- Rodriguez-Galindo, C., Navid, F., Liu, T., Billups, C.A., Rao, B.N., and Krasin, M.J. 2008. Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann Oncol* 19(4): 814-820.
- Rorie, C.J., and Weissman, B.E. 2004. The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res* 64(20): 7288-7295.
- Rozeman, L.B., Cleton-Jansen, A.M., and Hogendoorn, P.C. 2006. Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop* 30(6): 437-444.
- Shih, C., and Yen, C.C. 1999. Effect of oncostatin-M on proliferation and activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 62(10): 710-716.
- Shin, H.I., Divieti, P., Sims, N.A., Kobayashi, T., Miao, D., Karaplis, A.C., Baron, R., Bringhurst, R., and Kronenberg, H.M. 2004. Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology* 145(3): 1376-1385.
- Silvany, R.E., Eliazar, S., Wolff, N.C., and Ilaria, R.L., Jr. 2000. Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. *Oncogene* 19(39): 4523-4530.
- Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A.I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M.C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T.K., Ruzicka, T., Zlotnik, A., and Homey, B. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117(2): 411-417.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., and Abbondanzo, S.J. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359(6390): 76-79.
- Strauer, B.E., and Kornowski, R. 2003. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 107(7): 929-934.
- Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C., and Takahashi, N. 1995. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17(2 Suppl): 87S-91S.
- Suda, T., Chida, K., Todate, A., Ide, K., Asada, K., Nakamura, Y., Suzuki, K., Kuwata, H., and Nakamura, H. 2002. Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. *Cytokine* 17(6): 335-340.
- Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Sekiguchi, T., Inoue, T., Katsuki, M., and Miyajima, A. 2003. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102(9): 3154-3162.

- Tanaka, M., and Miyajima, A. 2003. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 39-52.
- Thiéry, J.P., Perdereau, B., Gongora, R., Gongora, G., Mazabraud, A. 1982. Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat, l'ostéosarcome greffable du rat. *Sem Hôp Paris* 58 : 1686-1689
- Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. 2007. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11(5): 421-429.
- Tomeno, B., Forest M. 1990. Les tumeurs osseuses de l'appareil locomoteur. Schering-Plough, Levallois-Perret. Tome 2.
- Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., Gabriel, A. 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.* 148, 1-13
- Torchia, E.C., Jaishankar, S., and Baker, S.J. 2003. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 63(13): 3464-3468.
- Trepicchio, W.L., Bozza, M., Pedneault, G., and Dorner, A.J. 1996. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 157(8): 3627-3634.
- Tsuchiya, T., Sekine, K., Hinohara, S., Namiki, T., Nobori, T., and Kaneko, Y. 2000. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 120(2): 91-98.
- Vaananen, H.K., and Laitala-Leinonen, T. 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 132-138.
- Walker, E., McGregor, N., Poulton, I., Pompolo, S., Allan, E., Quinn, J., Gillespie, M., Martin, T., and Sims, N.A. 2008. Cardiotrophin-1 is an Osteoclast-Derived Stimulus of Bone Formation Required for Normal Bone Remodeling. *J Bone Miner Res*.
- Walkley, C.R., Qudsi, R., Sankaran, V.G., Perry, J.A., Gostissa, M., Roth, S.I., Rodda, S.J., Snay, E., Dunning, P., Fahey, F.H., Alt, F.W., McMahon, A.P., and Orkin, S.H. 2008. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev* 22(12): 1662-1676.
- Wang, W.D., Chen, Z.T., Li, D.Z., Duan, Y.Z., Wang, Z.X., and Cao, Z.H. 2004. [Oncostatin M gene therapy in mice bearing lung adenocarcinoma xenograft using a hypoxia/radiation dual-sensitive promoter]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 27(4): 240-243.
- Wei, L.H., Baumann, H., Tracy, E., Wang, Y., Hutson, A., Rose-John, S., and Henderson, B.W. 2007. Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. *Br J Cancer* 97(11): 1513-1522.
- Williams, P.A., Peacocke, A.R. 1965. The physical properties of a glycoprotein from bovine cortical bone (bone sialoprotein). *Biochim. Biophys. Acta.* 101:327-35.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., and Suda, T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3597-3602.

Zhang, X.G., Gu, J.J., Lu, Z.Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G.D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., and et al. 1994. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med* 179(4): 1337-1342.

Zou, L., Zou, X., Chen, L., Li, H., Mygind, T., Kassem, M., and Bunger, C. 2008. Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res* 26(1): 56-64.

Nom – Prénoms : DAVID Emmanuelle

Titre de la Thèse : Rôle de l'Oncostatine M dans la biologie des chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing

Résumé de la thèse :

Ostéosarcomes, chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing sont les principales tumeurs osseuses primitives et leur prise en charge doit être améliorée. Les sarcomes d'Ewing, dérivant des cellules souches mésenchymateuses (MSC), présentent la translocation EWS-FLI1. Les ostéosarcomes et chondrosarcomes sont plus différenciés, dans la voie ostéoblastique et chondrocytaire respectivement. L'oncostatine M (OSM), cytokine de la famille de l'Interleukine-6, montre des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques sur les ostéosarcomes ; l'objectif de cette étude a été de déterminer ses effets sur les chondrosarcomes et sarcomes d'Ewing. Nous avons identifié un chondrosarcome sensible aux effets anticancéreux de l'OSM mais avec des mécanismes d'action originaux : inhibition de prolifération indépendante de p21^{WAF1}, sensibilisation à l'apoptose faisant intervenir la caspase 9, p53 mais pas Bax/Bcl2. En revanche l'OSM présente un effet pro-prolifératif sur les sarcomes d'Ewing. La répression de EWS-FLI1 par un shRNA et l'analyse de MSC et chondrocytes suggèrent que cet oncogène maintient un état faiblement différencié responsable de l'effet pro-prolifératif de l'OSM. Cette étude indique que si l'OSM a un intérêt thérapeutique pour les chondrosarcomes et ostéosarcomes, la stratégie pour les sarcomes d'Ewing consisterait à inhiber l'OSM endogène ou à sensibiliser les cellules à l'action anti-proliférative de l'OSM, en réprimant EWS-FLI1 et en induisant leur différenciation.

Mots clés :

ONCOSTATINE M, CHONDROSARCOME, SARCOME D'EWING, EWS-FLI1, DIFFERENCIATION

JURY

Président : M. J.F. BIARD, Docteur en pharmacie, Professeur des Universités de Pharmacognosie, Nantes

Assesseurs : M. F. BLANCHARD, Chargé de Recherche, INSERM ERI7, Nantes

M. R. LE BOT, Docteur en pharmacie, Directeur d'Atlantic Bone Screen, Nantes

M. M. BAUD'HUIN, Docteur en pharmacie, Doctorant INSERM ERI7, Nantes

Adresse de l'auteur : 3 La charrie 44710 Port St Père