

Université de Montréal

**Le rôle de l'endothéline-1 dans l'invasion tumorale
des ostéosarcomes due aux métalloprotéases**

par
Mélanie Felx

Université de Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de MSc
en Sciences Biomédicales

Août 2005

©Mélanie Felx, 2005



W

4

U58

2006

V.041

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Le rôle de l'endothéline-1 dans l'invasion tumorale
des ostéosarcomes due aux métalloprotéases

présenté par :
Mélanie Felx

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Julio Fernandes
président-rapporteur

Florina Moldovan
directeur de recherche

Alain Moreau
codirecteur

Stéphane Roy
membre du jury

RÉSUMÉ

Les MMP sont une famille d'endopeptidases capable de dégrader la MEC et ont ainsi un rôle important à jouer dans le développement des tumeurs osseuses. Des niveaux plasmatiques élevés d'ET-1 ont été découverts chez des patients avec différentes tumeurs solides. Il y a de plus en plus d'évidences que l'ET-1 peut réguler l'expression de plusieurs MMP en particulier la MMP-2 et la MMP-9. Cette étude porte sur le rôle de l'ET-1 dans l'invasion tumorale due aux MMP. L'effet de l'ET-1, de la Big ET-1 et de l'IL-1 β sur les MMP-2 et 9, ainsi qu'un inhibiteur du NF- κ B ont été étudiés. Les résultats ont montré que l'ET-1 et ses récepteurs sont exprimés par les cellules d'ostéosarcomes et de chondrosarcomes et qu'ils peuvent induire l'expression de la MMP-2 et 9. Il a aussi été constaté que le PDTC, un inhibiteur de l'activation du NF- κ B, inhibe l'expression protéique de la MMP-2 et son activité enzymatique. Il a donc été conclu que les MMP, particulièrement les MMP-2 et 9, sont hyperexprimées dans les cellules d'ostéosarcome et que leur expression peut être induite par l'ET-1, la Big ET-1 et l'IL-1 β et inhibée par le PDTC. La poursuite de cette étude pourrait ainsi avoir un impact sur les méthodes thérapeutiques utilisées pour limiter l'invasion tumorale d'ostéosarcomes et pourrait appuyer l'utilisation d'un double blocage : MMP et récepteurs d'ET-1.

MOTS-CLÉS : ostéosarcome, matrice extracellulaire, endothéline-1, MMP-2, MMP-9, ET_A, ET_B, NF- κ B

ABSTRACT

MMPs are a family of endopeptidases that can degrade ECM, therefore they play an important part in the development of bone tumour. High plasmatic level of ET-1 has been found in patients with different solid tumour. There is growing evidence to support a role for ET-1 in the regulation of many MMPs, especially MMP-2 and MMP-9. This study aims at elucidating the role of ET-1 in the tumoral invasion caused by MMPs. The effect of ET-1, Big ET-1 and IL-1 β on MMP-2 and 9, as well as NF- κ B inhibitor were studied. Results showed that ET-1 and its receptors were expressed by many subtypes of chondrosarcoma and osteosarcoma cells and that they can induce MMP-2 and 9 expression and activity. It was also demonstrated that the use of PDTC, a NF- κ B activation inhibitor, blocks protein expression and enzymatic activity of MMP-2. Consequently, it was conclude that MMPs, especially MMP-2 and MMP-9, were overexpressed in osteosarcoma cells, that their expression can be induced by ET-1, Big ET-1 and IL-1 β and blocked by PDTC. Pursuing this study could have an impact on therapeutic method used to limit tumor invasion of osteosarcomas and proposes a double inhibition : MMPs and ET-1 receptors.

Key Words : osteosarcoma, endothelin-1, extracellular matrix, MMP-2, MMP-9, NF- κ B, ET_A, ET_B.

TABLES DES MATIÈRES :

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des Matières.....	v
Liste des Tableaux.....	ix
Liste des Figures.....	x
Liste des Sigles et Abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....1

CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....4

2.1. L'ENDOTHÉLINE-1 DANS L'OSTÉOSARCOME.....	5
2.1.1. L'ENDOTHÉLINE-1.....	6
2.1.1.1. Ce qu'on en sait.....	6
2.1.1.2. L'ET-1 et l'os.....	8
2.1.1.3. Rôle d'ET-1 dans le cancer.....	8
2.1.1.4. Les possibilités thérapeutiques.....	10
2.1.1.5. Les interactions entre ET-1 et MMP.....	11
2.1.1.6. L'ET-1 et le NF- κ B.....	12
2.1.1.7. L'ET-1 et le PTHrP.....	12-A
2.2. LES RÔLES ATTRIBUÉS AUX MMP DANS LA PROGRESSION CANCÉREUSE EN 2005.....	13
2.2.1. Caractéristiques.....	13
2.2.1.1. Les gélatinases.....	13
2.2.1.2. Les gélatinases dans l'ostéosarcome.....	15

2.2.2. La régulation des MMP.....	16
2.2.2.1. Le niveau transcriptionnel.....	16
2.2.2.2. L'activation du zymogène.....	17
2.2.2.3. L'inhibition des MMP.....	18
2.2.2.3.1. Les TIMP.....	18
2.2.2.3.2. L' α 2-macroglobuline.....	19
2.2.3. À quelles étapes de la propagation tumorale les MMP agissent-elles?.....	19
2.2.4. Les inhibiteurs synthétiques et les résultats des essais cliniques.....	20
2.2.5. Les MMP et le NF- κ B.....	21
2.3. L'OSTÉOSARCOME.....	24
2.3.1. Caractéristiques anatomiques et histologiques de l'ostéosarcome.....	24
2.3.2. Classement des différents types d'ostéosarcome.....	25
2.3.3. Les facteurs étiologiques, ces inconnus.....	26
2.3.4. Traitements actuels.....	27
2.3.5. Les limites de nos connaissances.....	28
2.4. LE CANCER.....	30
2.4.1. Étapes et Mécanismes du cancer.....	30
2.4.2. Plus spécifiquement, l'invasion tumorale.....	32
2.4.3. La matrice extracellulaire.....	33
2.4.3.1. Les composantes de la MEC.....	33
2.4.3.2. La dégradation de la MEC.....	34
2.5. HYPOTHÈSE.....	34
2.6. OBJECTIFS.....	35
<u>CHAPITRE 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	36
3.1. Cellules et Tissus.....	37

3.2. Isolation des cellules ostéoblastiques provenant des ostéosarcomes et leur caractérisation.....	38
3.3. Culture Cellulaire.....	39
3.4. Extraction d'ARN et RT-PCR.....	40
3.5. Dosage de protéines.....	42
3.6. Western Blot.....	42
3.7. Northern Blot.....	44
3.8. Zymographie.....	45
3.9. Hybridation <i>in situ</i>	45
3.10. Immunohistochimie.....	46
3.11. Coloration des lames.....	47
3.12. Immunofluorescence.....	47
3.13. Test ELISA.....	48
3.14. L'analyse statistique.....	48
<u>CHAPITRE 4. RÉSULTATS</u>	49
4.1. Article: The role of ET-1 in human Osteosarcoma regarding MMP-2 and MMP-9 induction involves transcription factor NF- κ B.....	51
4.2. Autres résultats.....	80
4.2.1. Translocation du NF- κ B du cytoplasme au noyau en fonction du temps de stimulation par l'ET-1.....	80
4.2.2. Caractéristiques des tumeurs provenant de biopsies de patients.....	82
4.2.3. Expression de la COX-2 selon le cycle cellulaire.....	84
4.2.4. Expression de l'ostéocrine par les tumeurs osseuses.....	87
4.2.5. Expression de divers facteurs prédictifs de la tumorigénicité de tumeurs osseuses.....	88
4.2.6. Détection de la forme alternative de l'ET-1 (1-31).....	91

<u>CHAPITRE 5. DISCUSSION</u>	93
5.1. L'endothéline-1 et ses récepteurs.....	94
5.2. Les interactions endothéline et métalloprotéases.....	95
5.3. Le rôle des MMP.....	98
5.4. Le rôle du NF- κ B.....	101
5.5. Le rôle des TIMP.....	102
5.6. Les autres facteurs.....	103
<u>CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	106
<u>CHAPITRE 7. SOURCES DOCUMENTAIRES</u>	110

LISE DES TABLEAUX :

<u>CHAPITRE 2 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE</u>	4
Tableau I : Le système Enneking pour les stages d'ostéosarcome.....	26
<u>CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	36
Tableau II : Les lignées cellulaires.....	37
Tableau III : Amorces et conditions d'utilisation pour PCR.....	42
Tableau IV : Liste des anticorps primaires utilisés pour analyse par Western Blot...	43
Tableau V : Liste des anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western Blot..	44
<u>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS</u>	49
<u>4.1. Inclus dans Article</u>	51
Table I : Characterisation of primary cell culture derived from human osteosarcoma tissues obtained intraoperatively.....	56
<u>4.2. Autres résultats</u>	80
Tableau VI : Caractéristiques des tumeurs osseuses collectées lors de ce travail.....	83

LISTE DES FIGURES :

<u>CHAPITRE 2 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE</u>	4
Figure 1 : La synthèse de l'endothéline-1.....	7
Figure 2 : L'activation de la pro-MMP-2 via le NF- κ B.....	23
<u>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS</u>	49
<u>4.1. Inclus dans Article</u>	51
Figure 1: ET-1 protein and gene expression in osteosarcoma tissue and cells.....	69
Figure 2. ET _A and ET _B expression in osteosarcoma tissue.....	70
Figure 3. ET _A and ET _B mRNA expression in osteosarcoma cells.....	71
Figure 4. Gelatinases protein expression in osteosarcoma tissue.....	72
Figure 5: Effect of ET-1 on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression and activation in osteosarcoma cell line.....	73
Figure 6: Effect of PDTC on MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 expression and on gelatinases activation in osteosarcoma cell line.....	74
Figure 7: Effect of ET-1 and Big ET-1 on the expression of NF- κ B p65 in osteosarcoma cell line.....	75
Figure 8 : Effect of ET-1, Big ET-1 and IL-1 β on cellular localization of p65 subunit of NF- κ B in osteosarcoma cells.....	76
<u>4.2. Autres résultats</u>	80
Figure 9: Effet de l'ET-1 sur la localisation cellulaire du NF- κ B p65 dans des cellules d'ostéosarcome.....	81
Figure 10 : Expression protéique de la COX-2 selon le cycle cellulaire dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome.....	85
Figure 11 : Expression de l'ARNm de l'ostéocrine par les tumeurs osseuses.....	87
Figure 12 : Expression de l'ARNm de divers facteurs dans des cellules de tumeurs osseuses.....	89

Figure 13 : Détection de la forme alternative de l'ET-1 (1-31).....92

CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....106

Figure 14 : Hypothèse des mécanismes responsables de l'invasion tumorale de l'ostéosarcome.....109

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS :

- AP-1 : Activateur de protéines 1
APMA : Acide amino phenyl mercurique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
COG : North American Children's Oncology Group
COSS : German-Austrian-Swiss Cooperative Osteosarcoma Study Group
COX-2 : Cyclooxygénase 2
ECE : Enzyme de Conversion de l'Endothéline
EOI : European Osteosarcom Intergroup
ET-1 : Endothéline-1
ET_A: Récepteur A de l'endothéline
ET_B: Récepteur B de l'endothéline
ETS : Erythroblastosis Twenty Six
Fas L : Ligand de type Fas
FGF : Facteur de Croissance des Fibroblastes
I κ B α : Inhibiteur du Facteur Nucléaire Kappa B alpha
IKK : I κ B α /I κ B α Kinase
IL-1 β : Interleukine-1 Bêta
MAPK : Mitogen Activated Kinase
MEC : Matrice Extracellulaire
MMP : Métalloprotéase Matricielle
MT-MMP : Métalloprotéase Matricielle de Type Membranaire
NF- κ B : Facteur Nucléaire Kappa B
NIH : Institut national de la santé
NIK : Facteur nucléaire inducteur de kinases
OMS : Organisation mondiale de la santé
OPN: Ostéopontine
OS: Ostéosarcome
PARP-1 : Poly (ADP-ribose) Polymérase 1
PBS : Tampon saline phosphate

PDGF : Facteur de croissance des plaquettes dérivées
PDTC : Acide Pyrrolidine carbodithioïque
PMA: Phorbol Myristate Acétate
PTHrP : Peptide hormone-relié à la parathyroïde
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Section of the National Cancer Institute
SSG : Groupe de Sarcome Scandinave
TCG : Tumeur à cellules géantes
TGF : Facteur de croissance tumorale
TIMP : Inhibiteur Tissulaire endogène des métalloprotéases matricielles
TNF- α : Tumeur Necrosis Factor alpha
uPA: Activateur plasminogène de type urokinase
VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire

REMERCIEMENTS :

Au Dr Florina Moldovan pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Pour son enthousiasme contagieux, sa présence constante, ses idées emballantes. Merci pour sa confiance et son support. Merci d'avoir créé un environnement de travail plaisant et stimulant. Merci pour son dévouement et surtout, merci d'avoir permis la réalisation de ce projet.

Au Dr Alain Moreau pour avoir accepté la co-direction de ce travail. Merci pour le support tout autant technique, que scientifique ou morale. Merci d'avoir contribué à la cohésion d'une unité de recherche dynamique et motivante.

À Marjolaine Roy-Beaudry, étudiante au M Sc. pour m'avoir initiée aux techniques de recherche en laboratoire et pour son aide à mon intégration dans une nouvelle équipe.

À Mélanie Guévremont, assistante de recherche, pour ses explications aux nombreux problèmes rencontrés, pour sa présence constante et pour son soutien moral.

À Bouziane Azzedine, étudiant au doctorat, pour son temps, ses réponses et surtout sa patience exceptionnelle.

Au groupe MENTOR pour son soutien financier et particulièrement à Nathalie Jourdain pour son professionnalisme.

À tous les membres du laboratoire, incluant Fazool Shipkolye qui m'a initié à la recherche.

À mes amis et à ma famille pour leur présence et leur support. Et finalement, à Jean-Daniel, pour être présent, tous les jours, pour le meilleur et pour le pire.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

L'ostéosarcome est une tumeur extrêmement maligne et invasive, et représente un problème important dans la pédiatrie oncologique. Bien qu'au cours des deux dernières décennies des progrès thérapeutiques significatifs aient été réalisés, le traitement pour ce type de tumeur n'est pas encore satisfaisant. Le taux de survie pour des patients présentant la maladie au stade débutant (tumeur localisée) est à plus de 60% (Bacci et al, 2005), tandis que pour ceux qui ont des métastases lors du diagnostic initial, le taux de survie est d'environ 25% (Gorlick et al, 2003).

L'essentiel de la menace des ostéosarcomes provient de leur potentiel invasif élevé. En effet, les cellules des tissus tumoraux envahissent les tissus périphériques en passant par le lit vasculaire (métastases hématogènes) pour aller d'abord jusqu'aux poumons, puis dans les os. C'est ce phénomène qui rend les sarcomes ostéogéniques souvent fatals avec une prépondérance marquée pour les métastases pulmonaires. L'équipe de Aung a montré que plus de 95% des patients qui étaient décédés par cause de métastases étaient atteints aux poumons (Aung et al, 2003), alors que 15% à 30% des métastases s'étaient propagées jusqu'aux os du squelette.

La présence de métastases à des sites distants représente le dernier stade de la maladie et est généralement associée avec un mauvais pronostic. Avant 1970, les patients étaient traités par une amputation du membre atteint. Plus de la moitié des patients traités en chirurgie développaient des métastases dans les 6 mois suivants le diagnostic de la tumeur et 80% des patients décédaient, morts causées par les métastases pulmonaires qui apparaissaient dans les 2 années suivants la chirurgie (Wittig et al, 2002, Aung et al, 2003, Marina et al, 2004). Aujourd'hui, le taux de survie à long terme est passé à plus de 60%. Cependant, l'état de nos connaissances actuelles a mené à un plafonnement dans notre capacité à améliorer ce taux. C'est pourquoi une nouvelle orientation des recherches s'avère nécessaire afin de découvrir de nouvelles molécules susceptibles d'améliorer les traitements disponibles.

Dans la dernière décennie les métalloprotéases matricielles (MMP) ont été reconnues comme des facteurs ayant un rôle important et complexe dans plusieurs étapes de la progression cancéreuse

telles que la croissance tumorale, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses, la dissémination métastatique et l'angiogenèse (McCawley et al, 2001 et Baker et al, 2002). Ainsi les MMP sont devenues une cible potentielle dans le traitement anticancéreux et des inhibiteurs synthétiques des MMP se montrent très efficaces dans des modèles de cancer chez l'animal (Coussens et al, 2002). D'après la littérature récente, il devient évident que le blocage des récepteurs de l'endothéline-1 (ET-1) constitue une autre voie d'avenir pour le traitement de certains cancers (Nelson et al, 2003 et Wu-Wonget al, 2002). L'application de cette stratégie thérapeutique pointe vers les tissus osseux, tel que montré dans un travail publié dans PNAS (Yin et al, 2003). Des données récentes, incluant les travaux réalisés au laboratoire du Dr Moldovan (Roy-Beaurdy et al, 2003 et Manacu et al, 2005) montrent l'existence d'une interaction entre l'endothéline-1 (ET-1) et les MMP (Fernandez-Patron et al, 1999, Fernandez-Patron et al, 2001, Rosano et al, 2001 et Bagnato et al, 1999). Cette interaction semble se produire à deux niveaux distincts: d'une part, l'activité enzymatique des métalloprotéases clive le précurseur immédiat de l'ET-1, la Big ET-1, et génère ainsi une nouvelle forme de peptide biologiquement actif constitué de 32 acides aminés: l'ET-1 (1-32) (Fernandez-Patron et al, 1999 et Fernandez-Patron et al, 2001); d'autre part, l'ET-1 est capable d'induire les MMP en agissant au niveau de la synthèse protéique et de l'activité biologique (Rosano et al, 2001, Bagnato et al, 1999, Roy-Beaurdy et al, 2003 et Manacu et al, 2005).

Cependant, les mécanismes par lesquelles ces interactions moléculaires s'effectuent et les preuves pré-cliniques de leur efficacité ont encore besoin d'être élucidées. De plus, la double inhibition du système endothéline d'une part et des métalloprotéases d'autre part n'a jamais été investiguée en tant que stratégie thérapeutique pour le cancer ou pour les tumeurs osseuses.

CHAPITRE 2. RECENSION DE LA
LITTÉRATURE

2.1 L'ENDOTHÉLINE-1 DANS L'OSTÉOSARCOME

Il existe peu de travaux explorant le rôle du système endothéline dans l'ostéosarcome. Des études se sont penchées sur l'expression des récepteurs de l'endothéline-1 (ET_A et ET_B) au niveau d'une lignée cellulaires d'ostéosarcome de rats. L'équipe de Nambi (Nambi et al, 1995) a démontré que les récepteurs ET_A et ET_B étaient exprimés dans ces cellules et ils ont constaté que ces récepteurs étaient exprimés dans un ratio 3 :1. Le récepteur ET_A semble donc être davantage exprimé au niveau des tumeurs osseuses et par conséquent, serait le récepteur par lequel transige les effets de l'ET-1 à ce niveau. En fait, il est clair que le récepteur ET_A est surexprimé au niveau des tissus malins et est en corrélation avec la présence de métastases et du score Gleason (Beard et al, 1994) et que le récepteur ET_B n'est que peu exprimé au niveau de ces tissus (Nelson et al, 1996).

L'induction de facteurs induits par les récepteurs de l'endothéline au niveau de l'ostéosarcome a aussi été investiguée. L'équipe de Nambi a démontré que le récepteur ET_A était le médiateur d'une induction de l'ostéocalcine. Des résultats similaires ont été illustrés par le laboratoire de Shioide, soit que l'endothéline-1 induit l'expression de l'ostéocalcine, mais également de l'ostéopontine (Shioide et al, 1993). Ces deux protéines jouent un rôle dans la régulation osseuse. L'ostéocalcine est la protéine non-collagèneuse principale de l'os et régule la formation de la matrice osseuse (Pullig et al, 2000) alors que l'ostéopontine est un membre de la matrice extracellulaire qui est notamment produite par l'os et qui joue un rôle au niveau des métastases tumorales (Standal et al, 2004). Comme l'endothéline est responsable de la modulation de 2 gènes produits par les cellules ostéoblastiques, cela suggère que l'endothéline est une des cytokines qui module les fonctions ostéoblastiques. Ainsi, comme l'ostéosarcome est caractérisé par la présence de cellules ostéoblastiques (Fuschs et al, 2002), il devient pertinent de suggérer un rôle pour l'endothéline dans les tumeurs osseuses.

Dans un même ordre d'idées, l'endothéline pourrait également jouer un rôle dans l'invasion et la prolifération des cellules de l'ostéosarcome. En effet, des études ont démontré que la stimulation

de cellules de sarcome d'Ewing et de neuroblastome par l'endothéline induit leur prolifération (Berry et al, 2002). Par contre, à ce jour, il n'y a aucune étude qui fait état de l'induction par l'endothéline de l'invasion des cellules d'ostéosarcome. De par ses divers rôles, l'endothéline est un peptide qui semble impliqué à plusieurs niveaux dans l'ostéosarcome humain. Ainsi, des recherches plus approfondies sur ses mécanismes d'actions pourraient mener au développement de nouvelles stratégies.

2.1.1. L'ENDOTHÉLINE-1

2.1.1.1. Ce qu'on en sait

L'ET-1 est un puissant peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés. Elle est principalement produite par les cellules endothéliales, mais aussi par les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, les myocytes cardiaque, les neurones, etc (Pinet, 2004). La biosynthèse et le relargage de l'endothéline-1 semblent être régulés au niveau transcriptionnel puisque la sécrétion de l'ET-1 par les cellules endothéliales est constitutive (Sugii et al, 2005). Elle est d'abord produite sous la forme d'une pré-pro-endothéline-1 de 212 acides aminés puis elle est clivée par des endopeptidases pour former la pro-endothéline-1. Elle est ensuite coupée par la furine convertase pour former la Big ET-1 de 38 acides aminés (Blais et al, 2002). La Big ET-1 est finalement clivée par l'ECE (enzyme de conversion de l'endothéline) pour former l'ET-1 active de 21 acides aminés (D'orleans-Juste et al, 2003). L'ET-1 de 21 acides aminés démontre une activité vasoconstrictrice d'environ 140 fois supérieure à celle de la Big ET-1 alors que la pro-ET-1 ne démontre aucune activité (Rubanyi et al, 1994). Il a récemment été découvert que d'autres enzymes peuvent venir cliver la Big ET-1 pour générer un autre type de forme active d'ET-1 ; la chymase qui va générer l'ET-1 (1-31) et les MMP-2 et 9 qui vont former l'ET-1 (1-32) (Fernandez-Patron et al, 1999 et D'orleans-Juste et al, 2003) (Figure 1).

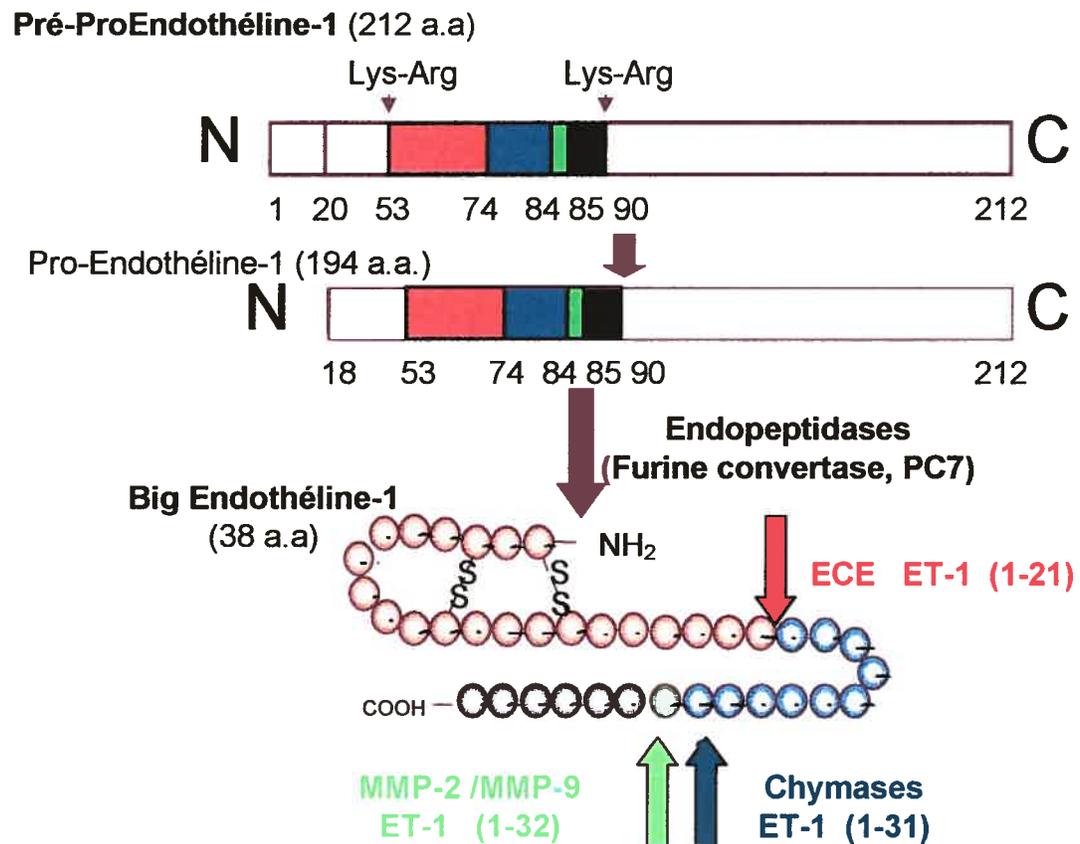


Figure 1 : La synthèse de l'endothéline-1

L'ET-1 exerce ses effets physiologiques via deux récepteurs qui lui sont spécifiques, ET_A et ET_B , qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires hydrophobes couplés à des protéines G (Grant et al, 2003). Les deux récepteurs n'ont que 59% de similitude entre eux et malgré qu'ils activent les mêmes protéines G, ils vont provoquer des réponses cellulaires différentes (Pinet, 2004). La liaison des ligands aux récepteurs induit diverses voies de signalisation qui s'entrecroisent et résultent en l'activation de la phospholipase C et la voie des MAP kinase, en une augmentation du calcium intracellulaire et en l'induction de divers gènes (Nelson et al, 2003 et Masaki et al, 1999).

2.1.1.2. L'ET-1 et l'os

L'ET-1 a des effets divers et multiples sur différentes cellules de l'organisme. D'ailleurs, sa présence est nécessaire à la survie. En effet, les souris déficientes pour le gène de l'ET-1 ou de l'ET_A meurent très rapidement après leur naissance à cause de problèmes respiratoires et d'anormalités au niveau cardiaque (Kurihara et al, 1994 et Clouthier et al, 2000). L'ET-1 a aussi des effets au niveau des cellules osseuses. Des souris déficientes pour ce gène ont démontré une hypoplasie des os faciaux (Guise et al, 2003). L'ET-1 a d'ailleurs été détectée dans les ostéocytes, les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules endothéliales vasculaires (Sasaki et al, 1993).

Un rôle pour l'ET-1 dans la pathogenèse des métastases ostéoblastiques a été proposé (Guise et al, 2003). L'effet paracrine de l'ET-1 produit par les tumeurs sur les cellules osseuses produit un environnement favorable pour la croissance des cellules tumorales dans les os (Guise et al, 2003). De plus en plus d'évidences indiquent que les métastases osseuses ostéoblastiques sont attribuables aux facteurs produits par les tumeurs et qui viendraient stimuler les ostéoblastes. L'ET-1 serait un de ces facteurs et son action résultante se produirait via le récepteur ET_A (Guise et al, 2003). Une étude a d'ailleurs proposé un mécanisme pour expliquer la promotion des métastases osseuses ostéoblastiques : les cellules cancéreuses métastatiques situées dans le microenvironnement de l'os sécrètent l'ET-1, qui se lie au récepteur ET_A pour stimuler la prolifération des ostéoblastes et la formation osseuse. La stimulation de l'activité des ostéoblastes enrichit le microenvironnement de facteurs de croissance, qui à leur tour vont venir agir sur la tumeur et augmenter la sécrétion d'ET-1 (Yin et al, 2003).

2.1.1.3. Rôle d'ET-1 dans le cancer

L'intérêt de l'étude sur l'ET-1 au niveau de l'ostéosarcome est que des niveaux plasmatiques élevés d'ET-1 ont été retrouvés chez des patients avec diverses tumeurs solides (Nakamuta et al, 1993, Nelson et al, 1995 et Ferrari-Bravo et al, 2000) où les niveaux étaient plus élevés chez les

patients au stade métastatique. De nombreuses lignées cellulaires cancéreuses ont démontré une synthèse d'ET-1 *in vitro* (Kusuhara et al, 1990 et Ali et al, 2000). Ce phénomène a également été reflété *in vivo* où une augmentation de l'immunoréactivité pour l'ET-1 a été démontrée dans plusieurs types de cancer (Bagnato et al, 1999, Yamashita et al, 1991 et Suzuki et al, 1998). Ces résultats suggèrent donc que la modulation de l'endothéline-1 est impliquée dans plusieurs étapes de la tumorigenèse.

L'endothéline-1 stimule la croissance de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines *in vitro* incluant les cellules colorectales, ovariennes, de la prostate, du sarcome de Kaposi et des mélanomes (Yohn et al, 1994, Nelson et al, 1996, Bagnato et al, 1999, Ali et al, 2000, Bagnato et al, 2001). Ces études ont démontré que cet effet de l'ET-1 est médié par le récepteur ET_A dans les tumeurs épithéliales et par le récepteur ET_B dans les tumeurs non-épithéliales (Kikuchi et al, 1996).

L'ET-1 va également promouvoir la progression tumorale en protégeant les cellules de l'apoptose. En fait, l'ET-1 serait un facteur de survie contre l'apoptose médiée par le Fas-L (Peduto-Eberl et al, 2000).

Un autre des rôles de l'ET-1 dans la progression tumorale serait de promouvoir l'angiogenèse. Elle effectuerait ce rôle en stimulant la production de VEGF (Pedram et al, 1997 et Salani et al, 2000). L'ET-1 accentuerait également les effets de divers facteurs proangiogéniques *in vitro*, incluant le PDGF et le VEGF (Pedram et al, 1997 et Yang et al, 1999). L'Équipe de Bek a démontré que l'ET-1 stimule l'angiogenèse et que cette stimulation est inhibée lors de l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur ET_A, mais n'est pas inhibée par un inhibiteur du récepteur ET_B (Bek et al, 2000), ce qui suggère que l'effet pro-angiogénique de l'ET-1 s'effectuerait via le récepteur ET_A.

L'ET-1 influence également l'invasion tumorale et la métastase. En effet, l'ET-1 peut réguler l'expression de diverses MMP, en particulier la MMP-2 et la MMP-9 (Rosano et al, 2001). Ce

peptide peut aussi moduler la croissance des métastases osseuses, ceci ayant été démontré dans le cancer de la prostate (Chiao et al, 2000). Une autre équipe a illustré que des tumeurs transfectées pour surexprimer l'ET-1 démontraient par la suite une production de croissance osseuse significativement plus élevée que la normale (Nelson et al, 1999).

L'endothéline joue aussi un rôle d'induction de la prolifération cellulaire au niveau de diverses tumeurs tels le mélanome (Bagnato et al, 2004), le sarcome de Kaposi (Rosano et al, 2003), le carcinome ovarien (Rosano et al, 2003) et autres.

Dans le tissu sain, le récepteur ET_B est prédominant alors que le récepteur ET_A va prévaloir au niveau de la tumeur primaire ainsi qu'au niveau des métastases (Grant et al, 2003). En effet, il y aurait une régulation à la baisse du récepteur ET_B dans les tissus malins, cette baisse correspondant à une diminution du récepteur au niveau transcriptionnel (Pao et al, 2001). La perte de l'expression du récepteur ET_B a d'ailleurs été proposée en tant qu'indicateur pronostique puisqu'elle était associée avec l'apparition de métastases dans le sarcome d'Ewing et dans le neuroblastome et était aussi associée avec une mauvaise issue du traitement de la tumeur (Berry et al, 2002).

L'expression de l'ET-1 est associée avec les régions invasives des biopsies tumorales de patients (Grimshaw et al, 2004) et elle est davantage exprimée dans les tumeurs de haut grade histologiques et présentant une invasion lymphovasculaire (Wulfing et al, 2004). Les mécanismes par lesquels l'ET-1 induit un phénotype invasif ne sont pas complètement connus à ce jour, mais impliquent la stimulation des cellules tumorales et des macrophages associés à la tumeur, ainsi que la modulation des MMP et des cytokines (Grimshaw, 2005).

2.1.1.4. Les possibilités thérapeutiques

La plupart des stratégies thérapeutiques anti-endothéline ont davantage porté sur des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 et sur des inhibiteurs de sa synthèse (Woods et al, 2003).

Dans une lignée cellulaire de carcinome ovarien, un antagoniste spécifique du récepteur ET_A, le BQ123, a bloqué la migration et l'invasion préalablement médiées par l'ajout d'ET-1 exogène dans ces cellules (Rosano et al, 2001). Ces résultats indiquent qu'une utilisation d'un antagoniste du récepteur ET_A serait préférentielle à un antagoniste du récepteur ET_B dans l'optique d'une stratégie thérapeutique visant à enrayer la progression tumorale. Par contre, au niveau d'un sarcome de Kaposi, une étude a démontré que les résultats optimaux dans la suppression de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* étaient observés lors de l'utilisation d'un antagoniste spécifique des deux récepteurs de l'ET-1 (Rosano et al, 2003). Par ailleurs, des résultats récents d'essais cliniques utilisant l'atrasentan (un antagoniste du récepteur ET_A, aussi appelé ABT-627) dans le cancer de la prostate et dans des adénocarcinomes ont montré des résultats encourageants, (Carducci et al, 2002) ce qui indique que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de l'ET-1 dans la thérapie des cancers malins mérite d'être davantage investiguée.

Davantage d'investigations à ce niveau seraient par ailleurs nécessaires pour déterminer quel antagoniste possède une efficacité optimale au niveau de l'ostéosarcome, mais il semblerait que comme la majorité des effets promouvant la progression tumorale se produisent via le récepteur ET_A, c'est dans cette voie que les études se sont davantage orientées.

2.1.1.5. Les interactions entre ET-1 et MMP

Il a été démontré que l'ET-1 peut réguler l'expression de plusieurs MMP, en particulier les MMP-2 et 9, et peut également diminuer l'expression des TIMP, surtout les TIMP-1 et 2 (Rosano et al, 2001). Il a par ailleurs été établi que lorsque des cellules endothéliales étaient traitées avec différentes concentrations d'ET-1, la sécrétion de MMP-2 était augmentée de manière dose-dépendante. Le niveau de MMP-9 a également été augmenté, mais à des quantités moindres (Salani et al, 2000). Dans deux lignées cellulaires de carcinome ovarien, un ajout d'ET-1 exogène a augmenté la sécrétion et l'activation des MMP-2, 9, 3, 7 et 13. Cela a aussi inhibé la sécrétion de TIMP, soit la TIMP-1 et 2, ce qui amène une forte augmentation de la balance net entre MMP et TIMP (Rosano et al, 2001). L'équipe de Rosano a également vérifié

l'effet de l'activation du récepteur ET_A. Ils ont trouvé que l'activation de ce récepteur amène une régulation positive de l'activation et de la sécrétion des MMP ainsi que la promotion de l'invasion cellulaire (Rosano et al, 2003). Par ailleurs, il a été observé que l'induction de l'activité des MMP par l'ET-1 se transmet via les récepteurs ET_A et ET_B. En effet, une inhibition de chacun de ces deux récepteurs a bloqué l'activité des MMP (Ihara et al, 1992 et Ishikawa et al, 1994).

Cette induction des MMP par ET-1 serait en partie attribuable à l'induction des produits des proto-oncogènes de c-fos et de c-jun, qui vont former des hétérodimères et se lier au site AP-1 (Tsuruda et al, 2004).

Une surexpression conjointe des MMP et de l'ET-1 est retrouvée lors du renouvellement ou de réparation tissulaire, lors de dommages aux tissus, pendant le phénomène d'inflammation et lors de phénomènes cancéreux (Fernandez-Patron et al, 1999). Le clivage de la Big ET-1 par les MMP-2 et MMP-9 (les deux membres des gélatinases, une sous-famille des MMP) engendrerait donc, lors de conditions pathologiques tel le cancer, un cercle vicieux : les gélatinases clivent la Big ET-1 pour générer une endothéline-1 active, qui à son tour induit l'expression des MMP.

2.1.1.6. L'ET-1 et le NF-κB

Diverses études ont attribué un rôle au NF-κB (facteur nucléaire kappa B) dans la modulation de la production d'ET-1 (Woods et al, 2003 et Dschietzig et al, 2003). En fait, le site de liaison κB pour le NF-κB activé est localisé dans la région promotrice du gène de l'ET-1 (Quehenberger et al, 2000). Ainsi, l'induction de l'expression de l'ET-1 impliquerait une activation du NF-κB. Notre étude s'est davantage penchée sur le rôle d'induction du NF-κB par l'ET-1. Ainsi, l'action de l'ET-1 qui aboutit à une augmentation importante des MMP serait entre autres reliée à l'activation du NF-κB. Ce dernier est activé par de nombreux stimuli et pourrait constituer un point de convergence entre les différentes voies de signalisation qui aboutissent à la progression tumorale.

2.1.1.7. L'ET-1 et le PTHrP

Le PTHrP (la protéine hormone reliée à la parathyroïde) est un hormone largement exprimé autant au niveau des tissus fœtaux qu'adultes (Chen et al, 2006). C'est un facteur ostéolytique reconnu (Guise et al, 2005) et il joue un rôle majeur au niveau des os, plus précisément au niveau des ostéoblastes où il va se lier au récepteur PTH/PTHrP ce qui va activer diverses voies de signalisation qui vont mener à la différenciation ostéoblastique (Yang et al, 2005). Récemment, à cause d'une homologie structurale entre le PTHrP et l'endothéline (1-16), une interaction possible entre le PTHrP et le récepteur ET_A de l'endothéline a été étudiée. L'équipe de Schlüter (Schlüter et al, 2001) a démontré que la liaison du PTHrP au récepteur ET_A a engendré les mêmes effets que ceux engendrés par la liaison de l'ET-1 à ce même récepteur. L'utilisation d'un inhibiteur de ce récepteur de l'ET-1 a aussi inhibé l'effet médié par le PTHrP. Comme le PTHrP, en tant que facteur cellulaire tumorale, cause un dysfonctionnement entre la destruction et la formation osseuse (Kozlow et al, 2005), situation retrouvée lors de la formation de métastases osseuses, ces découvertes nous permettent d'envisager un rôle possible du PTHrP dans l'activation du récepteur ET_A lors de la propagation des métastases au niveau de l'ostéosarcome.

2.2. LES RÔLES ATTRIBUÉS AUX MMP DANS LA PROGRESSION CANCÉREUSE EN 2005

2.2.1. Caractéristiques

Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont une famille composée de plus de 25 endopeptidases qui peuvent être classées en 6 groupes selon leurs différences structurales : les matrilysines, les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases, les métalloprotéinases de type membranaire (MT-MMP) et autres (Chantrain et al, 2002). Dans l'ensemble, elles sont capables de dégrader pratiquement toutes les composantes de la MEC (matrice extracellulaire). Elles participent également à l'activation des protéines de la MEC ce qui amène une modulation des interactions cellules-cellules et cellules-MEC. Ainsi, ces actions des MMP vont influencer la différenciation, la migration, la prolifération et la survie cellulaire (Baker et al, 2002). Les MMP sont composées de 3 domaines : 1. le pré-domaine qui sert à l'acheminement des MMP jusqu'à la surface cellulaire et qui est rapidement éliminé après leur sécrétion; 2. le pro-domaine qui maintient l'activité enzymatique sous une forme latente et qui contient un atome de zinc qui peut interagir avec : 3. le domaine catalytique. C'est lorsqu'il y a clivage protéolytique du pro-domaine que l'atome de zinc est libéré entraînant ainsi l'activation du site catalytique qui peut maintenant se lier à son substrat (Chantrain et al, 2002). Donc, les MMP sont d'abord exprimées en tant que zymogène inactif qui requiert différents processus d'activation afin d'être transformé en enzyme active (Ramos-Desimone et al, 1999). Les MMP possèdent également un 4^e domaine représenté par une chaîne polypeptidique qui sert à reconnaître le substrat des MMP.

2.2.1.1. Les gélatinases

Les gélatinases, un des sous-groupes des MMP, incluent 2 membres, soit la MMP-2, aussi appelée gélatinase-A avec un poids moléculaire de 72kDa, et la MMP-9 qu'on appelle aussi la gélatinase-B avec un poids moléculaire de 92kDa (Johansson et al, 2000). La MMP-2 est

exprimée par différents types cellulaires tels les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les chondrocytes, les ostéoblastes, les monocytes et par plusieurs types de cellules qui ont subies une transformation (Birkedal-Hansen et al, 1993). Elle est physiologiquement exprimée par les cellules du stroma de la plupart des tissus (Chantrain et al, 2002). La MMP-9, quant à elle, est produite par les macrophages alvéolaires normaux, les leukocytes polymorphonucléaires, les ostéoclastes, les kératinocytes, les trophoblastes invasifs et aussi par plusieurs types de cellules qui ont été transformées. Son expression est faible ou nulle dans les tissus normaux, mais elle peut être induite lors de remaniement tissulaire comme dans le cas de l'invasion tumorale (Chantrain et al, 2002).

Les gélatinases vont principalement dégrader le collagène de type IV, V, VII, X, XI et XIV ainsi que la gélatine, l'élastine, les protéoglycanes, les protéines de myéline, la fibronectine, la fibrilline-1 et les précurseurs du TNF- α (facteur de nécrose tumorale alpha) et de l'IL-1 β (interleukine-1 bêta) (Birkedal-Hansen et al, 1993, Kähäri et al, 1997, Ashworth et al, 1999, Chandler et al, 1997 et Ito et al, 1996). De plus, la MMP-2 peut également dégrader le collagène de type I natif (Aimes et al, 1995) et la MMP-9 clive la portion N-terminale du télopeptide du collagène de type I dans un environnement acide (Okada et al, 1995). Ces actions des gélatinases suggèrent qu'elles ont un rôle à jouer dans le remodelage du collagène de la MEC.

Les souris K/O pour la MMP-2 sont phénotypiquement normales (Handsley et al, 2005). Par contre, les souris K/O pour la MMP-9 ont démontré un délai lors de la croissance et le développement des os longs. Il a aussi été observé que les souris montraient un délai lors de l'invasion vasculaire des plaques de croissance du squelette (Vu et al, 1998). Ces résultats suggèrent un rôle pour la MMP-9 dans la vascularisation, qui pourrait également être impliquée dans la pathogénèse de l'ostéosarcome.

2.2.1.2. Les gélatinases dans l'ostéosarcome

Les ostéosarcomes canins sont très semblables à ceux retrouvés chez l'Homme et peuvent être utilisés comme modèle pour mieux comprendre cette maladie et en améliorer le traitement. C'est cette prémisse qui a orienté les travaux de l'équipe de Loukopoulos (Loukopoulos et al, 2004). Ils ont constaté qu'au niveau d'un ostéosarcome canin, la MMP-2 et la MMP-9 sont capables de dégrader de façon critique, en terme d'importance, les membranes basales et les composantes de la MEC lors de différentes étapes de la progression tumorale comme l'invasion tumorale et la métastase. La MMP-2 et la MMP-9 ont été détectées dans l'ostéosarcome canin à des niveaux plus élevés que dans le tissu stromal non-affecté. Par ailleurs, il a été démontré que les MMP sont produites par des lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains ainsi que par des cellules humaines ostéoblastiques normales en culture (Loukopoulos et al, 2004).

Plusieurs études sont présentement en cours afin d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques prédictifs de l'issue d'un ostéosarcome et également afin de déterminer quels patients auront besoin de traitements plus agressifs. La gélatinase B a fait l'objet d'une étude de la part de l'équipe de Foukas qui a observé que la MMP-9 pouvait servir de facteur pronostique pour prédire l'apparition de métastases ainsi que pour prédire le taux de survie des patients atteints d'un ostéosarcome (Foukas et al, 2002). Ils vont jusqu'à suggérer que la surexpression de la MMP-9 serait un des facteurs essentiels relié au développement des métastases. Ils estiment également que l'expression de la MMP-9 dans les cellules tumorales qui ont survécu au traitement de chimiothérapie contribue à augmenter les chances de rechute à cause de la capacité de ces tumeurs à induire une néovascularisation. Ces résultats sont en corrélation avec ceux d'une autre étude qui a regardé le niveau d'expression des MMP-2 et MMP-9 dans des ostéosarcomes de haut grade. Il a été constaté que la MMP-9, et non la MMP-2, serait un facteur pronostique possible quant à l'identification des patients allant développer des métastases (Ferrari et al, 2004). Une autre équipe a trouvé que malgré une très forte expression de la MMP-2, celle-ci n'aurait aucun effet pronostique dans le sarcome synovial (Saito et al, 2002). Par contre, il a aussi été démontré qu'une expression élevée de la MMP-2 accompagnée d'une

disparition de l'expression de la TIMP-2 étaient associées avec un mauvais pronostic dans les sarcomes des tissus mous (Benassi et al, 2001). Il a également été démontré que l'ARNm de la MMP-2 et de la TIMP-2, entre autre, étaient surexprimés dans les chondrosarcomes (malins) par rapport aux chondromes (bénins) (Soderstorm et al, 2001).

Il convient donc de mieux investiguer le rôle et le patron d'expression des gélatinases par rapport aux différents grades de tumeurs osseuses.

2.2.2. La régulation des MMP

La plupart des MMP ne sont pas constitutivement exprimées par les cellules *in vivo*; leur expression est induite par des signaux exogènes incluant les cytokines, les facteurs de croissance ou encore une matrice endommagée qui va produire des contacts cellules-cellules altérés, ce qui va amener une induction de l'activation des MMP (Kähäri et al, 1997).

La régulation des MMP se produit à plusieurs niveaux : au niveau transcriptionnel, par l'activation du zymogène inactif et par une famille d'inhibiteurs endogènes spécifiques des MMP : les TIMP. Il existe également des inhibiteurs de protéases non-spécifiques tel l' α 2-macroglobuline (Johansson et al, 2000).

2.2.2.1. Le niveau transcriptionnel

L'expression de la plupart des MMP est induite au niveau transcriptionnel. Le promoteur de ces MMP inductibles contient un élément conservé en cis, l'élément AP-1 (Westermarck et al, 1999). Des stimuli extracellulaires vont venir activer des facteurs du complexe de transcription AP-1 qui va venir se lier au site de liaison AP-1 au niveau du promoteur ce qui va activer la transcription des gènes de MMP. L'endothéline-1 serait un des stimuli capable d'induire la transcription des gènes des MMP. La région promotrice AP-1 possède également un ou plusieurs éléments PEA3 qui lient les facteurs de transcriptions de la famille ETS et travaillent en

coopération avec AP-1 pour activer les gènes de MMP (Westermarck et al, 1997). Il a été observé que le facteur de transcription NF- κ B joue également un rôle crucial dans l'expression de la MMP-9 au niveau des fibroblastes et des cellules des muscles lisses vasculaires (Bond et al, 1998). Le promoteur du gène de la MMP-2 répond plus ou moins aux stimulations en culture cellulaire et il ne possède pas l'élément AP-1, le PEA3, ni la boîte TATA (Westermarck et al, 1999).

2.2.2.2. L'activation du zymogène

Comme la plupart des MMP sont sécrétées en tant que zymogène inactif, aussi appelés précurseurs latents, elles doivent être protéolytiquement activées dans l'espace extracellulaire. L'activation des MMP résulte d'une cascade protéolytique impliquant la stromélysine-1 (MMP-3), mais cette activation peut aussi s'effectuer par diverses molécules telles les organomercures (comme l'APMA), la plasmine, les autres MMP ou par une auto-activation. Donc, différents mécanismes peuvent être à la source du passage des MMP de la forme latente à la forme active. Le mécanisme par lequel les MMP maintiennent leur état de latence se nomme : la «switch» cystéine. Ce mécanisme a ainsi été nommé à cause du résidu cystéine qui est non païré dans une séquence hautement conservée du pro-domaine des MMP et qui forme un pont avec le résidu zinc ce qui empêche l'activité enzymatique (Brinckerhoff et al, 2002).

Il existe des exceptions à ces mécanismes d'activation. Par exemple, l'activation des MT-MMP et de la pro-MMP-2. Les MT-MMP sont activées au niveau intracellulaire avant leur transport à la surface de la cellule. La pro-MMP-2, quant à elle, est activée selon différents mécanismes dont une activation autocatalytique, via la formation d'un complexe trimoléculaire incluant la TIMP-2 et la MT1-MMP. Ainsi, la TIMP-2 va aller se lier à la MT1-MMP ce qui va permettre à ce complexe de fixer la pro-MMP-2. Une 2^e molécule de MT1-MMP libre va ensuite venir cliver la pro-MMP-2 de ce complexe et finalement, la MMP-2 va effectuer un auto-clivage pour terminer son activation enzymatique. À ce niveau, la TIMP-2 joue un rôle d'activation de la MMP-2, ainsi, son expression sera associée avec une invasion cellulaire augmentée (Söderström

et al, 2001). Par contre, une surexpression trop élevée de la TIMP-2 va faire en sorte que la totalité des MT1-MMP se retrouveront liées aux molécules de TIMP-2 et ainsi, il sera impossible pour le complexe de recruter la 2^e MT1-MMP nécessaire à l'activation de la pro-MMP-2, donc une diminution de l'activation de la MMP-2 sera observée (Ntayi et al, 2004).

Une autre des options d'activation de la pro-MMP-2 s'effectue via un activateur de plasminogène urokinase associé à la surface cellulaire ou par la MT2-MMP indépendamment de la TIMP-2 (Morrison et al, 2001).

2.2.2.3. L'inhibition des MMP

2.2.2.3.1. Les TIMP

Quatre TIMP ont été identifiées à ce jour (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4) et sont toutes capables d'inhiber l'activité des MMP avec différents degrés de spécificité. Les TIMP forment un complexe équimolaire avec les formes actives des MMP. Le domaine amino-terminal des TIMP se lie au domaine catalytique des MMP bloquant ainsi l'accès à l'atome de zinc. Ces complexes MMP/TIMP sont stables et irréversibles. La TIMP-2 et la TIMP-1 peuvent venir se lier préférentiellement au domaine hémapexine de la forme latente de la MMP-2 et de la MMP-9 respectivement (Lambert et al, 2004).

L'activité des MMP dans l'espace extracellulaire dépend de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation. La régulation des MMP par les TIMP est donc un facteur important contrôlant le catabolisme de la MEC et des modifications de cette régulation sont à l'origine de plusieurs états pathologiques, notamment du cancer (Chantrain et al, 2002). Plusieurs études ont été conduites avec les TIMP et il en ressort que leur surexpression réduit la capacité invasive et métastatique des cellules tumorales (Lambert et al, 2004). Ces études ont d'ailleurs démontré l'efficacité pré-clinique des TIMP lors de leur surexpression dans un contexte de prévention de la croissance et de la propagation tumorale, mais également pour la protection des tissus non-cancéreux contre

les métastases. Les TIMP, en théorie, offrent l'opportunité de donner une thérapie localisée contre les tumeurs (Baker et al, 2002). Malheureusement, l'utilisation des TIMP en clinique s'avère plutôt difficile à cause de leur temps de demi-vie très court (Curran et al, 2000).

Par contre, les TIMP jouent également un rôle controversé. Par exemple, lorsque la TIMP-2 participe à l'activation de la pro-MMP-2. Pour mieux illustrer ce double rôle des TIMP, observons une étude de l'équipe de Ferrari qui a démontré que l'expression de la TIMP-1 et de la TIMP-2 était minimale ou nulle dans les tumeurs d'ostéosarcome de haut grade, alors qu'au niveau plasmatique, le niveau d'expression de ces mêmes TIMP était plus élevé chez les patients atteints que chez les contrôles. Par contre, le niveau d'expression le plus élevé de la TIMP-1 a été observé chez les patients à qui des métastases ont été diagnostiquées (Ferrari et al, 2004). Ce résultat est en accord avec ceux d'une autre étude qui a corrélié le niveau d'expression de la TIMP-1 avec le stage tumoral avancé et le pire pronostic (Airoola et al, 1999). Ainsi, certains types de cancers agressifs vont surexprimer les TIMP qui vont préférentiellement être associées avec la progression tumorale plutôt qu'avec des tumeurs lentes à se développer (Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

2.2.2.3.2. L' α 2-macroglobuline

L' α 2-macroglobuline est principalement synthétisée par le foie et peut inhiber pratiquement toutes les endoprotéases incluant les MMP. L'inhibition se produit par la présentation par l' α 2-macroglobuline d'une région cible qui une fois protéolytiquement clivée, amène un changement de conformation qui emprisonne la protéase (Baker et al, 2002). L'action d'inhibition de l' α 2-macroglobuline n'est cependant pas spécifique aux MMP.

2.2.3. À quelles étapes de la propagation tumorale les MMP agissent-elles ?

Le concept disant que la dégradation protéolytique de barrière matricielle est critique pour l'invasion cellulaire tumorale et la métastase à des sites distants a été articulé il y a quelques

décennies par des pionniers tels Reich et Liotta (Ossowski et al, 1983 et Liotta et al, 1980). Un rôle important dans la progression cancéreuse fut rapidement attribué aux MMP à cause de leur capacité à dégrader la MEC favorisant ainsi l'invasion tumorale. En effet, un nombre élevé d'études ont démontré une corrélation positive entre l'expression des MMP et le potentiel invasif et métastatique des tumeurs malignes (Shapiro, 1998 et Kähäri et al, 1999). Une forme spécialisée de la matrice extracellulaire est la membrane basale qui est la première barrière contre l'invasion tumorale et qui est surtout composée de collagène de type IV, de fibronectine, de vitronectine, de laminine et de protéoglycanes. Plusieurs MMP, en particulier les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) ont une activité protéolytique dirigée contre ces protéines de la membrane basale. Il a d'ailleurs été démontré que les MMP présentes au niveau du front invasif sont souvent produites par les cellules stromales stimulées spécifiquement par les cellules cancéreuses (Egeblad et al, 2002).

Le rôle des MMP dans la progression tumorale est principalement attribuable à leur capacité de dégrader la MEC, mais les MMP sont aussi capable de relâcher des facteurs de croissance provenant de la MEC (Klein et al, 2003). De plus, il a été démontré que les MMP ont un effet sur les stades précoces de la progression tumorale par leur fonction cellulaire, notamment en augmentant la prolifération et la survie cellulaire (McCawley et al, 2001). En fait, les MMP jouent un rôle dans la plupart des étapes de la progression tumorale : la croissance des cellules cancéreuses, le processus de différenciation, l'apoptose, la migration et l'invasion, la régulation de l'angiogenèse et la surveillance immunitaire (Egeblad et al, 2002).

2.2.4. Les inhibiteurs synthétiques et les résultats des essais cliniques

Il a été constaté que l'élimination d'un seul des membres de la famille des MMP atténue la progression tumorale, mais n'est pas suffisant pour éliminer l'invasion tumorale et la métastase. Ainsi, il convient de jumeler différents inhibiteurs des MMP afin de percevoir des effets concrets sur la propagation tumorale. En effet, dans un modèle animal, des inhibiteurs des MMP ont

démontré une efficacité pour prévenir la croissance et la vascularisation de tumeurs pré-malignes (Bergers et al, 1999).

Dès que l'implication des MMP dans la propagation tumorale a été ciblée, des inhibiteurs synthétiques ont été fabriqués. Le Batimastat est devenu, en 1992, le premier inhibiteur synthétique des MMP à être testé sur des humains (Brown et al, 2001). Le Batimastat a rapidement été remplacé par le Marimastat qui peut se prendre oralement contrairement au Batimastat qui devait être administré de manière intrapéritonéale. Malheureusement, le traitement avec le Marimastat a résulté en des douleurs dans les jointures débutant dans les mains et allant jusqu'aux extrémités (Brinckerhoff et al, 2002).

En 1999-2000, deux études cliniques de phase III pour des inhibiteurs des MMP, soit une utilisant le BAY-12-9566 ont dû être arrêtées car les patients recevant le traitement avaient un plus faible taux de survie que ceux ne le recevant pas (Coussens et al, 2002). Il en a été de même avec le Prinomastat en 2000 où aucune efficacité clinique n'a été notée chez les patients avec un cancer de stade avancé (Klein et al, 2003).

Depuis l'échec de plusieurs essais cliniques de phase III qui tentaient de démontrer l'effet bénéfique des inhibiteurs des MMP, il est devenu nécessaire de faire un retour en arrière afin de déterminer le rôle individuel que joue chacun des membres de la famille des MMP, pour chaque type de cancer, au stade précis de chaque tumeur. Ces connaissances s'avèrent nécessaires pour envisager une deuxième génération d'inhibiteurs de MMP. Dans ce sens, certains auteurs suggèrent que la régulation transcriptionnelle des gènes des MMP serait cruciale dans la progression tumorale (Eglebad et al, 2002).

2.2.5. Les MMP et le NF- κ B

Le NF- κ B est une famille de facteur de transcription qui est impliquée dans la régulation génique de processus cellulaire comme l'inflammation, la réponse immunitaire, la prolifération

cellulaire et l'apoptose (Ghosh et al, 1998 et Baeuerle et al, 1994). Le NF- κ B forme divers homodimères et hétérodimères principalement entre les protéines p65 et p50. Dans la plupart des cellules, le NF- κ B est présent sous sa forme latente inactive où il est lié au I κ B dans le cytoplasme. Le mécanisme d'activation du NF- κ B implique l'activation du IKK, qui va venir phosphoryler l'I κ B α (DiDonato et al, 1997) ce qui va l'amener à être dégradé (Yaaron et al, 1997). Par conséquent, le NF- κ B va se trouver libéré du complexe qu'il formait initialement et il va rapidement être transloqué au noyau où il pourra activer l'expression génique (Baeuerle et al, 1997).

Le NF- κ B est un inducteur de gènes anti-apoptotiques et joue également un rôle de protection des cellules contre l'apoptose, ce qui contribue à la progression tumorale (Wang et al, 1999). Il régule aussi l'expression et l'activation des MMP (Philip et al, 2001 et Han et al, 2000). Une des possibilités du mécanisme responsable de cette induction est que les gènes des MMP sont régulés par le cross-talk entre l'AP-1 et le NF- κ B dans le noyau (Ahmad et al, 1998). L'implication du NF- κ B dans la régulation des gènes des MMP est supportée par la diminution de l'ARNm des MMP lors de l'utilisation d'un inhibiteur du NF- κ B, le PDTC (l'acide pyrrolidinecarbodithioïque) (Meyer et al, 1993). Des études ont démontré que les cellules cancéreuses expriment un niveau basal supérieur de la voie de signalisation du NF- κ B, faisant de cette molécule une cible possible lors de traitements anti-cancéreux (Andela et al, 2003).

Une protéine capable de venir moduler l'induction des MMP par le NF- κ B est l'ostéopontine (OPN). L'OPN est un membre des protéines de la matrice extracellulaire. L'OPN est produites par les ostéoclastes, les macrophages, les cellules T, les cellules hématopoïétiques, et les cellules du muscle vasculaire lisse (Weber et al, 2002). Il a été démontré que plusieurs cellules transformées et hautement métastatiques synthétisent des niveaux plus élevés d'OPN que les cellules non-tumorigéniques (Craig et al, 1990). Il a aussi été démontré que l'OPN est impliquée dans l'adhésion cellulaire, la migration, l'invasion de la MEC et la prolifération cellulaire par l'interaction de la protéine avec son récepteur α v β 3 (Panda et al, 1997). En effet, l'équipe de Liu

a rapporté que cette protéine accélère la prolifération de cellules d'ostéosarcome *in vitro*, accélérant ainsi la croissance tumorale *in vivo* (Liu et al, 2004). L'OPN joue aussi un rôle dans l'invasion et la métastase des cellules tumorales et ce rôle lui est attribué à cause de sa capacité à induire les gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Liu et al, 2004). En fait, l'OPN induit l'activation de la pro-MMP-2, via l'induction de la MT1-MMP, et via l'induction également de la voie de signalisation du NF- κ B par l'activation de l'I κ B α (Figure 2) (Philip et al, 2003). De plus, l'OPN induit le NIK qui régule la sécrétion de uPA et par conséquent, l'activation de la pro-MMP-9 dépendante de uPA (Rangaswami et al, 2004).

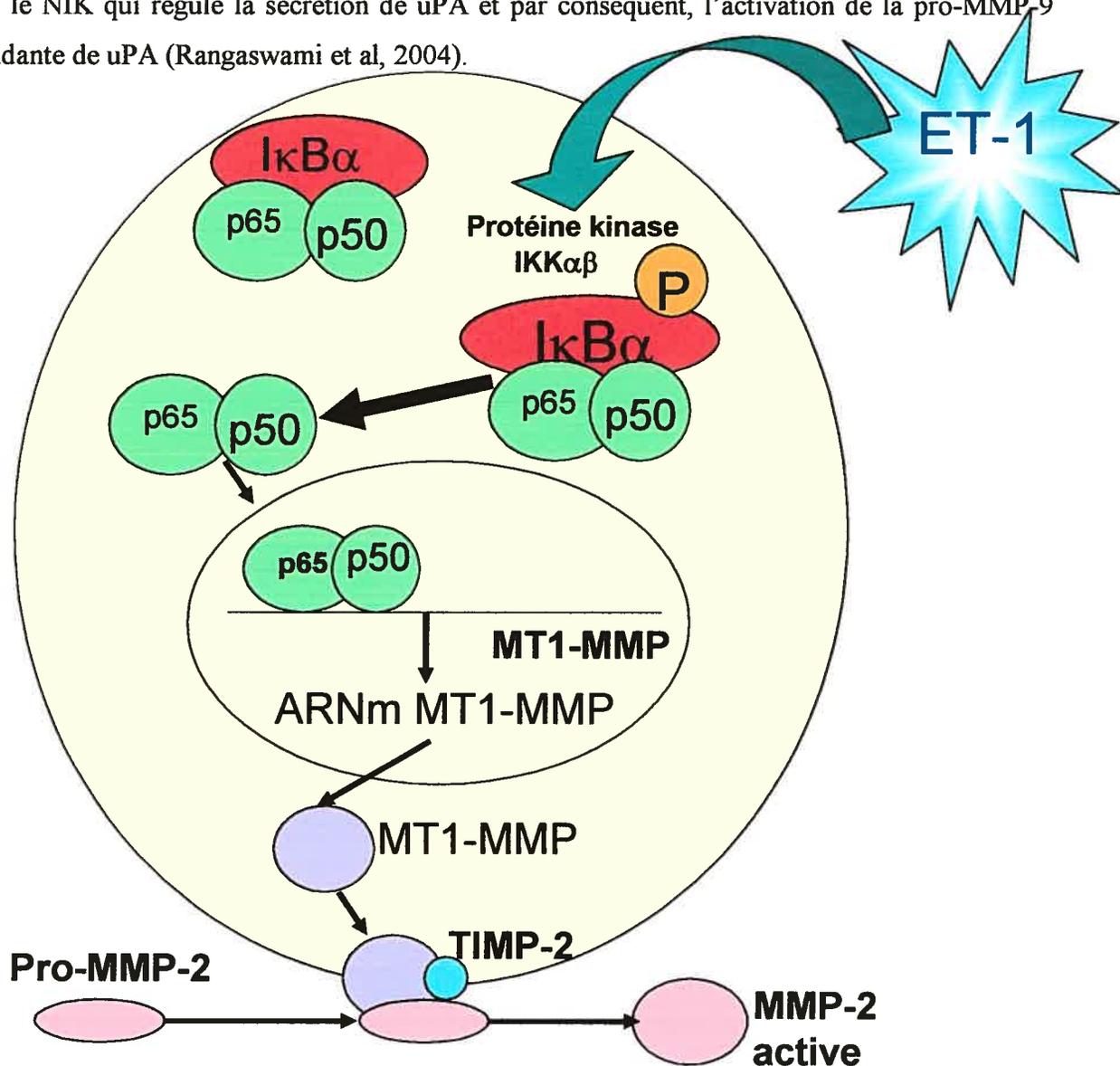


Figure 2 : L'activation de la pro-MMP-2 via le NF- κ B

2.3. L'OSTÉOSARCOME

L'ostéosarcome est la tumeur maligne de l'os la plus commune chez les enfants et les adolescents, (Marina et al, 2004) et le troisième cancer malin le plus commun dans ce groupe (Wittig et al, 2002). Environ 650-700 sarcomes osseux sont diagnostiqués chaque année chez les enfants âgés de moins de vingt ans tel que stipulé par le SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Section of the National Cancer Institute) (Herzog, 2005). L'ostéosarcome comprend 57% de ces cancers osseux suivi du sarcome d'Ewing, un autre type de cancer osseux, (25%) et du chondrosarcome, un cancer malin du cartilage (10%). L'ostéosarcome seul représente environ 3.5% de tous les cancers affectant les enfants dans les pays industrialisés (Herzog, 2005).

2.3.1. Caractéristiques anatomiques et histologiques de l'ostéosarcome

L'ostéosarcome est une tumeur maligne de l'os avec production de matrice osseuse habitée par des cellules tumorales. Il est caractérisé par la présence d'un ou de plusieurs des tissus formés lors du processus normal de formation osseuse, c'est-à-dire les ostéoblastes, l'ostéoïde, l'os et le cartilage (Turek, 1959). Le siège de la tumeur se situe principalement dans la métaphyse des os longs. Ses localisations principales sont au niveau du fémur distal, du tibia proximal et de l'humérus proximal (Wittig et al, 2002). Environ 50% des cas d'ostéosarcome surviennent au niveau du genoux, mais un faible pourcentage (moins de 10%) peuvent survenir au niveau du squelette axial, plus précisément au niveau du pelvis (Marina et al, 2004). La plupart des ostéosarcomes sont associés avec la destruction du cortex de l'os et la formation d'une masse de tissu mou qui démontre parfois le phénomène d'ossification.

L'ostéosarcome est une tumeur à prédominance masculine avec 2 pics d'âge : soit les enfants, les adolescents et les jeunes adultes d'une part (surtout entre 10 et 25 ans, l'âge modal chez la fille est de 16 ans et est de 18 ans chez le garçon) et les personnes âgées de plus de 40 ans d'autre part. Les ostéosarcomes associés à ce deuxième pic sont dits secondaires, c'est-à-dire qu'ils sont associés à une condition préexistante chez le sujet. Diverses conditions peuvent être à

l'origine de ce deuxième pic telles: des agents chimiques, un virus, des radiations, un traumatisme, une brûlure électrique, la présence d'un facteur héréditaire et autres, incluant la maladie de Paget (Fuchs et al, 2002).

2.3.2. Classement des différents types d'ostéosarcome

Les ostéosarcomes peuvent se présenter sous 3 formes. La première est la forme sclérotique qui survient lors de la production tumorale d'ostéoïde. C'est une forme caractérisée par un néoplasme mou et bien vascularisé qui contient une abondance d'ostéoblastes anaplasés qui sont très gros, avec des noyaux larges, hyperchromatiques et qui ont des mitoses fréquentes. C'est donc un type qui amène une formation osseuse et qui apparaît comme une petite masse irrégulière. Ensuite, il y a la forme ostéolytique qui est représentée par une tumeur vasculaire qui provoque un risque élevé de fractures pathologiques et qui se différencie de la forme sclérotique surtout par l'absence de formation de tissu osseux. La dernière catégorie est mixte, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'un mélange des deux premières catégories. Cette forme démontre une quantité modérée d'ostéogenèse (Turek, 1959). C'est cette dernière catégorie qui est la plus souvent retrouvée parmi les patients (Wittig et al, 2002). Par contre, le taux de survie des patients n'est pas influencé par le type d'ostéosarcome retrouvé (Devita et al, 1997).

Les ostéosarcomes peuvent aussi être classés selon des variantes de grades élevés, intermédiaires ou de bas grades de la tumeur. Ces paramètres sont évalués selon la cellularité, le pléomorphisme, le degré d'anaplasie et le nombre de mitoses. Par exemple, si la tumeur est caractérisée par une matrice immature et par la présence de nombreuses cellules en période de multiplication, on dira que c'est une tumeur de grade élevé. Par contre, si on retrouve dans la tumeur peu de cellules en division et une matrice relativement mature, la tumeur en sera une de bas grade. Il existe plusieurs sous-types de tumeurs. Pour les tumeurs de grade élevé, elles sont principalement ostéoblastiques, chondroblastiques, ou fibroblastiques avec une prédominance pour le sous-type ostéoblastique. Deux sous-types additionnels sont reconnus par le OMS (Organisation Mondiale de la Santé): les tumeurs à petites cellules et les tumeurs

télangiectatiques. Elles peuvent aussi être qualifiées de périostale, et si elles sont de bas grades, de parostéale ou d'intra-médullaire. Les tumeurs de bas grade ne nécessitent pas de chimiothérapie, contrairement à celles de haut grade.

Le système de stade orthopédique le plus couramment utilisé est le système Enneking (Enneking, 1989) :

Stade	Grade et extension anatomique
I	Tumeur de grade bas
IA	Intracompartimentale
IB	Extracompartimentale
II	Tumeur de grade élevé
IIA	Intracompartimentale
IIB	Extracompartimentale
III	Avec métastases distantes

Tableau I : Le système Enneking pour les stades d'ostéosarcome

Le statut compartimental est déterminé par le degré d'extension de la tumeur jusqu'au cortex, par exemple, la tumeur sera intracompartimentale si elle n'est pas encore entrée en contact avec le cortex. Les ostéosarcomes les plus communs sont présents au stade IIB, c'est-à-dire que la tumeur est de grade élevé et qu'elle a envahit le cortex, ou au stade III, signe qu'il y a présence de métastases (Marina et al, 2004).

2.3.3. Les facteurs étiologiques, ces inconnus

Les facteurs étiologiques responsables de l'avènement d'un ostéosarcome restent à ce jour inconnus. L'influence de l'âge (il se produit principalement à l'adolescence alors que la plupart des autres cancers surviennent surtout chez des personnes plus âgées), sa localisation

(préférentielle dans le fémur, le tibia et l'humérus) ou encore son apparition suite à la maladie de Paget restent à ce jour à déterminer (Fuchs et al, 2002).

Ainsi, notre compréhension de l'étiologie de l'ostéosarcome reste à ce jour limitée. L'incidence maximale observée coïncidant avec une période de croissance osseuse rapide, une corrélation entre cette croissance osseuse rapide et l'évolution de l'ostéosarcome a été suggérée (Marina et al, 2004). L'âge d'incidence maximale des filles étant plus bas que celui des garçons, cela pourrait venir appuyer la corrélation observée entre la croissance osseuse rapide et l'apparition de l'ostéosarcome puisque la croissance rapide des filles se présente avant celle des garçons (Price et al, 1958).

Des altérations génétiques pourraient aussi être à l'origine de l'apparition d'un ostéosarcome. Parmi celles-ci, deux altérations sont dignes de mention : 1. les translocations réciproques avec un caryotype normal et altération de la voie de signalisation de gènes suppresseurs de tumeurs et 2. un caryotype anormal et complexe avec altération des voies de suppression des tumeurs telles celles du p53 et du rétinoblastome (Gorlick et al, 2003). En effet, la protéine p53 va enclencher une voie majeure de suppression des tumeurs impliquant l'apoptose, alors que la protéine Rb va empêcher les cellules de proliférer en les arrêtant au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire (Fuchs et al, 2002).

2.3.4. Traitements actuels

Le taux de survie a été grandement amélioré par l'avènement de traitements innovateurs, incluant l'induction avec néoadjuvants (en période pré-opératoire), la chimiothérapie avec adjuvants (en période post-opératoire), et la thoracotomie agressive contre les maladies pulmonaires. De nos jours, avec les traitements de chimiothérapie, 90-95% des patients à qui un ostéosarcome a été diagnostiqué peuvent être traités par une chirurgie non-amputative (Wittig et al, 2002) et cette augmentation du taux de réussite de la chirurgie correspond à la diminution en parallèle du taux d'amputation (Bacci et al, 2005). À long terme, le taux de survie, avec des

traitements intenses de chimiothérapie, est maintenant passé à plus de 60% (Bacci et al, 2005). Malheureusement, environ 80% des patients présentant un ostéosarcome localisé développent des métastases suite à la chirurgie de retrait de la tumeur (Marina et al, 2004), malgré qu'au moment du diagnostique, seulement 20% des patients présentent déjà des métastases cliniquement détectables (Meyers et al, 2005).

Les agents les plus couramment utilisés comme traitement de chimiothérapie incluent la cisplatine (Gasparini et al, 1985), avec le doxorubicine (Pratt et al, 1974) et des doses élevées de méthotrexate avec sauvetage à la leucovorine (Pratt et al, 1980) en simultané (Meyers et al, 2001 et Bielack et al, 2002). Les autres agents utilisés incluent l'ifosfamide avec le mesna (Wittig et al, 2002) et plus récemment, le tripeptide muramyl (Meyers et al, 2005). Malheureusement, il semblerait que les limites soient atteintes quant à la possibilité de traiter les patients diagnostiqués avec un ostéosarcome par rapport à la chimiothérapie disponible.

2.3.5. Les limites de nos connaissances

Devant le plafonnement de l'amélioration du taux de survie des patients atteints d'un ostéosarcome, quatre groupes de recherche majeurs dans le domaine de l'ostéosarcome (COG (Groupe oncologique Nord Américain des enfants), COSS (groupe d'étude de l'ostéosarcome coopératif Allemand-Autrichien-Suisse), EOI (Intergroupe Européen de l'Ostéosarcome) et SSG (Groupe de Sarcome Scandinave) ont décidé de se regrouper afin de tester de nouveaux agents chimiothérapeutiques (Marina et al, 2004). Malheureusement, les traitements utilisant plusieurs agents en simultanés sont souvent associés avec des problèmes de toxicité aiguë et à long terme. Le problème majeur vient du fait que les traitements disponibles à ce jour pour les patients atteints d'un ostéosarcome ont atteints leurs limites, et qu'aucun nouvel agent chimiothérapeutique n'est disponible. En effet, l'intensification de la chimiothérapie depuis 15 ans n'a pas donné les résultats escomptés puisque chaque amélioration mineure était accompagnée d'effets secondaires sévères. Devant cet impasse, nous nous devons d'investiguer davantage les facteurs pronostiques possiblement impliqués dans la tumorigénicité des

ostéosarcomes ce qui pourraient amener à la découverte de nouveaux traitements innovateurs. Notre étude se propose d'étudier l'expression de l'endothéline-1 et des métalloprotéases au niveau de l'ostéosarcome afin de possiblement proposer une nouvelle approche thérapeutique.

Le facteur pronostique le plus souvent utilisé est la présence de métastases cliniquement détectables au moment du diagnostic (Marina et al, 1993 et Meyers et al, 1993). Les autres facteurs pronostiques utilisés incluent le site de la tumeur primaire, où les lésions axiales ont le pire pronostic (Bielack et al, 2002), la grosseur de la tumeur, la réponse à la chimiothérapie et la rémission suite à la chirurgie (Bielack et al, 2002). Deux autres facteurs pronostiques potentiels ont fait l'objet d'études ; le taux circulant de phosphatase alcaline et de lactate déshydrogénase. Il a été démontré que ces deux enzymes se retrouvent à des niveaux élevés au niveau de la tumeur primaire (Link et al, 1986 et Thorpe et al, 1979) et que leur élévation à des niveaux supérieurs à la moyenne correspond à un taux plus faible de survie sans rechute (Meyers et al, 2005). Des résultats controversés sont retrouvés pour l'âge, le sexe et l'ethnie quant à leur possibilité d'utilisation en tant que facteurs prédictifs de l'issue de la maladie et par conséquent, ne peuvent être utilisés comme facteurs pronostiques. (Bacci et al, 2005). Parmi tous les facteurs pronostiques disponibles à ce jour, la réponse histologique de la tumeur à la chimiothérapie pré-opérative est le plus important facteur prédictif de la survie sans maladie (Glasser DB et al, 1992 et Pochanugool et al, 1997).

Ainsi, comme les facteurs pronostiques disponibles sont limités, les efforts sont aujourd'hui orientés vers la découverte de nouveaux facteurs biologiques prédictifs de l'issue des traitements. En novembre 2001, une rencontre organisée par le NIH Office of Rare Disease, le COG ainsi que le National Cancer Institute-Cancer Therapy Evaluation Program a principalement porté sur l'étude de la biologie de l'ostéosarcome (Gorlick et al, 2003). L'étude des gènes et des protéines exprimés par l'ostéosarcome pourrait bientôt fournir des informations sur l'évolution de la tumeur, sur le potentiel métastatique, sur le sous-groupe clinique et, ce qui est le plus intéressant, fournir des indications pour des cibles thérapeutiques possibles dans le traitement de l'ostéosarcome, incluant le ciblage des voies de signalisation critiques dans la

propagation tumorale. Ainsi, il devient envisageable que l'inhibiteur d'une petite molécule, un facteur de croissance, un radionucléotide, une thérapie génique virale ou encore des anticorps monoclonaux variés puissent un jour venir compléter la chimiothérapie systémique et la chirurgie qui restent, à ce jour, les bases du traitement de l'ostéosarcome, mais qui ont atteint les limites de leur efficacité.

Dans cette optique, l'étude des interactions entre l'endothéline-1 et les métalloprotéases matricielles s'avère des plus pertinentes. En effet, un rôle pour l'endothéline-1 dans l'évolution tumorale a déjà été proposé dans les cancers ovariens (Rosano et al, 2001) et mérite d'être davantage investigué au niveau de l'ostéosarcome. De même pour les MMP où les MMP-2 et MMP-9 sont en cours d'étude (Saito et al, 2002, Ferrari et al, 2004 et Foukas et al, 2002) en tant que facteurs pronostiques possibles de l'évolution des cancers. La présence des MMP semble être un facteur pronostique défavorable de l'issue des cancers, ce qui leur attribue ainsi un rôle dans la promotion cancéreuse.

2.4. LE CANCER

2.4.1. Étapes et mécanismes du cancer

L'évolution défavorable, voir fatale, de la maladie cancéreuse, incluant le mauvais de l'ostéosarcome, est habituellement attribuable à la dissémination et à la dispersion des métastases. Le processus métastatique fait référence à la migration des cellules cancéreuses de leur site d'origine, soit la tumeur primaire, jusqu'aux organes distants où elles vont former des tumeurs secondaires. C'est cette capacité des cellules cancéreuses à métastasier qui rend le cancer difficilement traitable. En effet, il est possible d'éliminer une tumeur primaire par retrait chirurgical ou par radiation localisée. Le problème vient du fait que les métastases sont souvent trop dispersées ou inaccessibles pour un traitement efficace, causant ainsi la mort du patient atteint. Par conséquent, s'il était possible d'enrayer le phénomène des métastases, il deviendrait également possible de traiter efficacement le cancer. C'est dans cette optique que des recherches

sont entreprises afin d'étudier chaque étape de la propagation des métastases qui pourraient possiblement servir de cible thérapeutique.

Seules les cellules cancéreuses malignes ont la possibilité de métastasier. Pour qu'il y ait développement d'une tumeur, une cellule va subir une mutation qui lui fera acquérir un phénotype cancéreux. Par la suite, une multiplication clonale de cette cellule transformée va amener la formation d'une tumeur primaire solide. Cette tumeur primaire va continuellement croître jusqu'à ce que les besoins métaboliques des cellules la formant excèdent l'apport métabolique initialement fourni par le micro-environnement de l'organe. Ainsi, la poursuite des étapes menant aux métastases requière l'avènement de l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux sanguins existants à l'intérieur même de la tumeur. Ce réseau capillaire va dériver des tissus avoisinants de l'hôte et va permettre non seulement de combler les besoins métaboliques des cellules, mais va également permettre aux cellules d'intravaser donc de pénétrer dans la vasculature de l'hôte. Pour ce faire, les cellules malignes vont diminuer l'expression de leurs molécules d'adhésion, ce qui leur permettra de se détacher de la lésion primaire et d'envahir le stroma de l'hôte, via le nouveau réseau de capillaires. Il est également possible pour les cellules cancéreuses de pénétrer dans le système lymphatique de l'hôte puis de migrer jusqu'à un noeud lymphatique pour éventuellement atteindre le système sanguin.

Donc, les cellules cancéreuses vont circuler à l'intérieur des vaisseaux, s'arrêter à un endroit spécifique, pour ensuite adhérer dans le lit capillaire d'un organe distant où elles vont extravaser dans le parenchyme de l'organe-cible. Après cette migration, les cellules vont proliférer, former des micrométastases, développer une néovascularisation pour finalement former une tumeur secondaire. C'est la formation de tumeurs secondaires qui représente le phénomène des métastases. Il est également possible que ces cellules entament un nouveau cycle de métastases, phénomène appelé métastases des métastases, pour former des tumeurs tertiaires et ainsi de suite. Il a été démontré que l'endothéline-1 et les métalloprotéases jouent un rôle dans plusieurs de ces étapes.

Hanahan et Weinberg ont proposé une théorie selon laquelle chaque cancer doit acquérir 6 altérations essentielles dans la physiologie cellulaire. Ces changements vont collectivement guider la croissance cellulaire : 1. auto-suffisance pour les facteurs de croissance, 2. insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, 3. évasion de la mort programmée cellulaire, 4. potentiel de réplication illimité, 5. angiogénèse soutenue et 6. invasion tissulaire et métastase (Hanahan et al, 2000). Il est important de mentionner que la formation de métastases comprend toutes ces étapes et que chacune d'elle est limitante, c'est-à-dire que l'échec d'une seule de ces étapes va empêcher la formation de métastases.

2.4.2. Plus spécifiquement, l'invasion tumorale

L'invasion tumorale consiste à l'envahissement des tissus avoisinants la tumeur, ce qui est une conséquence de la prolifération cellulaire augmentée. Les cellules qui quittent la tumeur primaire vont préférentiellement migrer vers les vaisseaux. Pour ce faire, les cellules doivent traverser la matrice extracellulaire et la membrane basale qui entoure les vaisseaux sanguins. Ainsi, les cellules tumorales vont sécréter des enzymes, principalement des protéases, capables de dégrader la matrice extracellulaire permettant alors à ces cellules de pénétrer à l'intérieur des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. L'intérêt de l'étude sur les MMP et les mécanismes contrôlant leur expression et leur activité s'explique par cette étape cruciale dans la formation des métastases.

Il existe une autre étape du développement tumoral où la dégradation de la matrice extracellulaire joue un rôle déterminant. Il s'agit de l'étape d'extravasation. Lorsque l'emboli formé de cellules tumorales est fermement attaché à la paroi d'un vaisseau sanguin à un endroit quelconque du système vasculaire, il y a rétraction des cellules endothéliales, ce qui expose les cellules tumorales à la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales ainsi que les cellules de l'hôte vont à nouveau sécréter des protéases, ainsi que des activateurs de ces protéases capables de dégrader les composantes de la matrice. Les cellules tumorales peuvent donc quitter le

système sanguin pour pénétrer dans le parenchyme de l'hôte afin d'y former une tumeur secondaire.

Comme chacune des étapes de la propagation cancéreuse est limitante, par l'inhibition d'une seule de ces étapes, le phénomène des métastases serait théoriquement enrayé. Par conséquent, le blocage de la dégradation de la matrice extracellulaire, dégradation principalement effectuée par les MMP, constitue une cible thérapeutique envisageable dans l'éradication du cancer. Il a d'ailleurs été démontré que la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire constitue un point critique pour l'invasion des cellules tumorales et la métastases à des sites distants (Ossowski et al, 1983 et Liotta et al, 1980). Ainsi, un blocage des MMP et des phénomènes à l'origine de leur induction, telle la présence de l'ET-1, serait une cible thérapeutique envisageable dans le traitement des cancers surexprimant ces protéines, comme c'est le cas de l'ostéosarcome.

2.4.3 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

2.4.3.1. Les composantes de la MEC

La matrice extracellulaire est un assemblage complexe de plusieurs macromolécules telles les fibres (collagène, élastine), les substances fondamentales (protéoglycanes, acide hyaluronique, protéines non-fibreuses, lipides, minéraux, eau) et finalement les facteurs de croissance (FGF, TGF et PDGF). En fait, la matrice extracellulaire est un terme collectif qui inclut les composants matriciels de l'espace extracellulaire des 4 types de tissus du corps humains, incluant le tissu osseux. Le tissu prédominant de l'os est le tissu conjonctif dense et il comporte presque exclusivement des éléments fibreux de la matrice extracellulaire tels des fibres de collagène associées en faisceau dense ainsi que d'autres fibres protéiques, des protéoglycanes et de l'élastine.

2.4.3.2. La dégradation de la MEC

La matrice se renouvelle constamment en fonction du turn-over du tissu qu'elle contribue à constituer. La dégradation de la MEC joue un rôle important dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques. En général, la MEC peut être dégradée par 4 types d'enzymes protéolytiques : les protéinases cystéines, les protéinases aspartiques, les protéinases sérines et les métalloprotéases (Birkedal-Hansen et al, 1993). Il y a plusieurs évidences démontrant que les MMP jouent un rôle important dans le remodelage de la MEC lors de situations physiologiques telles le développement tissulaire fœtal et la réparation tissulaire post-natal. Cependant, une dégradation excessive de la MEC se produit dans plusieurs conditions pathologiques incluant l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite, les ulcères chroniques... En particulier, la dégradation incontrôlée de la MEC par les MMP apparaît jouer un rôle important dans l'invasion tumorale et la métastase (Johansson et al, 2000). Cependant, les MMP ont aussi une activité protéolytique dirigée contre des protéines non matricielles jouant un rôle complexe dans plusieurs autres étapes de la progression tumorale tels : la perte d'adhérence, l'invasion, la prolifération, l'angiogenèse, l'intravasation, l'extravasation et la croissance des tumeurs métastatiques. Ainsi, les mécanismes participant à la régulation de l'expression et de l'activité des MMP s'avèrent pertinents à élucider et par conséquent, les molécules, telle l'endothéline-1, impliquée dans ces mécanismes.

2.5. HYPOTHÈSE

Nous avons postulé que le caractère invasif des ostéosarcomes humains est attribuable aux interactions existantes entre le système des métalloprotéases (MMP) et les endothélines. Dans le microenvironnement tumoral, ces interactions pourraient mener à une boucle autocrine/paracrine qui amplifierait la production locale des facteurs participants à l'invasion des cellules tumorales. Le caractère agressif des cellules d'ostéosarcome serait donc sous le contrôle des facteurs qui interviennent dans plusieurs phénomènes tels que l'invasion, la dégradation de la matrice extracellulaire et le développement des métastases.

2.6. OBJECTIFS

L'objectif général a été de déterminer le rôle potentiel de l'ET-1 dans l'invasion tumorale des ostéosarcomes humains afin de prouver que les endothélines pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de l'ostéosarcome humain

Les objectifs spécifiques ont été :

- 1- de démontrer l'expression de l'ET-1, des récepteurs de l'ET-1 (ET_A et ET_B) ainsi que l'expression des gélatinases par les tissus humains et les cellules d'ostéosarcome
- 2- de déterminer l'effet de l'ET-1 et de la Big ET-1 sur la synthèse des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) dans des cellules d'ostéosarcome. L'hypothèse testée dans cet objectif a été que dans le microenvironnement tumoral, les MMP peuvent cliver la Big ET-1 (le précurseur immédiat de l'ET-1) conduisant ainsi à la formation des nouvelles formes alternatives activées qui pourraient favoriser l'invasion des cellules tumorales.
- 3- de déterminer le rôle du facteur NF-kB en tant que facteur impliqué dans la malignité de l'ostéosarcome. Notre hypothèse a été que l'activation du NF-kB pourrait s'effectuer via le système endothéline.

CHAPITRE 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Cellules et Tissus

Cette étude a été réalisée à l'aide de tissus humains : i) lignées des cellules d'ostéosarcome commercialisées ii) tumeurs provenant des chirurgies et iii) lignées des cellules dérivées des tumeurs. Les cellules commercialisées (provenant de American Type Culture Collection, Manassas, VA) (Tableau II) ont été utilisées.

Lignées cellulaires	Type de tumeur
Saos-2	Ostéosarcome
MNNG/HOS	Ostéosarcome
MG-63	Ostéosarcome
SK-ES-1	Ostéosarcome ou Sarcome d'Ewing
SJSA-1	Ostéosarcome
SW 1353	Chondrosarcome

Tableau II : Les lignées cellulaires

Les cellules Saos-2 sont des cellules d'ostéosarcome provenant d'une femme caucasienne de 11 ans. Les cellules ont une morphologie de type épithéliale et ne sont pas tumorigéniques lorsqu'inoculées dans des souris immunosuppressées, mais elles forment des colonies dans un milieu semi-solide. Les MNNG/HOS sont une lignée cellulaire dérivée d'un ostéosarcome provenant d'une femme caucasienne de 13 ans. Ces cellules sont tumorigéniques et lorsqu'injectées en sous-cutanée dans des souris *nudes*, des tumeurs se développent en 21 jours avec une fréquence de 100%. Les cellules MG-63 sont des cellules provenant d'un ostéosarcome prélevé chez un mâle caucasien de 14 ans et ces cellules ont une morphologie de type fibroblastique. La lignée cellulaire SK-ES-1 provient d'un sarcome d'un mâle caucasien de 18 ans. Le tissu d'où proviennent ces cellules était soit un sarcome d'Ewing ou un ostéosarcome anaplasique. Ces cellules sont tumorigéniques, c'est-à-dire qu'elles forment des tumeurs malignes à petites cellules s'apparentant au sarcome d'Ewing dans des souris *nudes*. Les cellules

SJSA-1 sont des cellules d'ostéosarcome ou de sarcome multipotentiel provenant d'un mâle de race noire de 19 ans et ont une morphologie de type fibroblastique. Les cellules SW 1353 sont une lignée cellulaire dérivée d'un chondrosarcome provenant d'une femme caucasienne de 72 ans. Les cellules ont une morphologie de type fibroblastique. Les cellules d'OS #1 proviennent d'une tumeur d'ostéosarcome prélevé sur le tibia gauche d'une personne de sexe masculin de 6 ans. Les cellules dérivées de l'OS #2 proviennent d'un ostéosarcome ostéogénique de grade 4/4 prélevé sur le tibia proximal droit d'une femme de 14 ans. Les cellules de l'OS #3 proviennent d'un ostéosarcome prélevé sur le fémur d'une femme de 25 ans.

Les tissus humains provenant des chirurgies ont été collectés avec le consentement libre et éclairé des patients qui ont été traités par chirurgie (ablation de la masse tumorale). L'étude et l'utilisation des tissus ont été approuvées par le Comité d'éthique de la recherche (CER) des hôpitaux concernés. Une collaboration existe depuis plusieurs années entre les chercheurs des hôpitaux impliqués Dr Marc Isler, Dr Josée Doyon, Dr Alain Moreau et Dr Robert Turcotte. Afin d'établir les caractéristiques histomorphométriques de l'ostéosarcome, le type de la tumeur et la classification selon l'échelle décrite dans la littérature, tous les spécimens ont été évalués histologiquement après coloration à l'hématoxyline et/ou à l'éosine. Ces colorations ont été effectuées dans notre laboratoire ainsi qu'au laboratoire de pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont où le grade histologique de la tumeur a été déterminé (Tableau VI).

3.2. Isolation des cellules ostéoblastiques provenant des ostéosarcomes et leur caractérisation

Les tissus ont été traités immédiatement après l'excision de la tumeur, dans des conditions stériles. Ils ont été incubés pendant 30 minutes dans du PBS contenant des antibiotiques : pénicilline (100unités/mL) et streptomycine (100µg/mL) (pen/strep 1% ; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) puis, ils ont été traités par dissection mécanique. Nous avons l'expertise de mise en culture des tumeurs prostatiques (Le Brun et al, 1996). Les tissus ont été découpés en morceaux de moins de 5mm et ont ensuite été mis dans des contenants de culture de

75cm² et cultivés dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Hyclone, Logan, UT) chauffé et inactivé et de 1% de pénicilline-streptomycine jusqu'à confluence. Les cellules des clones sélectionnés ont été caractérisées par l'expression de l'ostéocrine ; une protéine spécifique des ostéoblastes en période de différenciation qui a récemment été découverte (Thomas et al, 2003).

3.3. Culture cellulaire :

Les cellules (voir Tableau II) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone, Logan, UT) et 1% de pen/strep (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) dans des boîtes de 75 cm² à 37⁰C et 5% de CO₂. Lorsque les cellules arrivaient à confluence (10⁴ cellules par cm²), elles étaient trypsinées (Trypsine, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) pour être ensuite reprises en un autre passage. Les cellules étaient privées à 0.5% de SVF dans du DMEM et 1% de pen/strep pour une période de 24 heures. Cette privation permettait d'arrêter la croissance des cellules et la sécrétion de toute substance pouvant influencer l'action des protéines étudiées. Les cellules étaient ensuite stimulées avec différents produits : l'ET-1 à 10nM (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), la Big ET-1 à 10nM (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), l'IL-1 β à 200pg/mL (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et le PDTC (Acide Pyrrolidine carbodithioïque) de 0-10 μ M (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego) dans du milieu DMEM à 2,5% de SVF selon différents temps et doses à 37⁰C. Le PDTC, lorsqu'utilisé pour les stimulations, a été ajouté 30 minutes avant l'ajout de l'ET-1. Les milieux de culture ont par la suite été récupérés et congelés à -20⁰C jusqu'à leur utilisation. Les lysats cellulaires ont été repris dans du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) à 0,5% préalablement chauffé jusqu'à ébullition et ont été congelés dans les mêmes conditions que les milieux et utilisés pour la détection des protéines intracellulaires et/ou membranaires.

3.4. Extraction d'ARN et RT-PCR :

Pour la préparation de l'ARN, les cellules ont été ensemencées dans des contenants de culture de 25cm² dans du DMEM à 10% de SVF et 1% de pen/strep jusqu'à confluence (10⁴ cellules par cm²). Par la suite, les cellules ont été privées à 0.5% de SVF dans du DMEM et 1% de pen/strep pour une période de 24 heures. Puis elles ont été cultivées pendant 24 heures dans du DMEM à 2.5% de SVF et 1% de pen/strep. Le surnageant a été enlevé, les cellules lavées dans du PBS et l'ARN a été récupérée avec le réactif Trizol (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) comme décrit précédemment (Roy-Beaudry et al, 2003). L'ARN était suspendue dans de l'eau stérile puis dosée par la méthode du Ribogreen selon les spécifications du fabricant (Jones et al, 1998). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) 1,2% et tampon MOPS (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada). Pour la méthode de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), des aliquots de 1µg d'ARN ont été chauffés à 25⁰C pendant 10 minutes, puis 42⁰C pendant 30 minutes et transcrits en ADN par la reverse transcriptase (Moloney murine leukemia-virus; MMLV-RT, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Le produit total de la réaction RT (17µL) a été utilisé pour amplification par PCR (1 cycle : 94⁰C, 60⁰C et 72⁰C pendant 1minute chacun). L'amplification a été réalisée dans un amplificateur Progene (Techne, Wolf laboratory Limited, Pocklington, YO) avec dNTPs (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé. QC, Canada), Taq polymerase (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), les amorces spécifiques (commandée chez Medicorp, Montréal, QC, Canada) et MgCl₂. Des aliquots de 10µL de chaque échantillon de la réaction PCR ont été analysés sur des gels d'agarose 1,2% pour détecter les amplifications et visualisés par le bromure d'éthidium sous ultra-violets.

Gène	Amorce (5' → 3')	Séquence	Poids Moléculaire	# cycle
ET-1	Sens	GTCAACACTCCCGACCACGTT	369	30
	Anti-Sens	CTGGTTTGTCTTAGGTGTTCCCTC		
ETA	Sens	ACCACAGTCCATGCCATCAC	383	35
	Anti-Sens	TCAACATCTCACAAGTCATGAG		
ETB	Sens	TTGGAGCTGAGATGTGTAAGC	450	35
	Anti-Sens	CAGTGAAGCCATGTTGATACC		
MMP-2	Sens	GGTTTATTTGGCGGAC	324	30
	Anti-Sens	TCAGCAGCCCAGCCAGTC		
MMP-9	Sens	GGAGACCTGAGAACCAATCTC	342	30
	Anti-Sens	TCCAATAGGTGATGTTGTCGT		
MT1- MMP	Sens	GGGCCCAACATCTGTGAC	540	30
	Anti-Sens	GCAGCCCATCCAGTCC		
MMP-1	Sens	CTGAAAGTGACTGGGAAACC	300	35
	Anti-Sens	AGAGTTGTCCCGATGATCTC		
MMP-3	Sens	GAAAGTCTGGGAAGAGGTGACTCC AC	284	35
	Anti-Sens	CAGTGTTGGCTGAGTGAAAGAGAC CC		
MMP-13	Sens	CTTAGAGGTGACTGGCAAAC	314	35
	Anti-Sens	GCCCATCAAATGGGTAGAAG		
PARP-1	Sens	AGCACTAAAGAGGAGGTGGAA	531	30
	Anti-Sens	TTTTGGAGTGCCAAGCATTC		
TIMP-1	Sens	CTTCTGGCATCCTGTTGTTT	481	35
	Anti-Sens	AGAAGGCCGTCTGTGGGT		
TIMP-2	Sens	CCAAGCAGGACTTTCTCGAC	522	35
	Anti-Sens	TTCCAGGAATTTATGTCAG		
TIMP-3	Sens	CCTGCTGCTACCTGCCTTGC	104	35

	Anti-Sens	GGCGTAGTGTTTGGACTGGT		
TIMP-4	Sens	AGACCTCACAGGCTCAGTCG	107	35
	Anti-Sens	CATTCCTGCCAGTCAGCCTG		
IL-1 β	Sens	TACGAATCTCCGACCACCA	424	35
	Anti-Sens	TGGAGGTGGAGAGCTTTC		
Chymase	Sens	AAGCCACATTCCCGCCCCTACAT	552	35
	Anti-Sens	CACCCCAGCACACAGAAGAGG		
GAPDH	Sens	CAGAACATCATCCCTGCCTCT	319	30
	Anti-Sens	GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG		

Tableau III : Amorces et conditions d'utilisation pour PCR

3.5. Dosage de protéines

Lorsque les périodes de stimulation ont été terminées, les surnageants ont été prélevés et congelés à -20°C . Les lysats cellulaires ont été extraits dans du SDS 0.5% en ébullition. La concentration protéique des lysats cellulaires a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.6. Western Blot :

Les échantillons utilisés provenaient de surnageants (pour la détermination de la MMP-2, TIMP-1 et TIMP-2) ou de lysats cellulaires (pour la détermination du NF- κ B p65, de l'actine et de la COX-2, utilisés à une quantité protéique de $10\mu\text{g}$) extraits dans du SDS 0.5% en ébullition. Les échantillons ont ensuite été bouillis pendant 5 minutes puis ont été chargés dans un gel SDS-PAGE (système Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en gel d'acrylamide où la séparation des protéines s'est faite par électrophorèse. La migration s'est effectuée dans un gel de concentration de 4% (Tris 0.5M, pH 6.8) et un gel de résolution de 10% (Tris 1.5M, pH 8.8) à la température de la pièce sous 100 volts (appareil Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les protéines ont ensuite

été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le transfert a été effectué à 4⁰C sous 120 volts pendant 1 heure. Les membranes ont ensuite été immergées toute la nuit dans un tampon bloquant (lait en poudre à 5% dilué dans une solution de SuperBlock™ (Pierce, Rockford, IL). Après 6 lavages de 5 à 10 minutes dans du T-TBS 1X (20mM de Tris base, 0.15M NaCl, pH 7.5 et 0.1% de Tween-20), les membranes ont été incubées pendant la nuit à 4⁰C avec les anticorps primaires (Tableau IV).

Anticorps primaire	Concentration	Dilution	Compagnie	Types d'anticorps primaires
MMP-2	100µg/mL	1/1000	Oncogene Research Products	Monoclonal de souris
TIMP-1	100µg/mL	1/1000	Oncogene Research Products	Monoclonal de souris
TIMP-2	100µg/mL	1/1000	Oncogene Research Products	Monoclonal de souris
NF-κB p65	200µg/mL	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal de lapin
Actine	de 400µg/mL à 800µg/mL	1/15000	Sigma	Polyclonal de lapin
COX-2	100µg/mL	1/1000	Cayman Chemical	Polyclonal de lapin

Tableau IV : Liste des anticorps primaires utilisés pour analyse par Western Blot

Après 6 lavages de 5 à 10 minutes dans du T-TBS 1X, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température pièce avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase correspondants (Tableau V).

Anticorps Primaire	Anticorps Secondaire	Dilution
MMP-2	Chèvre anti-souris	1/40 000
TIMP-1	Chèvre anti-souris	1/40 000
TIMP-2	Chèvre anti-souris	1/40 000
NF- κ B p65	Chèvre anti-lapin	1/40 000
Actine	Chèvre anti-lapin	1/20 000
COX-2	Chèvre anti-lapin	1/40 000

Tableau V : Liste des anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western Blot

Les anticorps secondaires provenaient tous de Pierce (Rockford, IL). Du substrat SuperSignal Ultra Western blot chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL) a ensuite été aspergé sur les membranes pour la révélation des protéines. Les membranes ont ensuite été exposées sur film (Kodak BioMax, Eastman Kodak, Rochester NY) pour la détection.

3.7. Northern Blot :

Après l'extraction de l'ARN, 5 μ g d'ARN total a migré sur un gel d'agarose dénaturant de formaldéhyde 1,2% puis a été transféré électrophorétiquement sur une membrane de nylon (Hybond C extra, Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) dans un tampon d'acétate de sodium 10mM (pH 7,8) contenant 20mM de Tris et 0,5mM d'EDTA (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) dans un appareil de transfert (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH) pendant 6heures à 15V. L'ARN a été lié à la membrane par exposition aux ultra-violets. Après la pré-hybridation de 24 heures, l'hybridation a été faite à 68⁰C avec les sondes d'ARN marquées à la DIG (digoxigenin-11-UTP, Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) de MMP-2 et de MMP-9 (généreusement données par le Dr Ginette Tardif, Unité de Recherche en arthrose, Centre de Recherche du CHUM-Notre-Dame, Montréal, Qc). Les sites non-spécifiques ont été bloqués dans un tampon de blocage (Blocking Reagent, Roche Diagnostic,

Laval, QC, Canada) puis la membrane a été incubée avec l'anticorps anti-digoxigénine-AP (150 U, Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) pendant 1 heure à la température ambiante. La solution signal CDP-Star (25mM, Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) a été utilisée pour la détection. Puis la détection du signal de la membrane a été faite par exposition sur film (Kodak BioMax, Eastman Kodak, Rochester NY).

3.8. Zymographie :

Le supernatant provenant de la culture des cellules d'ostéosarcome MG-63 a été utilisé. Les zymographies avec le substrat de gélatine (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) ont été faites avec des gels de SDS-polyacrylamide conjugués à la gélatine (gel de concentration de 4% et gel de résolution de 7,5%). Après la migration, les gels ont été lavés au Triton X-100 2.5% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) pendant 30 minutes à température pièce puis incubés pour la nuit à 37°C dans une solution d'incubation (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4, CaCl₂ 10 mmol/L, ZnCl₂ 5 mmol/L et 0.05% Brij-35). Les gels ont par la suite été colorés au Bleu de Coomassie à 0.2% (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) puis décolorés dans une solution décolorante (40% méthanol, 10% acide acétique, 50% eau distillée). Les bandes blanches sur fond bleu correspondent aux endroits où les gélatinases ont dégradé le gel.

3.9. Hybridation *in situ* :

Les tissus ont été fixés dans de la paraformaldéhyde à 4% et enrobés dans la paraffine. Des sections de 5µm ont été déparaffinées dans le toluène et réhydratées dans des concentrations décroissantes d'éthanol. Les lames ont été traitées dans une solution de Triton X-100 (Laboratoire Mat, Beauport, QC, Canada; 0.3% de Triton X-100 dans du PBS) puis digérées en présence de protéinase K (Boehringer Mannheim, 5µg/mL dans du tampon Tris-HCl 100mM et EDTA 50mM, pH 8). Les tissus ont été post-fixées dans de la paraformaldéhyde à 4% puis acétylés avec de l'anhydride acétique 0.25% dans du triétanolamine 0.1M (pH 8). Les lames ont

ensuite été incubées dans un standard saline citrate (SSC) 2X, puis dans la solution de pré-hybridation (1/2 SSC 8X et 1/2 formamide déionisé). Par la suite, les lames ont été hybridées dans un tampon contenant 50% de formamide, 0.5% d'ADN de sperme de saumon (100µg/mL), du SSC 2X, du dextran sulfate 10%, une solution de Denhardt's 1X, 0.25% d'ARNt de levures (100µg/mL, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et la sonde d'ostéocrine couplée à un marquage radioactif ^{35}S (30ng/mL, généreusement donnée par le Dr Pierre Moffatt, de Phenogene Therapeutics). L'hybridation a été faite de 16 à 20 heures à 46°C dans une chambre humide. Les lames ont été traitées dans une solution de RNase-A à 10µg/mL, puis bloquées dans un tampon de blocage. L'anticorps anti-digoxigénine (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada, 1/500 de la solution-stock) a été utilisé pour la détection du marquage et le marquage a été révélé par la solution NBT/BCIP (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada). La contre-coloration a été faite à l'hématoxyline. Un contrôle négatif a été fait par hybridation avec la sonde sens dans les mêmes conditions d'expérimentations.

3.10. Immunohistochimie :

Les tissus tumoraux humains obtenus lors de biopsies ou de chirurgies ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4%, enrobés dans de la paraffine et sectionnés à l'aide d'un microtome (Leica RM2145, Richmond Hill, Ontario, Canada). Des sections de 5µm ont été montées sur des lames, déparaffinées dans le toluène et hydratées dans une série décroissante d'éthanol. Après blocage des sites de liaison non-spécifiques (par du sérum normal) et de l'activité de la peroxydase endogène, les sections de tissus ont été incubées avec soit 5 µg/ml de l'anticorps monoclonal anti-ET-1 (Research Diagnostic inc. Flanders, NJ), soit avec l'anticorps ET_A et ET_B (8µg/mL, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) ou encore avec l'anticorps MMP-2 et MMP-9 (2µg/mL, Oncogene Research Products, Hornby, Ontario, Canada) puis marquées avec la méthode du complexe avidine-biotine (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). La couleur a été développée avec le substrat diaminobenzidine (DAB) (Dako Diagnostics Canada Inc; Mississauga, ON, Canada) contenant du peroxyde d'hydrogène. Les lames ont été contre-colorées avec l'éosine (Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD) ou l'hématoxyline.

La spécificité du marquage a été évaluée par l'omission de l'anticorps primaire pour un même protocole.

3.11. Coloration des lames :

Pour la contre-coloration à l'éosine, les lames ont été trempées dans 3 bains successifs d'éthanol 100% pour une durée de 3 minutes par bain. Puis elles ont été submergées dans une solution d'éosine alcoolique (Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD) pendant 1 minute. Pour la contre-coloration à l'hématoxyline, les lames ont été trempées dans l'eau pendant 5 minutes. Puis elles ont été trempées dans l'hématoxyline (Harris Modified Hematoxylin, Fisher Scientifics, Nepean, Ontario, Canada) pendant 4 minutes. Elles ont ensuite été plongées 3 fois dans l'alcool-acide (99% d'éthanol 70% + 1% d'acide chlorhydrique) puis 3 plongées dans le carbonate de lithium (1%, dilué dans l'eau distillée) puis rincées dans l'eau courante.

3.12. Immunofluorescence :

Les cellules d'ostéosarcome MG-63 ont été cultivées dans des chambres sur lames jusqu'à 50% de confluence puis traitées avec de l'ET-1 (10nM), de la Big ET-1 (10nM) ou de l'IL-1 β (200pg/mL) pendant 24h ou avec de l'ET-1 pour différents temps (0, 10, 30, 60 et 180 minutes) à 37°C dans du DMEM à 2.5% de SVF. Les cellules ont été fixées dans une solution de méthanol 50% et d'acide acétique 50%. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps polyclonal anti-NF- κ B p65 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, dilution 0.2 μ g/mL) pendant 16 à 20 heures à 4°C. Les cellules ont été lavées dans du PBS puis incubées avec le FITC-conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1:100) pendant 1h à température pièce. Le marquage positif a été révélé par Alexa fluor probe 488 (marquage vert du cytoplasme) et DAPI (marquage nucléaire bleu). Les cellules ont été lavées, les lames montées avec du ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) et analysées par microscopie.

3.13. Test ELISA :

Le niveau protéique de la forme 1-31 de l'ET-1 a été déterminée dans les lysats cellulaire et les milieux de culture de cellules de MG-63, d'OS #1, d'OS #2 et d'OS #3 avec un test ELISA spécifique. Le test ELISA (Phoenix Bio-Tech Corp., Mississauga, Ontario) va spécifiquement déterminer la quantité totale de l'ET-1 (1-31) et non la forme (1-21) de l'ET-1. La sensibilité de ce test est de 1.56 pg/mL. Les résultats sont exprimés en pg par 5×10^5 cellules.

3.14. L'analyse statistique :

Les différences entre les groupes de données ont été comparées avec le test U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Les résultats ont été considérés significatifs pour une valeur de $p < 0.05$.

CHAPITRE 4. RÉSULTATS

4.1. Article

CONTRIBUTIONS À L'ARTICLE

J'ai personnellement effectué toutes les manipulations qui ont mené aux figures retrouvées dans l'article. J'ai également écrit la première version de l'article, version qui a été revue et corrigée par mon directeur de recherche, Dr Florina Moldovan.

Dr Marc Isler et Dr Robert Turcotte, en tant que chirurgiens orthopédiques, ont généreusement fait parvenir les tumeurs prélevées sur les patients à mon laboratoire de recherche. Ils ont également participé à l'écriture de l'article et ont fourni de précieux conseils pour son achèvement.

Dr Josée Doyon, en tant que pathologiste, a fourni au laboratoire de Dr Moldovan toutes les informations relatives aux types de tumeurs reçues de Dr Isler et Turcotte. Elle a fourni les tissus de tumeurs que j'ai utilisé à des fins histologiques.

Dr Alain Moreau, en tant que co-directeur, m'a fourni un support technique et scientifique dans le développement du projet de recherche qui a mené à l'élaboration de cet article.

Dr Florina Moldovan est à l'origine des hypothèses du projet de recherche. Son laboratoire a fourni tous les outils nécessaires à la réalisation des manipulations qui ont mené aux résultats de l'article. Elle a fourni l'encadrement nécessaire à la poursuite du projet. Elle a également participé à la conception et à l'achèvement de l'article.

ABSTRACT

This study investigates the effect of ET-1 and its precursor, Big ET-1, on MMP-2 and MMP-9 synthesis and activity in osteosarcoma tissue. Using Western Blot, zymography, RT-PCR, immunohistochemistry, immunofluorescence and Northern Blot, we show ET-1 and ET-1 receptors (ET_A and ET_B) are expressed in these cells. Additionally, we demonstrate that ET-1 markedly induces the synthesis and activity of MMP-2, which is significantly increased when compared to MMP-9. Furthermore, inhibition of NF- κ B activation blocked MMP-2 production and activity indicating the involvement of NF- κ B, a ubiquitous transcription factor playing a central role in the differentiation, proliferation and malignant transformation. Since ET-1 acts as an autocrine mediator through gelatinase induction, it could contribute to tumour growth and cell malignancy. Thus, targeting of ET-1 receptors could be an attractive therapeutic alternative for the successful treatment of osteosarcoma.

Key Words : osteosarcoma, endothelin-1, extra-cellular matrix, MMP-2, MMP-9, NF- κ B, ET_A, ET_B.

INTRODUCTION

Osteosarcoma is the most frequent primary bone malignancy and the third most common type of cancer among youngsters [24]; it develops mainly during adolescence, especially in boys, and is characterized by the production of osteoid by cancer cells. It shows a predilection for the metaphysis of the long bones most commonly at the distal femur, proximal tibia, proximal humerus and distal radius in decreasing order of frequency. Classic osteosarcoma demonstrates an aggressive and rapid growth with frequent findings such as skip metastases and early pulmonary metastases. Osteosarcoma treatment consists of a combination of multidrugs chemotherapy and surgery. There has been little progress over the last twenty years in survival figures for osteosarcoma. Cure rate is approximately 65 percent for patients with localized diseases. When presenting with metastases at the time of diagnosis, survival rate is 25 percent [8;24].

Osteosarcoma invasion involves the infiltration of neighbouring tissues surrounding the tumour as a consequence of abnormal cellular proliferation and for the development of metastases, the cancerous cells must degrade the components of the extra-cellular matrix (ECM). This crucial step in tumour progression involves matrix metalloprotease (MMPs) activity. Reich and Liotta, pioneers in this field of research, described the concept by stating that the proteolytic degradation of the matrix barrier is critical for tumour cell invasion and metastasis to distant sites [13;18]. A significant role in the cancerous progression was quickly allotted to the MMPs because of their capacity to degrade ECM, thus supporting tumour invasion.

This provided the rationale for clinical trials using MMP inhibitors, unfortunately with inconclusive results in the outcomes for osteosarcoma and other neoplasia [6]. This is probably due to the fact that the inhibitors were not employed in the early steps of cancer to prevent its progression [6]. Also, the MMP inhibitors used only had effects on MMPs activity but did not inhibit MMP synthesis.

Among all the MMPs, gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are recognized to be particularly involved in the degradation of the extracellular matrix components, such as collagen type IV and V, of cell basal membrane. In osteosarcoma tissue, both MMP-2 and MMP-9 are overexpressed in comparison to their expression in non-affected stroma tissue [6]. In the tumour microenvironment, the regulation of MMPs is crucial, and factors controlling this regulation appear to be even more important. According to recent studies, endothelin-1 (ET-1) is such a regulating factor [4].

Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor peptide, initially discovered in endothelial cells [4], that also plays a role in cell differentiation and migration. ET-1 promotes both mitogenesis and angiogenesis, and its overexpression by several cancer tissues and cells, including osteosarcoma cells, was previously demonstrated [7;16;17]. Increasing evidence points to ET-1 as a relevant mediator in tumour progression in a variety of malignancies. High plasmatic levels of ET-1 were found among patients with various solid tumours [7;16;17], where ET-1 levels were higher among patients with metastasis. As well, many cancer cell lines showed an *in vitro* synthesis of ET-1 [1;10]. This phenomenon was also reflected *in vivo* where an increase in immunoreactivity for ET-1 was demonstrated in several types of cancer [4;22;26]. These findings suggest that the modulation

of ET-1 is involved in the tumour process. Recently, it was also shown that ET-1 acts as a MMP inducer [19], which may facilitate the invasion of various tumours. Among the MMPs, gelatinases were suggested to be predictive markers for the clinical outcome of affected patients. Indeed, gelatinase B (MMP-9) was suggested as a prognostic factor for development of metastasis in high-grade osteosarcoma [4].

MMPs in the tumour microenvironment appear crucial and factors controlling their regulation are even more important in determining prognosis. Therefore, in this study, the role of ET-1, its receptors, and gelatinases expression were explored in osteosarcoma cells as well as in human osteosarcoma tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture: MG-63, Saos-2, MNNG/HOS, SJSA-1 (osteosarcoma cell lines) and SK-ES-1 (Ewing sarcoma cell line) (purchased from American Type Culture Collection, Manassas, VA), as well as eight primary cell culture derived from human osteosarcoma tissues obtained intraoperatively (as described in Table I) were investigated in this study. Tissues were collected with the consent of patients approved by Institutional Ethics Committee Board of Sainte Justine Hospital in Montreal. Tissues were incubated in culture media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (foetal calf serum; Hyclone, Logan, UT), 100units/ml of penicillin (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) and 100µg/ml of streptomycin (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂, 95% air from which primary cells were derived. The

cells were then plated in tissue culture flasks (25cm²) and cultured until confluence was reached. Twenty-four hours before cell stimulation, the cells were incubated in serum-free culture media. The cells were incubated with ET-1 (10nmol), Big ET-1 (10nmol) and IL-1 β (200pg/mL) (all from Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and pyrrolidine carbodithioic acid (PDTC) (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego) from 0-10 μ M in DMEM containing 2.5% FCS for various lengths of times (24 h for RT-PCR, Northern Blot and Western Blot investigation and 5 min, 30 min and 4 h for the NF- κ B determination).

No	Age/Sex	Primary Site	Histological Subtype	Grade	Diagnosis
1	6/M	Left Tibia	Osteogenic Osteosarcoma	4/4	Osteogenic Osteosarcoma
2	14/F	Right Proximal Tibia	Osteogenic Osteosarcoma	4/4	Osteogenic Osteosarcoma
3	15/F	Left Distal Femur	Osteogenic	4/4	Osteogenic Osteosarcoma
4	46/M	Right Pelvis	Chondrosarcoma	N/A*	Chondrosarcoma on osteochondroma
5	11/F	Left Proximal Tibia	Osteochondromatose	N/A	Osteochondromatose with tibial exostose
6	14/F	Right Proximal Tibia	Osteosarcoma	4/4	Osteosarcoma
7	60/M	Left Proximal Fibula	Chondrosarcoma	N/A	Chondrosarcoma
8	46/M	Left Vertebra L1	Chondrosarcoma	N/A	Chondrosarcoma

* Not Applicable

Table I: Characterisation of primary cell culture derived from human osteosarcoma tissues obtained intraoperatively

RNA extraction: Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) as previously described [20] and processed according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was quantified by the RiboGreen method [9].

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): For RT-PCR, 1 μ g of total RNA was used and the reverse transcription and polymerase chain reaction were carried out as described by Lange et al [12]. The ET-1 primers used were as follows: forward primer 5'-GTCAACACTCCCGACCACGTT-3' and reverse primer 5'-CTGGTTTGTCTTAGGTGTTCCCTC-3' and they yielded an amplified product of 304 bp. The GAPDH primers used were as follows: 5' CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' for the forward primer and 5' GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3' for the reverse primer. The PCR reaction was carried out as for the ET-1 PCR. The GAPDH transcript is 319 bp long. The ET_A primers used were as follows: forward primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and reverse primer 5'-TCAACATCTCACAAGTCATGAG-3' and they yielded and amplified products of 383 bp. For the ET_B receptors, the primers used were as follows : forward primer 5'-TTGGAGCTGAGATGTGTAAGC-3', and for the reverse primer 5'-CAGTGAAGCCATGTTGATACC-3'; they yielded and amplified products of 450 bp. Negative control was achieved by omission of primer.

Western Blot: MG-63 cells were lysed in 0.2ml of boiling SDS (Sodium Dodecyl sulphate). The protein concentration of the lysate was determined with the Bradford dye assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For Western Blot, the supernatant or 10 μ g of lysate protein were

electrophoresed on a 10% SDS discontinuous gradient polyacrylamide gel and transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane (Hybond C extra; Amersham, Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK). The membranes were immersed overnight in the Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL). They were then rinsed and incubated for 24 h at 4°C with antibodies specifically recognizing: 1) MMP-2 (dilution : 0.1µg/mL); 2) TIMP-1 (dilution : 0.1µg/mL); 3) TIMP-2 (dilution : 0.1µg/mL) (all from Oncogene Research Products, San Diego, CA) and 4) NF-κB p65 (0.2µg/mL, from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Following incubation with the primary antibody, membranes were carefully washed and reincubated for 1 h at room temperature with a secondary antibody. Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (POD) conjugated, dilution 1/40 000 was used for the detection of the MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2, and anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase (POD) conjugated, dilution 1/40 000 was used for the detection of NF-κB p65. After careful washing, detection was performed using the Super Signal Ultra Western blot chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL).

Northern Blot: After RNA extraction, 5µg of total RNA were resolved on 1.2% formaldehyde-agarose gel and transferred electrophoretically to a nylon membranes (Hybond-N; Amersham, Oakville, ON, Canada) in a 10mM sodium acetate buffer (pH 7.8) containing 20 mM Tris and 0.5mM EDTA overnight at 4°C. The RNA was cross-linked to the membrane by exposure to ultraviolet light. After prehybridization for 24 h, hybridization was carried out at 68°C with MMP-2 and MMP-9 RNA probes. The RNA probes were transcribed and labelled with digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (DIG-11 UTP) (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's specifications. Detection was carried out by chemiluminescence with CDP

substrate (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) and revealed by exposure to Kodak X-AR5 film (Eastman Kodak, Rochester NY). After the first hybridization, the membrane was stripped and rehybridized with a digoxigenin-labelled probe specific to glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) RNA which served as a housekeeping gene. The autoradiographs were scanned with the ChemiImager 4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) imaging system.

Gelatin Zymography: Gelatinase activity was assayed by zymography analysis according to Xu et al, 2001.[25] Briefly, culture media were run on 10% SDS-PAGE gel containing 1 mg/mL gelatin. The gel was washed twice in 2.5% Triton X-100 solution and was incubated overnight at 37°C in developing buffer (Tris-HCl 50mmol/L, pH 7.4, CaCl₂ 10mmol/L, ZnCl₂ 5mmol/L, and 0.05% Brij-35), then stained with 0.5% Coomassie blue and destained in a 40% methanol/10% acetic acid solution.

Immunohistochemistry: Briefly, specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 µm) of paraffin-embedded specimens were de-paraffinized in toluene and hydrated in a degraded series of ethanol. The tissue sections were incubated with 5µg/ml of monoclonal anti-ET-1 antibody (Research Diagnostic inc. Flanders, NJ), ET_A and ET_B antibody, (8µg/mL, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and MMP-2 and MMP-9 antibody (2µg/mL, Oncogene Research Products, San Diego, CA) and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). The colour was developed by diaminobenzidin (DAB) (Dako Diagnostics Canada Inc; Mississauga, ON, Canada) containing hydrogen peroxide, and the slides were counterstained with eosin (Digene Diagnostics Inc., Silver

Spring, MD). The specificity of staining was evaluated by omission of the primary antibody following the same experimental protocol.

Immunofluorescence: The osteosarcoma (MG-63) cells were grown in monolayer on glass slides (Nagle Nunc International, Naperville, IL) and then treated with ET-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) 10nmol, Big ET-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) 10 nmol or IL-1 β (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) 200pg/mL at 37 C for a period of 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium SVF 2.5%. The cells were fixed in a solution of methanol 50% and acetic acid 50% for 10 min. The fixed cells were incubated with rabbit polyclonal anti-NF- κ B p65 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), dilution: 2 μ g/mL, overnight at 4°C. The cells were washed and incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:100 dilution) for 1 h at room temperature. The cells were washed, mounted with cover slips using ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR), and analyzed using a confocal microscope. Positive staining was revealed by Alexa fluor probe 488 for green cytoplasm staining and DAPI for blue nuclear staining.

Statistical analysis: Statistical significance was assessed by Mann-Whitney U-test and $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Expression and synthesis of ET-1 and ET-1 receptors (ET_A and ET_B) in human osteosarcoma:

The presence of ET-1 was demonstrated in both osteosarcoma cells and tissues. In osteosarcoma

tissues, ET-1 protein was immunolocalized by immunohistochemistry (**Fig. 1a**). All the investigated tissues (n=4) showed specific immunoreactivity. Positive staining was observed preferentially in matrix localized cells with osteoblastic phenotype. In osteosarcoma cells, using RT-PCR, specific mRNA coding for ET-1 (**Fig. 1b**) was found in all cell lines investigated, except MNNG/HOS, as well as in cells derived from biopsy tissue as illustrated in **Figure 1d**, OS#1 to OS#8. Immunolocalization of ET-1 receptors (ET_A and ET_B) was illustrated in **Figure 2**. In osteosarcoma tissues 49% \pm 10.57 of the cells were positives for ET_A, and only 11.5% \pm 7.3 of positive cells were detected for ET_B ($P<0.005$). Positive staining for ET_B receptors was principally observed in vascular cells. Using RT-PCR, specific mRNA coding for ET_A (**Fig. 3a**) were found in all investigated cells (except for OS#8). However, as illustrated in **Figure 3b**, (line 3 to 5), specific mRNA coding for ET_B were detected only in MG-63, SK-ES-1 and SJSA-1 for the commercial cell lines and in OS# 2, 4, 7 and 8.

MMP-2 and MMP-9 expression is increased in human osteosarcoma tissues by ET-1: To assess the importance of ET-1 and gelatinases in osteosarcoma, we analyzed basal expression of MMP-2 and MMP-9 as well as the effect of ET-1 on MMP-2 and MMP-9 synthesis. The effects of ET-1 were explored at the level of mRNA and enzymatic activity. Basal expression of MMP-2 and MMP-9 in osteosarcoma tissue was demonstrated in **Figure 4**. By immunohistochemistry, we detected 81% \pm 18.7 of cells positive for MMP-2 and only 3.67% \pm 1.53 of cells positive for MMP-9 ($P<0.05$). As illustrated in **Figure 5**, mRNA transcripts for MMP-2 and MMP-9 activity were detected in both stimulated and non-stimulated osteosarcoma cells. In **Figure 5**, we demonstrated by Northern Blot, a similar increase of expression for MMP-2 and MMP-9 in ET-1 stimulated cells.

By zymography, we found that ET-1 acts as an inducer of both MMP-2 and MMP-9. Induction of the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 by ET-1 was observed for both latent and active forms of MMP-2 and MMP-9. In **Figure 6**, we observed that the enzymatic activity corresponding to MMP-2 was increased when compared to MMP-9. This could be explained by the fact that MMP-2 is physiologically expressed by the stroma cells of many tissues and conversely, MMP-9 expression is weak or absent in normal tissue, and induced and secreted in case of tissue turnover such as tumour invasion [5].

NF- κ B inhibition down-regulates ET-1-induced MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in osteosarcoma cells: NF- κ B is a ubiquitous transcription factor that regulates MMP gene activation [23]. In **Figure 6**, we showed that ET-1-induced MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 are modulated by PDTC in a dose dependent manner, thus, indicating the involvement of this factor in MMP induction by ET-1. Therefore, the effect of the inhibition of NF- κ B by PDTC on the expression of MMP-2 as well as TIMP-1 and TIMP-2 was investigated. It was noted that ET-1, as mentioned earlier, induces MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 and that increasing doses of PDTC inhibits MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 expression (**Fig. 6**).

ET-1 up-regulates NF- κ B (p65 unit) and causes NF- κ B translocation to the nucleus in osteosarcoma cells: To assess the effect of ET-1 on the expression of NF- κ B p65, osteosarcoma cells (MG-63) were treated with ET-1. Using a specific NF- κ B p65 antibody, its protein expression was determined by Western blot. As illustrated in **Figure 7**, exposing the MG-63 cells to ET-1 (10nM) and to its precursor Big ET-1 (10nM) induces the p65 unit of transcription factor NF- κ B. In

other experiments, the osteosarcoma cells (MG-63) were treated with ET-1 (10nM), Big ET-1 (10nM) or IL-1 β (200pg/mL) for 24 h in basal medium. **Figure 8** shows that ET-1, Big ET-1 and IL-1 β (used as a positive control) induced translocation of the p65 unit of transcription factor NF- κ B into the nucleus. In the control cells, the majority of p65 staining resides in the cytoplasm (panel a). A nuclear accumulation of p65 is observed in the treated cells (panel b, c, f), thus conferring a role to ET-1 and its precursor in p65 activation.

DISCUSSION

The present study shows that ET-1 has an inductive effect on two MMPs, MMP-2 and MMP-9, which are among the most important MMPs involved in ECM degradation, a process which leads to tumour invasion. As ECM remodelling is a major event in osteosarcoma invasion, these results provide evidence of the importance of ET-1 in osteosarcoma malignancy.

The role of ET-1 in the tumour process may occur in various ways: 1) by facilitating growth of cancerous cells (mitogenesis effect); 2) by protecting cancerous cells from apoptosis; 3) by promoting angiogenesis; and 4) by supporting tumour progression and metastasis [4]. Rosano [19] showed that ET-1 induces the secretion and activation of various MMPs, such as MMP-2, 9, 3, 7, 13 and MT1-MMP, in ovarian carcinoma cells [19]. These results correlate with our findings in which we demonstrate that ET-1 induces MMP-2 and MMP-9 in osteosarcoma cells. Bagnato et al also showed that ET-1 inhibits secretion of TIMP-1 and TIMP-2 (MMP Tissue Inhibitor), thus modifying the MMP/TIMP ratio prevailing under physiological conditions. The regulation of MMPs by TIMPs is a significant factor controlling ECM catabolism, and modifications of this regulation

are responsible for several pathological states, particularly cancer [5]. Rosano et al did not observed a TIMP induction by ET-1 [19], while in the present study, it was found that in osteosarcoma cells, ET-1 acts as an inducer of both TIMP-1 and TIMP-2. This can be explained by the fact that TIMPs play a dual role: they do not only bind to the active form of MMPs to inhibit their proteolytic activity, but they can also bind to the proform of some MMPs to facilitate enzyme activation [11]. Indeed, TIMP-1 forms a preferential complex with proMMP-9, and TIMP-2 forms a preferential complex with proMMP-2 [11;15;21]. Thus a vicious circle is created: ET-1 induces MMPs, which in turn induce the formation of ET-1, including the alternative forms, such as ET-1 (1-32). This allows us to propose the dual inhibition, on one hand, of ET-1 and on the other hand, of the MMPs in order to diminish the invasiveness of osteosarcomas.

Originally, MMPs were considered to be important almost exclusively in tumour invasion and metastasis; however, recent studies show that MMPs play a crucial role in generating growth-promoting molecules and signalling factors. Among these, transcription factor, NF- κ B could play a critical role. The action of ET-1, which leads to a significant increase of the MMPs, could be connected to the activation of the transcription factor NF- κ B. NF- κ B is a ubiquitous transcription factor, the basal signalling of which is enhanced in cancer cells. NF- κ B plays a central role in the process of differentiation and cellular proliferation and could also have a role in the transformation of cancer cells to a malignant state. NF- κ B is activated by many stimuli and could constitute a point of convergence between the various mechanisms leading to tumour progression. The present study demonstrates that ET-1 and Big ET-1 are among the stimuli activating NF- κ B (Figure 7). In the literature, it was shown that NF- κ B up-regulates MMP-9 and down-regulates TIMP-1 [2]. NF- κ B is

also important for the regulation of many genes involved in matrix degradation. Among these, MMPs play a central role in matrix degradation. As well, the present study shows that the use of an NF- κ B inhibitor (PDTC) inhibits MMP-2 expression. These results correlate with the observations of Meyer [14], who showed a down-regulation of MMP RNA expression when using PDTC. This leads one to believe that PDTC is an efficient inhibitor of MMP induction by NF- κ B, which is also induced by ET-1 and its immediate precursor.

In conclusion, the present study demonstrated MMP-2 and MMP-9 induction by ET-1 in osteosarcoma cells and human osteosarcoma tissues, and showed a critical role for NF- κ B transcription factor in this activity. We also proved that ET-1, as well as the two ET-1-specific receptors, are expressed *ex vivo* in human osteosarcoma tissues. ET-1 has been previously detected in canine osteosarcoma tissues. Additionally, MMPs, including, MMP-2 and MMP-9, were also found in these tumours. These molecules (ET-1 and MMP) are also present in normal cells (including normal osteoblasts). In accordance with these findings, it appears reasonable to attribute a predominant role to the presence or absence of the ET-1 receptors rather than ET-1 itself. Being that ET_B receptors have a recycling role, ET_A would be a more significant target. Indeed, there is evidence demonstrating the antitumoural activity of endothelin receptor antagonists in combination with other tumour inhibitors [3]. As interactions between ET-1, MMPs and the TIMPs play a major role in tumour invasion, the ET-1 axis could be an attractive target in the development of new therapies against bone tumours such as osteosarcoma.

Acknowledgments : This work was supported by grants from the Canadian Orthopaedics Foundation Award 2004, Mentor, a Canadian Institutes of Health Research program. Dr Moldovan is the recipient of a scholarship from the FRSQ. The authors thank Fazool Shipkolye for his technical assistance.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ET-1 protein and gene expression in osteosarcoma cell lines and primary cell culture derived from osteosarcoma tissue. a) b) and c) Immunohistochemical detection of ET-1 in osteosarcoma tissue. Representative samples of osteosarcoma specimens (n=4) stained with specific ET-1 antibody (dilution 5 μ g/ml). The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. There is intense immunoreactivity in the osteoblasts but no staining on the extracellular matrix. The slides were counterstained with eosine. (Magnification X 200). d) Reverse-transcription polymerase chain reaction for ET-1 gene expression in bone tumor cells (n=4). The cells were cultured for 24 h at 37°C in 2.5% SVF media. PCR products for ET-1 (304bp) and GAPDH (319bp) were visualized by ethidium bromide.

Figure 2. ET_A and ET_B expression in bone cancer tissue. Immunohistochemical detection of a) ET_A b) ET_B in osteosarcoma tissue and c) negative control. Representative samples of osteosarcoma specimens (n=4) stained with specific ET_A and ET_B antibody (dilution: 8 μ g/mL). The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. In figure D, the percentage of positive cells is 49% \pm 10.57 for ET_A and 11.5% \pm 7.3 for ET_B, thus allowing a predominance of ET_A immunodetection compared to ET_B (p<0.005). The slides were counterstained with eosine. (Original Magnification X 200).

Figure 3. ET_A and ET_B mRNA expression in osteosarcoma cells. Reverse-transcription polymerase chain reaction for a) ET_A and c) ET_B gene expression in bone tumour cells (n=4). The

cells were cultured for 24h at 37°C in 2.5% SVF media. PCR products for ET_A (383bp), ET_B (450bp) and GAPDH (319bp) were visualized by ethidium bromide. ETA mRNA is present in every cell type except for OS#8. ETB mRNA is present in MG-63, SK-ES-1, OS#2 and OS#7 and slightly present in SJS-1, OS#4 and OS#8.

Figure 4. Gelatinase protein expression in bone cancer tissue. Immunohistochemical detection of a) MMP-2 and b) MMP-9 in osteosarcoma tissue. Representative samples of osteosarcoma specimens (n=4) stained with specific MMP-2 and MMP-9 antibody (dilution: 2µg/mL). The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. c) There is a predominance of MMP-2 immunodetection (81%±18.7 of cells were positive), which is highly expressed compared to MMP-9 which was detected in only 3.67%±1.53 of cells (p<0.05). The slides were counterstained with hematoxylin (Original Magnification X 200).

Figure 5: Effect of ET-1 on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression and activation in the osteosarcoma cell line. a) Representative Northern Blot of matrix metalloprotease-2 (MMP-2), MMP-9 and GAPDH mRNA in osteosarcoma (MG-63) cells. The cells were cultured for 24 h at 37°C in 2.5% FCS in the presence or absence of ET-1 (10nmol). Total RNA (5µg/lane) extracted from untreated cells (control) or treated cells (10nmol of ET-1) were analysed with a MMP-2 and MMP-9 specific probe by Northern Blotting. The membrane was also hybridized with a GAPDH probe as a control for RNA loading. c) The gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was detected in media from osteosarcoma cells (MG-63) cultured 24 h at 37°C in 2.5% FCS in the presence or absence (control) of ET-1 (10nmol) by SDS-PAGE gelatin zymography.

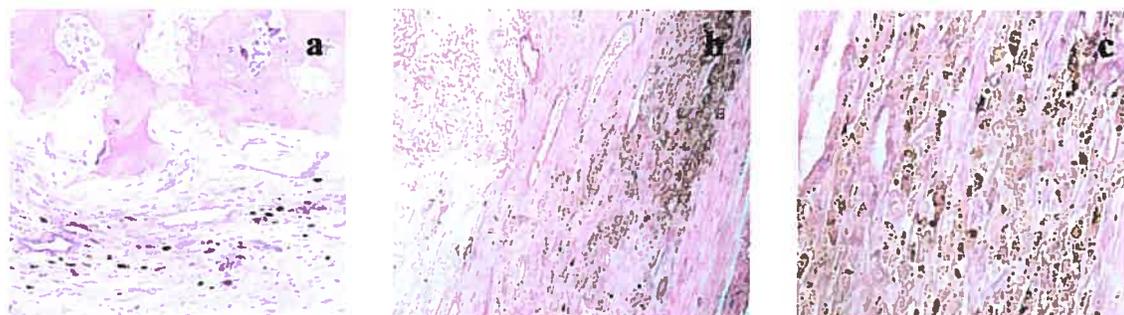
Figure 6: Effect of PDTC on MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 expression and on gelatinases activation in an osteosarcoma cell line. Effect of PDTC on the expression of a) MMP-2 (dilution : 0.1µg/mL), b) TIMP-1 (dilution : 0.1µg/mL) and c) TIMP-2 (dilution : 0.1µg/mL) using specific antibodies. MG-63 cells were treated with doses of PDTC (from 0-10µM) for 30 minutes and then ET-1 (10nmol) was added. Cells were cultured for 24 hours at 37°C in 2.5% FCS and conditioned media was assayed by Western immunoblotting using specific antibodies. An induction by ET-1 of

MMP-2 and TIMP-1 and 2 was detected. An inhibition of their expression was also revealed with increasing doses of PDTC. d) Enzymatic activity of MMP-2 and 9 identified by gelatin zymography using conditioned media from MG-63 cells. A similar pattern of inhibition was shown for MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 expression and correlated with gelatinase enzymatic activity.

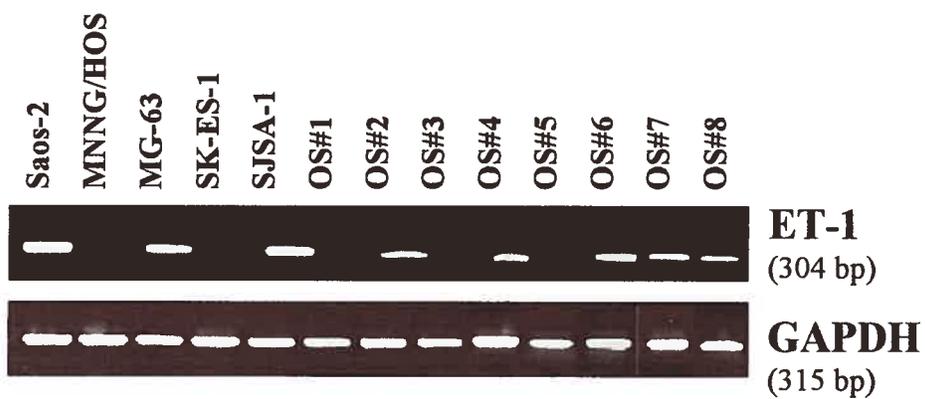
Figure 7: Effect of ET-1 and Big ET-1 on the expression of NF- κ B p65 in an osteosarcoma cell line. Osteosarcoma cells (MG-63) were treated with a) ET-1 (10nM) or b) Big ET-1 (10nM) for 0, 5 min., 30 min. or 240 min. and cultured at 37⁰C in 2.5% FCS. The cell lysates were extracted using boiling 0.5% SDS and were analysed by Western immunoblotting using a specific anti-NF- κ B p65 antibody (dilution 0.2 μ g/mL).

Figure 8: Effect of ET-1, Big ET-1 and IL-1 β on cellular localization of p65 subunit of NF- κ B in osteosarcoma cells. MG-63 cells were plated in covered glass chamber slides, treated with IL-1 β , ET-1 or Big ET-1 for 24 h. After stimulation cells were investigated by immunofluorescence for NF- κ B p65 unit immunoreactivity. Positive staining was revealed by Alexa fluor probe 488 (green staining). The blue fluorescence represents DAPI nuclear stain double-strand DNA. a) control (cells cultured in media without ET-1 or Big ET-1); b) IL-1 β (10nM)) treated cells; c) ET-1 (10nM) treated cells; d) Big ET-1 (10nM) stained with NF- κ B p65 unit without DAPI counterstaining; e) DAPI nuclear counterstaining; f) Big ET-1 (10nM) stained with both NF- κ B p65 unit and DAPI (nuclear counterstaining).

Figure 1



d



e

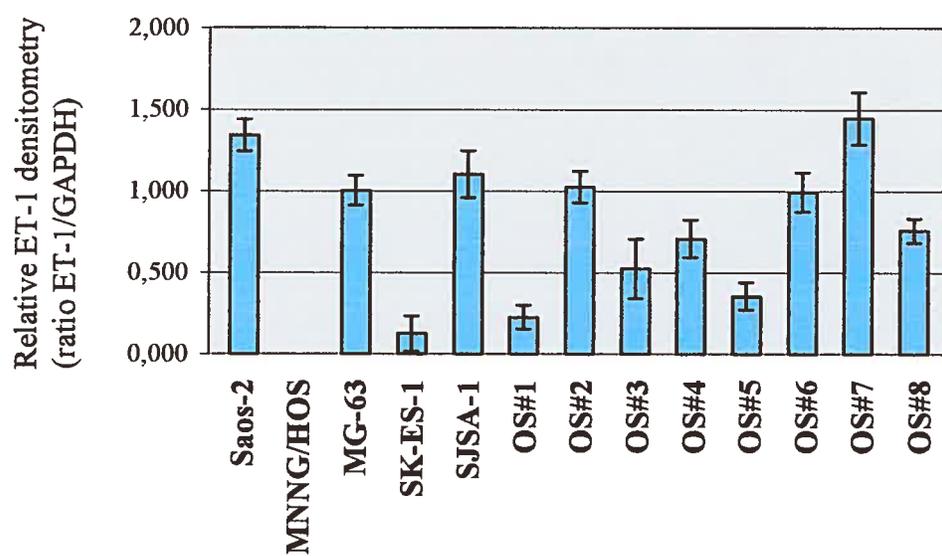


Figure 2

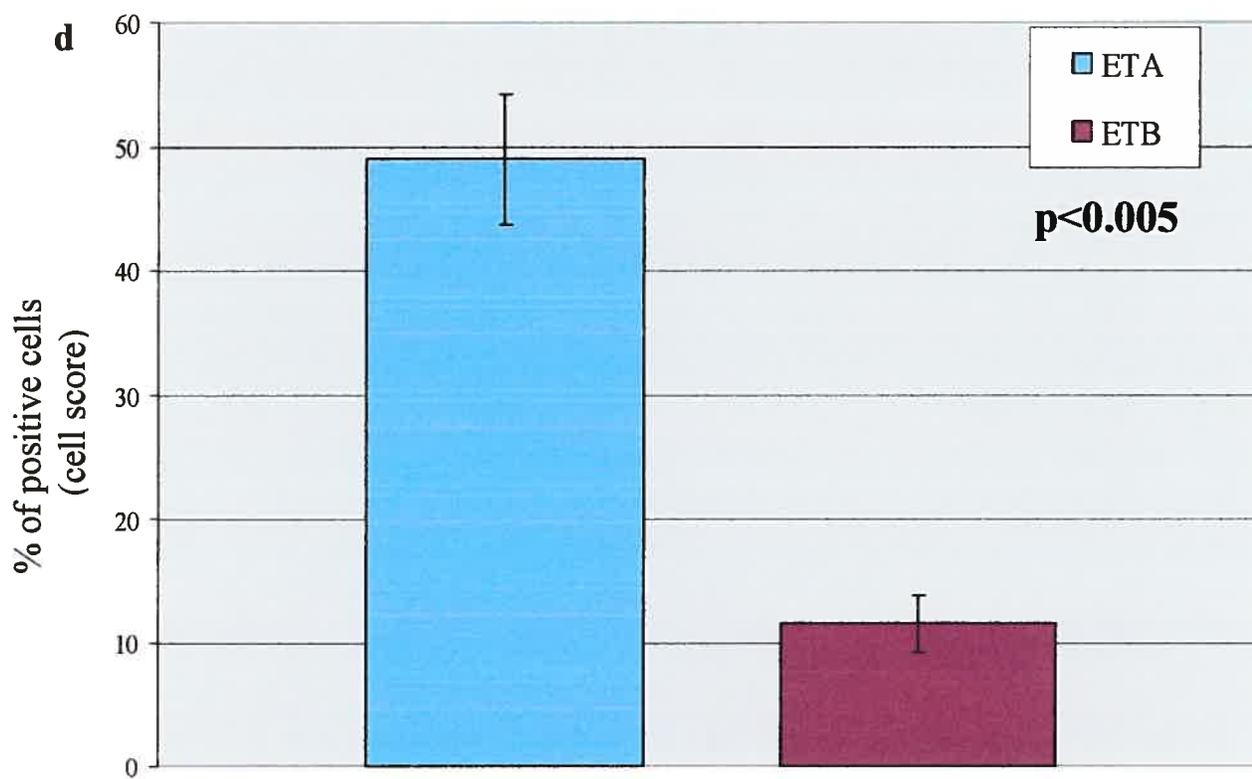
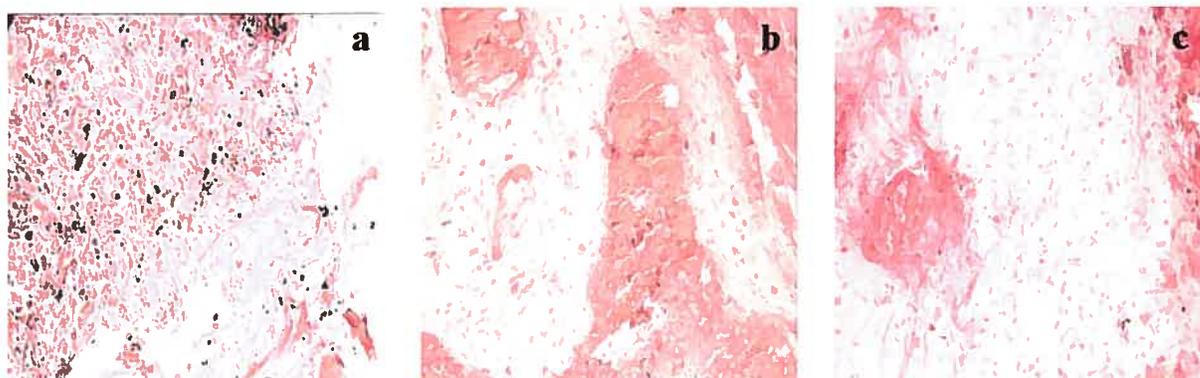


Figure 3

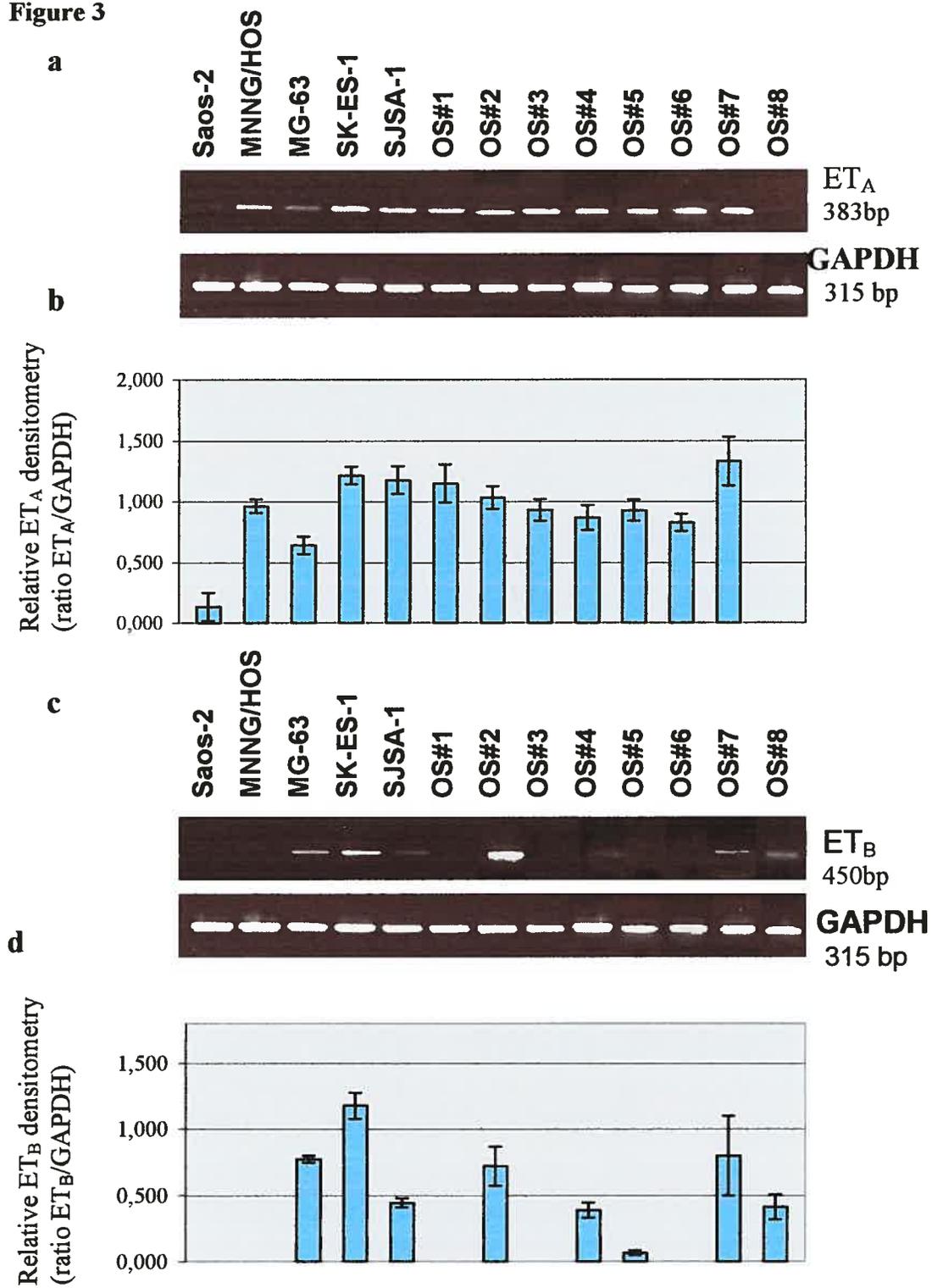


Figure 4

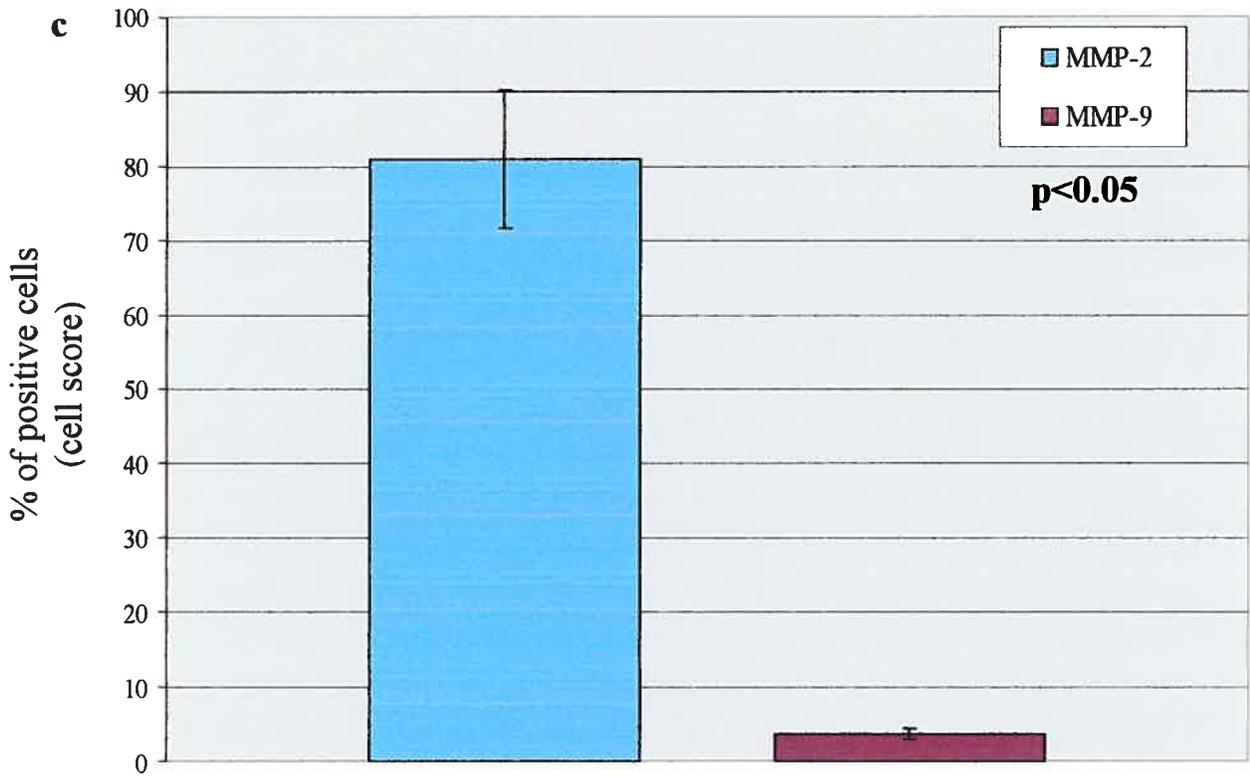


Figure 5

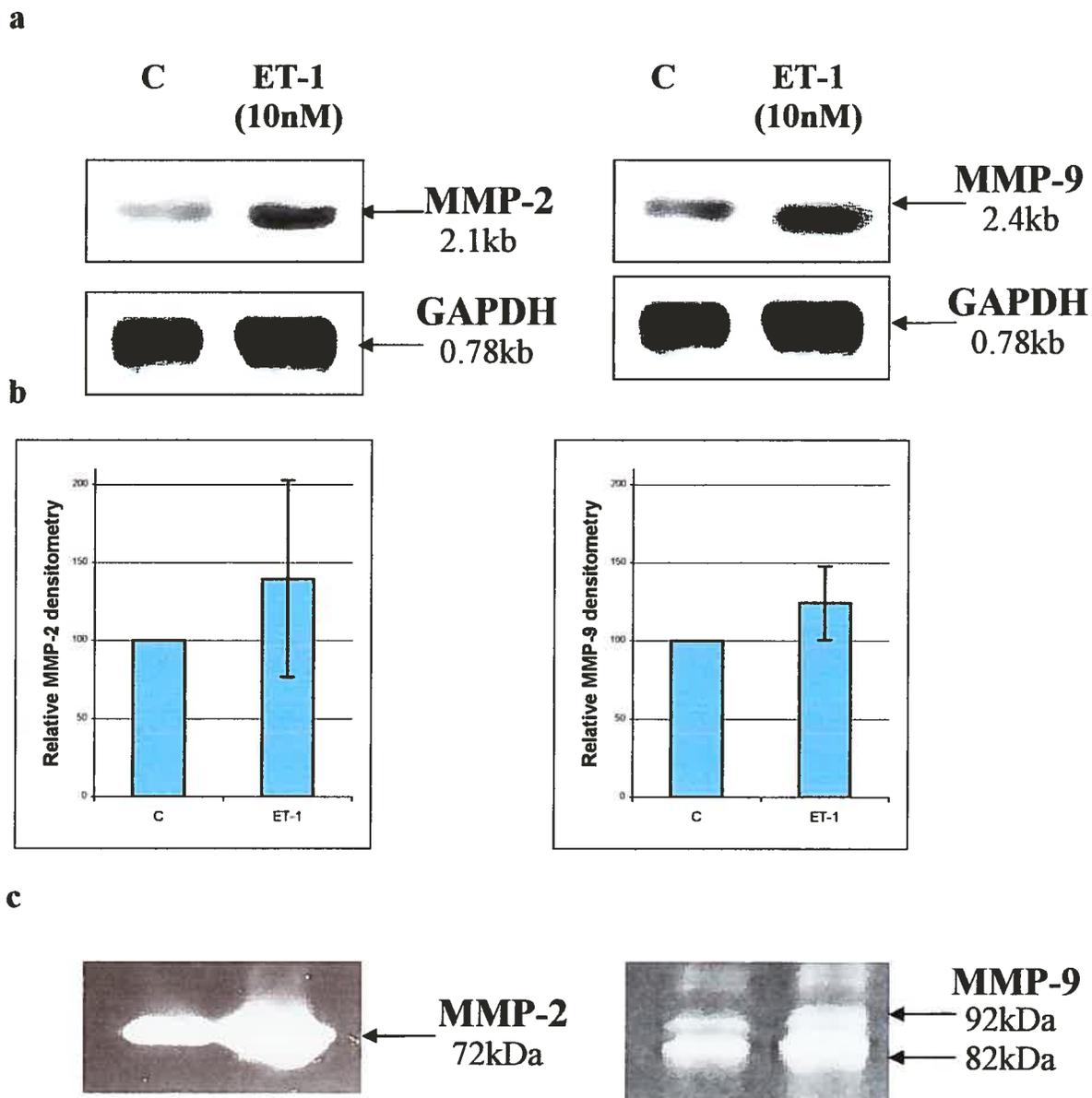


Figure 6

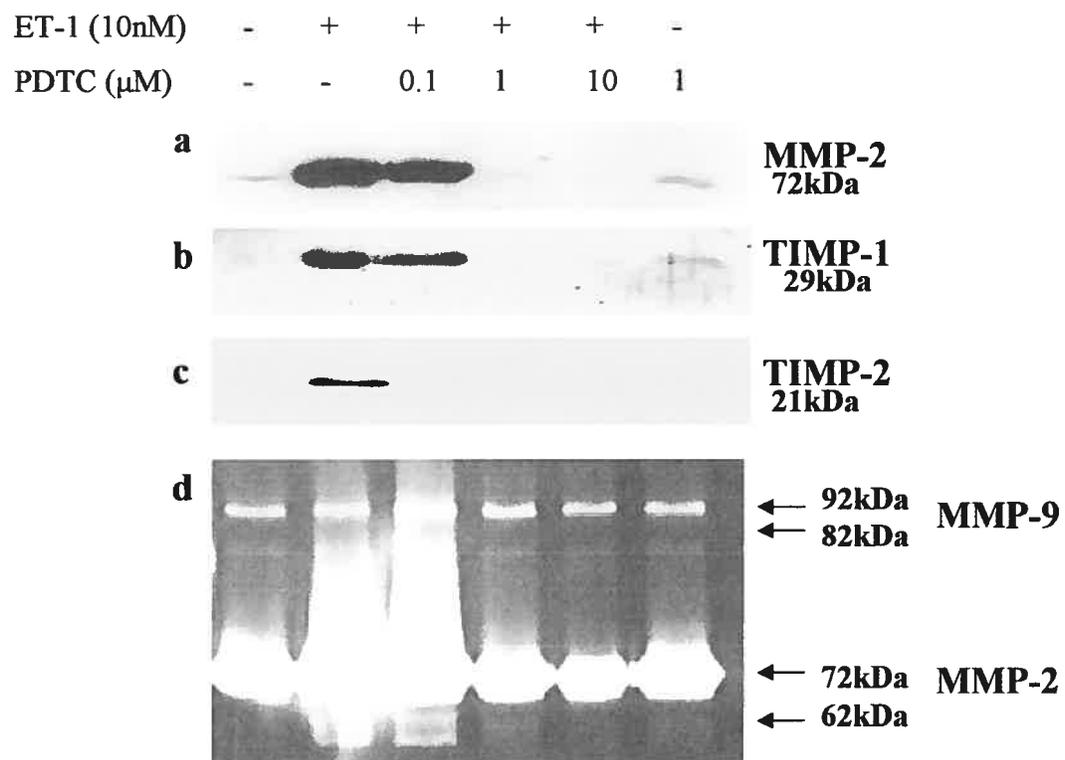


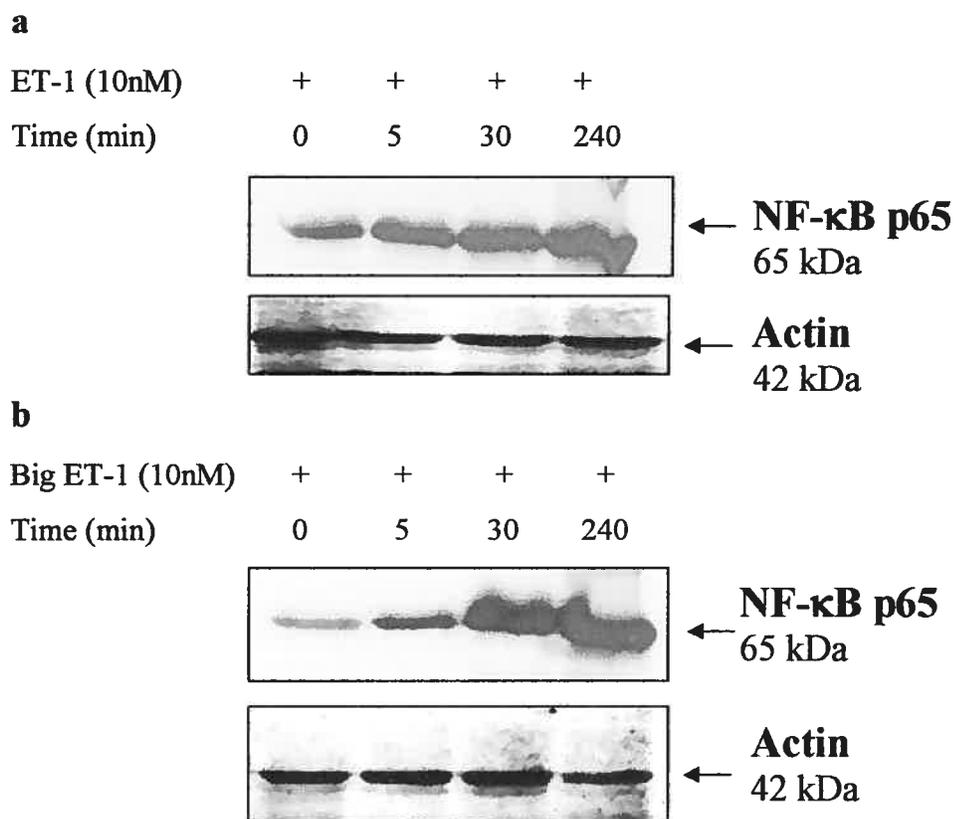
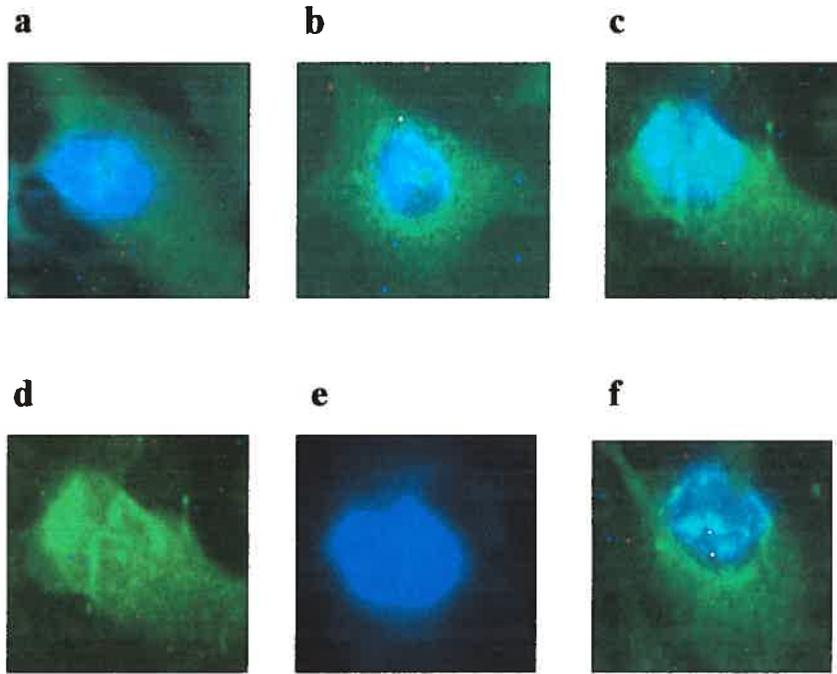
Figure 7



Figure 8



Reference List

1. Ali,H., Dashwood,M., Dawas,K., Loizidou,M., Savage,F. and Taylor,I. (2000) Endothelin receptor expression in colorectal cancer. *J Cardiovasc.Pharmacol* **36**, S69-S71.
2. Andela,V.B., Gordon,A.H., Zotalis,G. et al. (2003) NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin.Orthop.* S75-S85.
3. Bagnato,A. and Natali,P.G. (2004) Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treat.Res.* **119**, 293-314.
4. Bagnato,A., Salani,D., Di,C., V et al. (1999) Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res.* **59**, 720-727.
5. Chantrain,C. and DeClerck,Y.A. (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Médecine/Science* **18**, 565-575.
6. Egeblad,M. and Werb,Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 161-174.
7. Ferrari-Bravo,A., Franciosi,C., Lissoni,P., Fumagalli,L. and Uggeri,F. (2000) Effects of oncological surgery on endothelin-1 secretion in patients with operable gastric cancer. *Int.J Biol Markers* **15**, 56-57.
8. Gorlick,R., Anderson,P., Andrulis,I. et al. (2003) Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin.Cancer Res* **9**, 5442-5453.
9. Jones,L.J., Yue,S.T., Cheung,C.Y. and Singer,V.L. (1998) RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal.Biochem.* **265**, 368-374.
10. Kusuhara,M., Yamaguchi,K., Nagasaki,K. et al. (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **50**, 3257-3261.
11. Lambert,E., Dasse,E., Haye,B. and Petitfrere,E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **49**, 187-198.

12. Lange, M., Pagotto, U., Hopfner, U. et al. (1994) Endothelin expression in normal human anterior pituitaries and pituitary adenomas. *J Clin. Endocrinol. Metab* **79**, 1864-1870.
13. Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. and Shafie, S. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67-68.
14. Meyer, M., Schreck, R. and Baeuerle, P.A. (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **12**, 2005-2015.
15. Morrison, C.J., Butler, G.S., Bigg, H.F., Roberts, C.R., Soloway, P.D. and Overall, C.M. (2001) Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* **276**, 47402-47410.
16. Nakamuta, M., Ohashi, M., Tabata, S. et al. (1993) High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J Gastroenterol.* **88**, 248-252.
17. Nelson, J.B., Hedican, S.P., George, D.J. et al. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med* **1**, 944-949.
18. Ossowski, L. and Reich, E. (1983) Changes in malignant phenotype of a human carcinoma conditioned by growth environment. *Cell* **33**, 323-333.
19. Rosano, L., Varmi, M., Salani, D. et al. (2001) Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* **61**, 8340-8346.
20. Roy-Beaudry, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. et al. (2003) Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13 induction. *Arthritis Rheum.* **48**, 2855-2864.
21. Sounni, N.E., Janssen, M., Foidart, J.M. and Noel, A. (2003) Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* **22**, 55-61.
22. Suzuki, T., Hoshi, N., Watanabe, K., Kasukawa, R. and Suzuki, T. (1998) Immunohistochemical localization of endothelin-1/big endothelin-1 in normal liver, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Fukushima J Med Sci.* **44**, 93-105.
23. Tsuruda, T., Costello-Boerrigter, L.C. and Burnett, J.C., Jr. (2004) Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail. Rev.* **9**, 53-61.

24. Wittig,J.C., Bickels,J., Priebat,D. et al. (2002) Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am.Fam.Physician* **65**, 1123-1132.
25. Xu,P., Wang,Y., Piao,Y. et al. (2001) Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol.Reprod.* **65**, 240-246.
26. Yamashita,J., Ogawa,M., Inada,K., Yamashita,S., Matsuo,S. and Takano,S. (1991) A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res.Commun.Chem Pathol.Pharmacol* **74**, 363-369.

4.2. AUTRES RÉSULTATS

4.2.1. Translocation du NF- κ B du cytoplasme au noyau en fonction du temps de stimulation par l'ET-1.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à déterminer le rôle que l'ET-1 joue dans l'activation du NF- κ B. Il est connu que le NF- κ B est présent au niveau des cellules dans un complexe inactif qui se situe au niveau du cytoplasme. Lorsqu'activé, par un stimulus tel, l'endothéline-1, une série d'étapes se produisent pour libérer le NF- κ B de ce complexe et sa translocation à l'intérieur du noyau se produit. C'est à ce niveau que le NF- κ B peut jouer son rôle d'activateur de gènes, tels les métalloprotéases. Ainsi, par immunofluorescence et avec un anticorps reconnaissant spécifiquement le NF- κ B p65, nous avons observé lors du contrôle, qu'il y avait davantage de marquage vert, marquage représentant le cytoplasme signifiant que le NF- κ B est davantage présent à ce niveau. Après stimulation par l'ET-1, nous observons une diminution du marquage vert pour voir apparaître une augmentation du marquage bleu, marquage représentant le noyau des cellules. Le marquage bleu est de plus en plus prédominant avec les temps de stimulation plus longs, ce qui signifie que l'ET-1 induit la translocation du NF- κ B à l'intérieur du noyau de manière temps-dépendante à l'intérieur des cellules d'ostéosarcome. Comme le NF- κ B a un rôle reconnu d'inducteur de l'expression des MMP (Philip et al, 2001), il devient pertinent de suggérer que la modulation des MMP pourrait s'effectuer via l'activation du NF- κ B par l'ET-1.

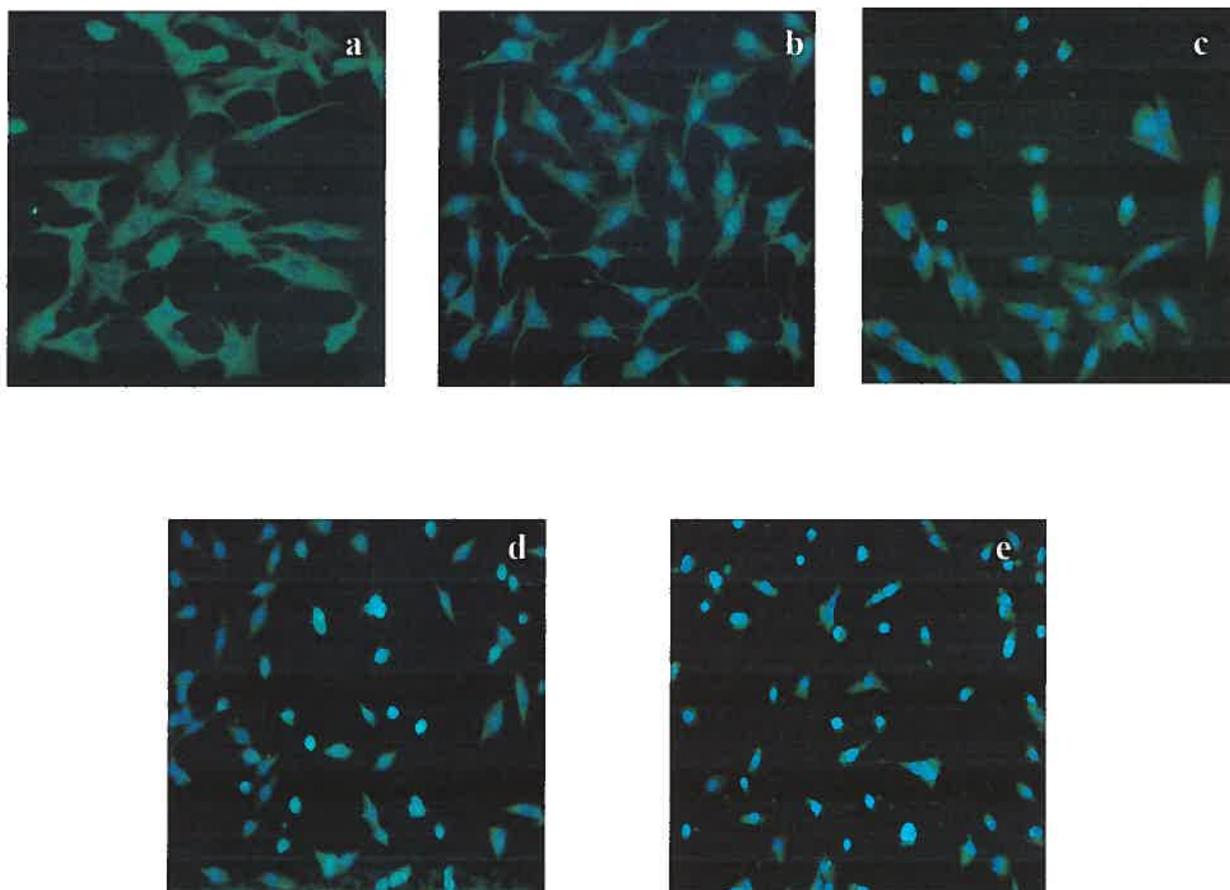


Figure 9: Effet de l'ET-1 sur la localisation cellulaire du NF- κ B p65 dans des cellules d'ostéosarcome. Les cellules MG-63 ont été cultivées sur des lames à chambres couvertes puis traitées avec l'ET-1 (10nM) dans du milieu à 2.5% de SVF pour différents temps : a : contrôle b : 10minutes c : 30minutes d : 60minutes e : 180minutes. Ensuite, les cellules stimulées ont été investiguées par immunofluorescence avec un anticorps spécifique reconnaissant le NF- κ B p65 (dilution : 2 μ g/mL). Le marquage positif a été révélé avec Alexa fluor probe 488 qui a coloré le cytoplasme en vert, alors que le marquage bleu provient du marquage nucléaire de type DAPI dsDNA. Plus le temps de stimulations est long, moins il y a de marquage au niveau du cytoplasme et plus il y en a au niveau des noyaux.

4.2.2. Caractéristiques des tumeurs provenant de biopsies de patients

Tout au long de ce travail, notre équipe a récolté des biopsies ou des résections de tumeurs osseuses provenant de patients. Ci-joint un tableau démontrant les caractéristiques de ces tumeurs.

No	Age	Sexe	Site primaire	Sous-Type Histologique	Grade histologique	Diagnostic
1	6	M	Tibia gauche	Ostosarcome ostogénique	4/4	Ostéosarcome ostéogénique
2	14	F	Tibia Proximal droit	Ostéosarcome ostéogénique	4/4	Ostéosarcome ostéogénique
3	15	F	Fémur Distal Gauche	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome Ostéogénique
4	46	M	Bassin droit	Chondrosarcome	N/A*	Chondrosarcome sur ostéochondrome
5	11	F	Tibia proximal gauche	Ostéochondromatose	N/A	Ostéochondromatose avec exostose tibial
6	14	F	Tibia proxima droit	Ostéosarcome	4/4	Ostéosarcome
7	60	M	Péroné Proximal Gauche	Chondrosarcome	N/A	Chondrosarcome
8	46	M	Vertèbre L1 gauche	Chondrosarcome	N/A	Chondrosarcome
9	18	F	Tibia distal	Ostéosarcome ostéogénique et chondroblastique	4/4	Ostéosarcome de haut grade
10	22	M	Omoplate droite	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome ostéogénique
11	70	M	Humérus	Ostéosarcome ostéogénique	4/4	Chondrosarcome dédifférencié en ostéosarcome
12	38	M	Tibia	Tumeur à cellules géantes (TCG)	N/A	TCG
13	19	M	Radius	chondroblastique	4/4	Ostéosarcome chondroblastique
14	47	F	Calcaneum	TCG	N/A	TCG

15	26	F	Tibia proximal gauche	TCG	N/A	TCG
16	37	M	Fémur	Fibroblastique	2/4	Ostéosarcome fibroblastique
17	52	M	Tibia	TCG	N/A	TCG
18	15	F	Fémur	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome
19	36	M	Tibia	TCG	N/A	TCG
20	70	F	Bassin	Chondroblastique	4/4	Ostéosarcome Chondrogénique associé à la maladie de Paget et de l'os
21	46	F	Gaine Péroné gauche	Variante fibroblastique	N/A	Tumeur fibroblastique histiocytaire plexiforme (tumeur des tissus mous)
22	46	M	Poumon	Fibroblastique dans le site primaire	3 à 4/4	Ostéosarcome métastatique poumon
23	15	F	Fémur distal	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome
24	40	M	Fémur	Chondroblastique	3/4	Ostéosarcome périoste
25	22	M	Fémur distal gauche	TCG	N/A	TCG
26	24	M	Poumon	Chondroblastique	N/A	Ostéosarcome chondroblastique
27	16	M	Tibia proximal gauche	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome Ostéogénique avec métastase
28	15	F	Fémur distal gauche	Ostéogénique	4/4	Ostéosarcome ostéogénique

*N/A : Non Applicable

Tableau VI : Caractéristiques des tumeurs osseuses collectées lors de ce travail

4.2.3. Expression de la COX-2 selon le cycle cellulaire

La cyclooxygénase-2 joue un double rôle : d'un côté elle est partie intégrante des mécanismes de défense du corps, mais d'un autre côté, elle a été associée avec le caractère tumorigénique de diverses tumeurs (Gilroy et al, 2000). Pour comprendre ce double rôle de la COX-2, l'équipe de Gilroy a suggéré que son expression serait régulée en fonction de la phase du cycle cellulaire dans lequel les cellules se retrouvent. Nous avons donc induit les différentes étapes du cycle cellulaire dans des cellules d'ostéosarcome. D'abord une privation des cellules dans du milieu contenant 0.5% de sérum de veau fœtal a amené les cellules en phase G₀. Puis, un ajout de sérum de veau fœtal à 2.5% a induit l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Selon les temps d'incubation des cellules, différentes étapes du cycle cellulaire ont pu être ciblées : A = G₀, B = début G₁, C = mi-G₁, D = S, E = G₂/M. Par la suite, nous avons stimulé les cellules avec du phorbol myristate acétate (PMA : est un inducteur reconnu de la COX-2) afin de vérifier sous quelles étapes du cycle cellulaire les cellules d'ostéosarcome expriment la COX-2.

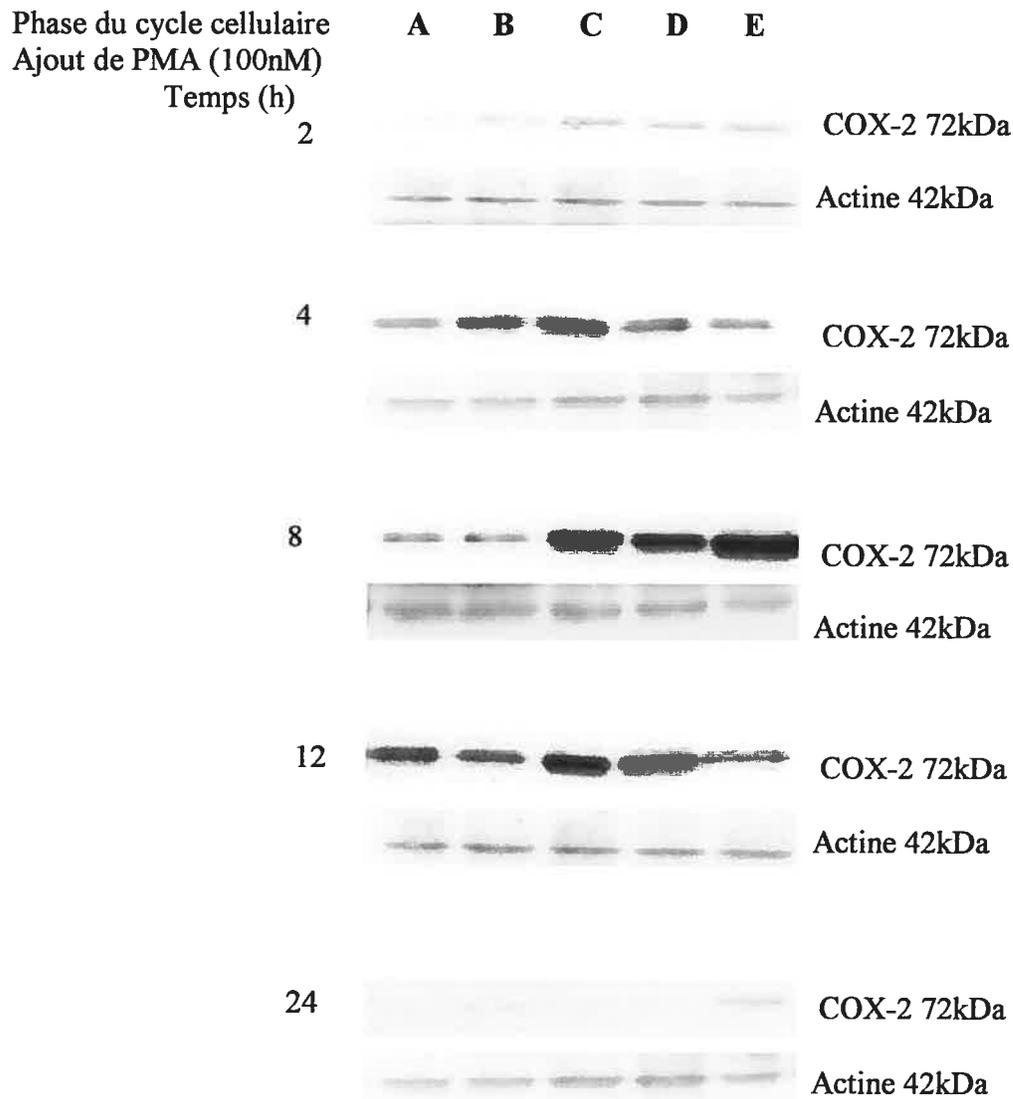


Figure 10 : Expression protéique de la COX-2 selon le cycle cellulaire dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome. Les cellules d'ostéosarcome (MG-63) ont été privées dans du milieu 0.5% de sérum de veau foetal pendant 24h à 37⁰C. Puis, il y a eu ajout de sérum de veau fétal pour 2.5% pour des périodes de A: 0h (G0), B: 4h (début G1), C: 12h (mi-G1), D: 24h (S) et E: 30h (G2/M). À chacun de ces temps, 100nM de PMA ont été ajoutés pour 2h, 4h, 8h, 12h et 24h. Les lysats cellulaires ont été extraits dans du SDS 0.5% en ébullition. Un western blot avec un anticorps spécifiques de la COX-2 (dilution : 0.1µg/mL) a été fait pour déterminer l'effet du cycle cellulaire sur l'expression protéique de la COX-2. Il a été démontré que l'expression

protéique de la COX-2 est dépendante du cycle cellulaire. La protéine COX-2 est présente au niveau de toutes les phases du cycle cellulaire. Une faible expression de la COX-2 est illustrée à 2h de stimulation pour toutes les phases du cycle. Par contre, après 4h de stimulation, l'expression de la COX-2 est induite lors de l'entrée en phase G1 puis elle diminue lorsque les cellules poursuivent le cycle. L'expression de la protéine à 8h de stimulation est aussi induite par l'entrée en phase G1, mais l'induction est maintenue tout au long du cycle cellulaire. Après 12h de stimulation, la COX-2 est exprimée au niveau de toutes les phases du cycle cellulaire, mais son expression est supérieure en phase mi-G1 et S. Après 24h de stimulation, il y a perte d'expression de la COX-2 dans toutes les phases du cycle cellulaire sauf une faible expression en phase G2/M.

4.2.4. Expression de l'ostéocrine par les tumeurs osseuses

L'ostéocrine est une protéine récemment reconnue en tant que marqueur de différenciation précoce des ostéoblastes. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si différentes tumeurs osseuses recueillies expriment ce marqueur, signe de la présence d'ostéoblastes en période de différenciation et également en période de formation de matrice osseuse. Nous avons observé que les tumeurs osseuses expriment à un niveau élevé l'ARNm de cette protéine.

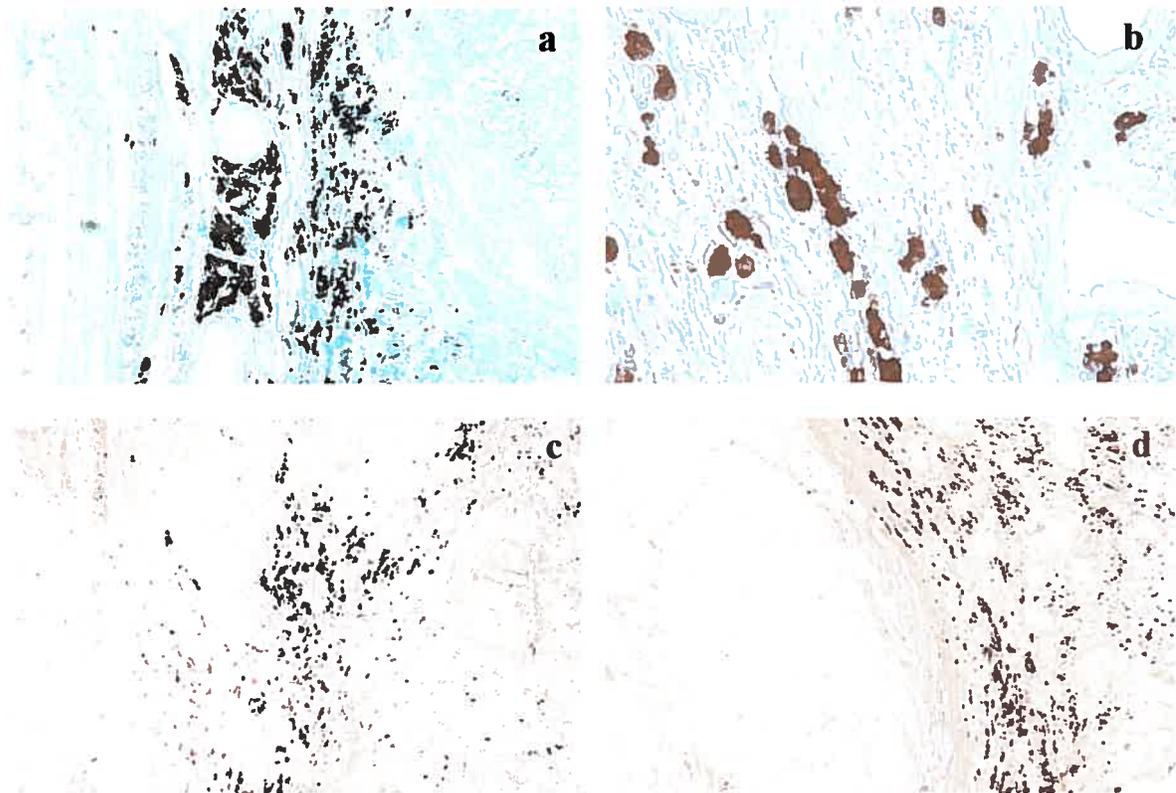


Figure 11 : Expression de l'ARNm de l'ostéocrine par les tumeurs osseuses. Des sections de 5 μ m de tissu de tumeurs osseuses humaines (n=4) ont été analysées par la technique d'hybridation *in situ* avec une sonde spécifique de l'ostéocrine (30ng/mL) marquée à la digoxigénine. Les tissus ont été contrecolorés avec l'hématoxyline et l'éosine.

4.2.5. Expression de divers facteurs prédictifs de la tumorigénicité de tumeurs osseuses

La propagation tumorale est un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs. Dans ce travail, nous avons étudié divers facteurs pouvant possiblement jouer un rôle dans la modulation du caractère tumorigénique des tumeurs osseuses. Nous avons investigué l'expression de plusieurs MMP puisque cette famille de protéases contribue à la propagation tumorale, en particulier à cause de son implication dans la dégradation de la MEC. Nous avons aussi déterminé l'expression des 4 TIMP connus à ce jour, principalement à cause de leur rôle d'inhibiteurs naturels des MMP, qui apparaît critique dans la tumorigénicité. Nous avons également étudié la PARP-1 (Poly (ADP-ribose) Polymérase 1) qui est une molécule impliquée au niveau de la croissance tumorale. L'IL-1 β qui est une cytokine pro-inflammatoire, a un rôle reconnu dans l'induction de plusieurs MMP et elle a été utilisée en tant que contrôle positif. Et finalement, nous avons déterminé la chymase qui est une des enzymes responsable de la formation de l'ET-1 (1-31) active. L'intérêt de la détermination de la chymase vient du fait que nous avons mis en évidence la forme d'ET-1 (1-31) dans les lysats cellulaires et les milieux de culture des cellules dérivées des biopsies des patients (Figure 13)

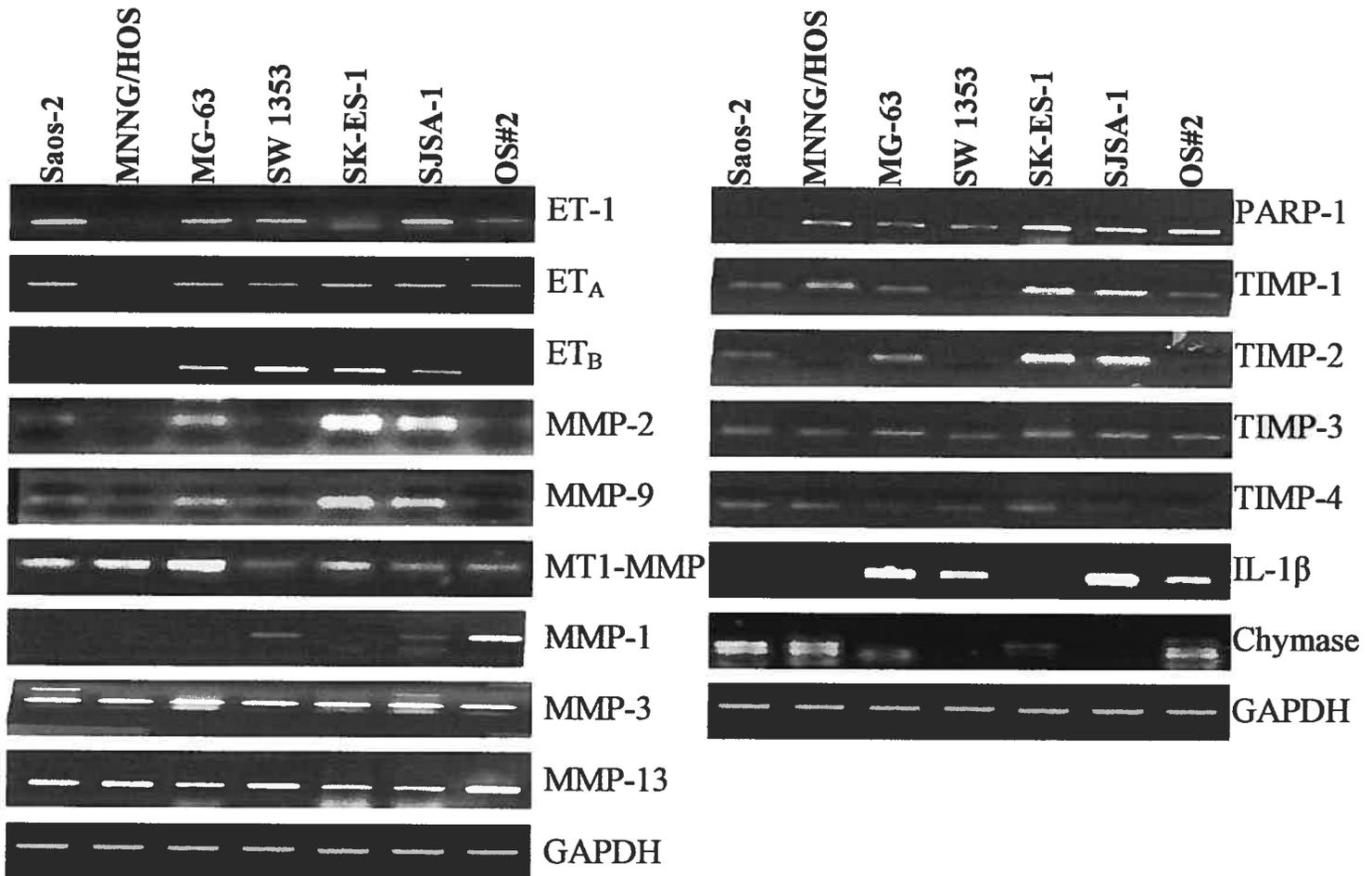


Figure 12 : Expression de l'ARNm de divers facteurs dans des cellules de tumeurs osseuses. RT-PCR démontrant l'expression des ARNm de divers facteurs possiblement impliqués dans la tumorigénicité des tumeurs osseuses. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans du milieu à 10% de SVF jusqu'à confluence. Les amorces et les conditions de RT-PCR sont données dans la section matériel et méthodes (Tableau III). Les produits de PCR sont montrés tels que visualisés par le bromure d'éthidium. Nous avons observé que l'ET-1 et l'ET_A ont été exprimés dans toutes les lignées, tandis que l'ET_B n'est pas exprimé dans les cellules Saos-2, MNNG/HOS et dans la lignée dérivée dans notre laboratoire, l'OS#2. Les MMP-2 et MMP-9 sont exprimées dans toutes

les lignées cellulaires, à différents degrés pour chaque lignée, mais selon un même modèle d'expression. La MT1-MMP, la MMP-3 et la MMP-13 sont exprimées par toutes les lignées cellulaires, alors que la MMP-1 n'est exprimée que par la lignée de chondrosarcome (SW 1353), par les SJSA-1 et par l'OS#2. Seules les cellules Saos-2 n'expriment pas la PARP-1. Les TIMP-1 et TIMP-3 sont exprimées par toutes les lignées cellulaires. La TIMP-2 est exprimée par les mêmes lignées cellulaires que la MMP-2, c'est-à-dire plus faiblement par les cellules MMNG/HOS, SW 1353 et l'OS#2. La TIMP-4 est exprimée par toutes les lignées cellulaires, mais plus faiblement par les cellules MG-63, SJSA-1 et OS#2. L'IL-1 β n'est pas exprimée par les cellules Saos-2 et MNNG/HOS seulement tandis que la chymase n'est pas exprimée par les cellules SJSA-1 et SW 1353 seulement.

4.2.6. Détection de la forme alternative de l'ET-1 (1-31)

Au cours de ce travail, nous avons déterminé la présence de la forme (1-31) de l'ET-1 dans des cellules d'ostéosarcome. Il n'existe aucun test disponible sur le marché détectant la forme (1-32) de l'ET-1. La présence de la forme alternative de l'ET-1 dans les cellules d'ostéosarcome illustre la présence de la chymase, l'enzyme responsable du clivage de la Big ET-1 (le précurseur immédiat de l'ET-1) dans ces cellules.

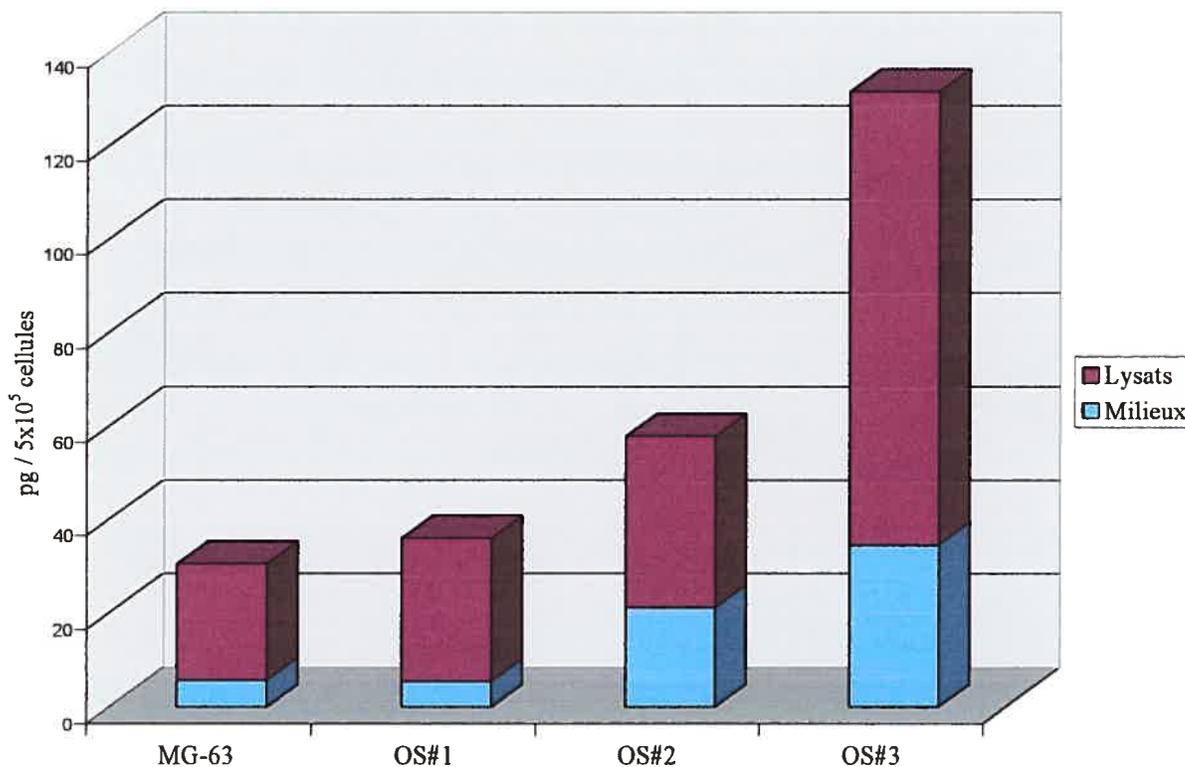


Figure 13 : Détection de la forme alternative de l'ET-1 (1-31) dans les lysats cellulaires et les milieux de culture d'une lignée cellulaire (MG-63) et des cellules dérivées des biopsies des patients (OS#1, OS#2, OS#3). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans du milieu à 10% de SVF jusqu'à confluence. Le test ELISA a été effectué selon les instructions du manufacturier (Phoenix Bio-Tech Corp., Mississauga, Ontario) et les résultats sont exprimés en pg/5x10⁵ cellules. La forme (1-31) de l'ET-1 est préférentiellement détectée dans les lysats cellulaires mais elle est aussi détectée dans les milieux de culture.

CHAPITRE 5. DISCUSSION

L'originalité de l'étude réside dans le fait que nous avons démontré l'existence des interactions entre deux familles de protéines, les MMP et les endothélines, dans le milieu tumoral. Cette étude a été réalisée *in vitro* avec des cellules provenant des tumeurs humaines disponibles commercialement ainsi que de cellules dérivées de biopsies de patients atteints par une tumeur osseuse (Tableau VI). Les résultats obtenus montrent que l'ET-1 a un effet sur l'induction de deux MMP (MMP-2 et 9) qui sont les principales MMP de la dégradation de la MEC, suggérant que l'ET-1 peut être un facteur favorisant l'invasion tumorale. En effet, le remodelage de la MEC est un des plus importants événements dans la pathogénèse des tumeurs, car les cellules cancéreuses survivent en recrutant des vaisseaux sanguins à l'intérieur de la masse tumorale et quittent leur site initial en pénétrant la lamina basale et d'autres structures de la MEC.

5.1. L'endothéline-1 et ses récepteurs

Nos résultats montrent que l'ET-1 est exprimée dans la plupart des lignées cellulaires de tumeurs osseuses (Figure 1). Il est également possible d'observer l'expression de l'ET-1 au niveau du tissu tumoral (Figure 1). Ces résultats sont en accord avec la littérature où l'expression du gène de l'ET-1 a été démontré dans plusieurs cancers incluant l'ostéosarcome du rat (Nambi et al., 1995). À notre connaissance, ce travail est le premier qui a investigué l'expression de l'ET-1 et de ses deux récepteurs dans des tissus d'ostéosarcomes humains. Nos résultats démontrent que le gène de l'ET-1 n'est pas exprimé par les deux lignées cellulaires les plus tumorigéniques, soit les cellules SK-ES-1 et MNNG/HOS alors qu'il y a une forte expression de l'ET-1 dans les lignées Saos-2 et MG-63 qui sont non tumorigéniques. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de l'équipe de Wulfig qui a trouvé que l'expression de l'ET-1 est supérieure dans les tumeurs de haut grade histologique (Wulfig et al, 2004). Il est possible d'envisager que lors de situations où les cellules sont hautement tumorigéniques, une autre protéine viendrait agir à la place de l'ET-1, par exemple le PTHrP. Le PTHrP, pourrait ainsi activer le récepteur ET_A et les effets engendrés par cette liaison, comme l'induction des MMP, seraient maintenus malgré l'absence de l'ET-1.

Les 2 récepteurs spécifiques à l'ET-1 sont également exprimés dans la plupart de ces lignées cellulaires (Figure 3) avec une prédominance pour l'ET_A (Figure 2) ce qui nous permet de supposer que les effets induits par l'ET-1 se font via le récepteur ET_A. On observe également une plus faible expression du récepteur ET_A chez les lignées Saos-2 et MG-63 comparativement aux lignées tumorigéniques. Ce résultat est en corrélation avec notre hypothèse de travail voulant attribuer un rôle au récepteur ET_A dans la tumorigénicité des tumeurs osseuses. Comme l'équipe de Grant l'a démontré, le récepteur ET_B est prédominant au niveau du tissu sain, alors qu'au niveau de la tumeur primaire et des métastases, c'est le récepteur ET_A qui va prévaloir (Grant et al, 2003). Le récepteur ET_B a peu été détecté dans les cultures des cellules dérivées. Ces cultures sont homogènes et n'incluent pas de cellules endothéliales, qui sont d'ailleurs connus pour exprimer les deux type de recepteurs à l'ET-1, l'ET_A et l'ET_B. Dans ce sens, ces résultats nous permettent d'envisager l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur ET_A en tant que stratégie thérapeutique dans le traitement de l'invasion tumorale au niveau de l'ostéosarcome. Dans la littérature, des données récentes indiquent une nouvelle approche pour le traitement de certains cancers qui se base sur l'inhibition sélective du récepteur de l'ET-1 : ET_A. Lors d'une étude sur l'effet de l'inhibition de ce récepteur, il a été constaté que le BQ123, un antagoniste du récepteur ET_A, a significativement réduit une tumeur colorectale (Asham et al., 2001). Notre étude nous permet d'envisager des résultats similaires, mais au niveau des tumeurs osseuses.

5.2. Les interactions endothéline et métalloprotéases

Nos résultats ont montré que l'ET-1 induit l'ARNm des MMP-2 et 9 (Figure 5a). Cette induction, illustrée au niveau des ARN messagers, reste modeste, mais est également observée au niveau de l'activité enzymatique (Figure 5b) où elle est significative ($p < 0.05$). Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux récents qui attribuent à l'ET-1 un rôle d'inducteur des MMP. Par exemple, l'équipe de Rosano a établi que l'ET-1 induit la synthèse de toute une gamme de MMP dans des cellules humaines de carcinomes ovariens (Rosano et al, 2003). Dans notre travail, nous avons ciblé un seul sous-groupe des MMP ; les gélatinases (MMP-2 et 9). Nous nous sommes davantage consacrés à l'étude de ces 2 MMP parce que ces deux enzymes

ont été montrées en tant que facteurs protéolytiques qui contribuent à la dégradation du collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et des autres types de collagène qui constituent la membrane basale des cellules, la membrane basale étant un élément-clé dans les changements du phénotype cellulaire qui mènent à la progression cancéreuse (Handsley et al, 2005).

Ces deux enzymes s'avèrent aussi particulièrement pertinentes à étudier dans le contexte de notre étude puisqu'elles sont responsables de la formation d'une nouvelle forme d'ET-1, l'ET-1 (1-32). Cette forme d'ET-1 est peu connue. Elle a été démontrée seulement dans deux articles (Fernandez-Patron et al, 1999 et Fernandez-Patron et al, 2001). Ces études suggèrent que les différentes voies d'activation de la Big ET-1 (1-38), c'est-à-dire les différents clivages responsables de son activation, seraient dépendants de la localisation de la protéase activatrice ainsi que du tissu ciblé par la forme active d'ET-1 générée. Comme la Big ET-1, la MMP-2 et la MMP-9 sont surexprimées au niveau de l'ostéosarcome, il devient plausible qu'une boucle de rétroaction positive soit créée à cet endroit. L'équipe de Fernandez-Patron a d'abord envisagé la possibilité d'un clivage de la Big ET-1 par la MMP-2 (Fernandez-Patron et al, 1999) puisqu'une des régions de la Big ET-1 (Gly³²-Leu³³) possède une séquence d'acides aminés similaire à celle retrouvée dans le collagène interstitiel (Gly-Leu/Ile) ainsi que dans la laminine-5 (Ala-Leu), deux produits habituellement clivés par la MMP-2. Lorsqu'ils ont incubé de la Big ET-1 avec de la MMP-2 recombinante humaine, le peptide ET-1 (1-32) a été généré. Comme la MMP-9 partage plusieurs substrats avec la MMP-2, son rôle dans la génération de l'ET-1 (1-32) a par la suite été investigué au niveau des neutrophiles (Fernandez-Patron et al, 2001). Il a été découvert, que tout comme la MMP-2, la MMP-9 participait également dans l'activation de la Big ET-1 via un clivage au site (Gly³²-Leu³³) pour générer un nouveau peptide actif : l'ET-1 (1-32).

Comme nous avons illustré l'induction des MMP par l'ET-1 au niveau de l'ostéosarcome et que celles-ci viennent à leur tour induire l'expression de l'ET-1, la présence d'une boucle autocrine (rétroaction positive entre les endothélines et les MMP) est probable à ce niveau. L'ET-1 induit la synthèse et l'activité des gélatinases, et à leur tour, les gélatinases ont des propriétés de clivage de la Big ET-1 (le précurseur immédiat de l'ET-1 (1-21)). Cependant, dans cette étude,

nous n'avons pas démontré de manière directe que cette forme alternative de l'ET-1 (1-32) est produite. Les formes alternatives de l'ET-1 (de 31 ou 32 acides aminés) n'ont pas été démontrées dans l'ostéosarcome, ni dans aucun cancer incluant le cancer du sein ou de la prostate (des pathologies pour lesquelles des essais cliniques impliquant des antagonistes du récepteur ET_A sont sous investigation). Dans cette optique, des investigations futures seraient souhaitables.

Nous avons démontré que l'ET-1 est capable d'induire la MMP-2 et la MMP-9 (Figure 5). Dans ce sens, nous pouvons attribuer au système endothéline un rôle dans la progression tumorale qui se joue via l'induction de la synthèse des MMP-2 et MMP-9 ainsi que via l'induction de leur activité gélatinolytique. Étant donné que l'expression élevée des MMP est souvent corrélée avec une invasion tumorale augmentée, cela peut nous amener à considérer une stratégie thérapeutique se basant sur une double inhibition qui viserait de manière spécifique le blocage des récepteurs de l'ET-1 et le blocage des MMP.

Une autre enzyme serait très importante à considérer dans le contexte de notre étude. Il s'agit de la MMP-3 nommée aussi la stromélysine-1, puisque *in vivo* elle pourrait être responsable de l'activation de la MMP-2 et de la MMP-9. D'après la littérature, *in vivo*, la MMP-9 exerce un rôle catalytique critique dans la progression tumorale et l'invasion (DeClerk, 2000). Cependant, la MMP-9 est sécrétée par les cellules cancéreuses (incluant l'ostéosarcome) en tant que forme stable (zymogène inactif). La pro-MMP-9 ainsi sécrétée nécessite son activation dans l'espace extracellulaire et il a été montré que l'activation de la MMP-9 s'effectue par une interaction complexe en cascade, qui implique la plasmine et la stromélysine-1 (MMP-3) (Björklund et al., 2005).

L'ET-1 a été démontrée dans des cellules cancéreuses comme facteur autocrine, inducteur de la plasmine. Cependant la plasmine, générée par l'urokinase (uPA) endogène ne semble pas activer la pro-MMP-9 avec efficacité. La plasmine est toutefois très efficace dans l'activation de la MMP-3 (Ramos-Desimone et al., 1999) et la MMP-3 active est en fait l'enzyme-clé dans la

conversion de la pro-MMP-9 en MMP-9 active. Il a d'ailleurs été montré que cette voie d'activation en cascade contrôle l'invasion des cellules tumorales.

5.3. Le rôle des MMP

Diverses études ont été faites concernant le rôle potentiel des MMP dans la progression tumorale. Notamment, une étude avec des souris déficientes pour la MMP-2 et pour la MMP-9 a démontré une réduction de la croissance tumorale pour le carcinome pancréatique (Bergers et al, 2000), ce qui leur attribuerait un rôle direct dans la propagation tumorale. Il a également été démontré que les souris K/O pour le gène de la MMP-9 démontrait une réduction de l'angiogénèse. Des souris K/O pour la MT1-MMP et pour la MMP-2 ont montré une néovascularisation défectueuse (Zhou et al, 2000 et Itoh et al, 1998). Par contre, cet effet des MMP était observé avant l'apparition des métastases. Ces résultats suggèrent que l'inhibition des gélatinases pourrait avoir un effet bénéfique pour l'inhibition de la croissance tumorale à des niveaux précoces de la maladie.

La surexpression des gélatinases dans les tumeurs primaires corrèle en général avec le grade ou le stade de plusieurs types de cancers solides (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). En effet, dans le carcinome du sein, l'expression de la MMP-2 est associée à l'agressivité clinique de l'évolution de la tumeur (Talvensaaari-Mattila et al, 1998). Par contre, pour la MMP-9, les résultats sont moins concluants en ce qui a trait au carcinome du sein. L'équipe de Remacle a démontré que l'activité de la MMP-9 a une corrélation inverse avec le nombre de nodules métastatiques (Remacle et al, 1998). Ces résultats correspondent à ceux d'une autre étude qui a démontré qu'un niveau protéique bas de la MMP-9 dans le sérum pré-opératoire est associé avec une évolution clinique plus agressive (Talvensaaari-Mattila et al, 2005). Pour ce même type de tumeur, une divergence dans les résultats concernant la MMP-9 a été retrouvée : une autre étude a démontré qu'un niveau plasmatique élevé de la MMP-9 au moment du diagnostique était associé avec le pire taux de survie (Ranuncolo et al, 2003).

Dans le carcinome ovarien, une surexpression de la MMP-2 est retrouvée et cette surexpression corrèle avec une mauvaise évolution de la maladie (Garzetti et al, 1995 et Westerlund et al, 1999). Au niveau du cancer de la prostate, la MMP-9 a été associée avec la capacité des cellules cancéreuses prostatiques de produire des métastases aux poumons dans un modèle animal (Sehgal et al, 1998), alors que pour la MMP-2, la quantité retrouvée au niveau du sérum corrèle avec l'extension de la maladie (Gohji et al, 1998).

Dans les mélanomes, l'expression de la MMP-9 est associée avec la dispersion des métastases par les cellules tumorales (MacDougall et al, 1995) alors que l'expression de la MMP-2 augmente en corrélation avec l'augmentation du grade de la tumeur (Vaisanen et al, 1996). En général, l'expression des gélatinases est associée avec le niveau d'agressivité de cancers humains (Davies et al, 1993).

Au niveau de l'ostéosarcome, les études sont arrivées à des conclusions contradictoires quant à l'expression des gélatinases. D'abord, l'équipe de Foukas a associé la surexpression de la MMP-9, et de la MMP-9 uniquement, avec le développement des métastases au niveau de l'ostéosarcome (Foukas et al, 2002) alors que l'équipe de Loukopoulos a illustré qu'aucune des formes actives des 2 gélatinases n'étaient présentes au niveau d'ostéosarcomes canins (Loukopoulos et al, 2004). Une autre étude a démontré que les concentrations plasmatiques de la MMP-2 et de la MMP-9 retrouvées chez des patients atteints d'un ostéosarcome ne démontraient aucune différence statistique avec les valeurs retrouvées chez les contrôles normaux (Ferrari et al, 2004). Par contre, une forte immunoréactivité pour la MMP-9 a été observée chez les patients qui ont développé des métastases alors que cette association n'a pas pu être faite pour la MMP-2. Cette étude attribue donc un rôle à la MMP-9 et non à la MMP-2 dans l'apparition des métastases. En contradiction avec ces résultats, une autre étude a observé que parmi des lignées cellulaires d'ostéosarcome, les cellules dénotant le potentiel invasif le moins élevé étaient celles qui démontraient aussi un taux significativement réduit de l'ARNm de la MMP-2 (Bjornland et al, 1999). Donc que dans ces lignées cellulaires, l'expression de la MMP-2 serait reliée au potentiel d'invasion des cellules d'ostéosarcome.

Dans notre étude, il a été constaté que la MMP-2 était davantage exprimée par les tissus et les cellules d'ostéosarcome humain lorsque comparée avec la MMP-9 (Figure 4). Nous avons aussi observé que son activité enzymatique était augmentée par rapport à celle de la MMP-9 (Figure 6). Par contre, l'équipe de Foukas a conclu que la MMP-9, et non la MMP-2, pouvait servir de facteur pronostique pour prédire l'apparition de métastase ainsi que pour prédire le taux de survie chez les patients atteints d'un ostéosarcome (Foukas et al, 2002). Par ailleurs, une autre équipe a trouvé que malgré une très forte expression de la MMP-2, celle-ci n'aurait aucun effet pronostique dans le sarcome synovial (Saito et al, 2002). Ainsi, il semble y avoir une majorité d'études qui proposent la MMP-9 en tant que facteur pronostique potentiellement prédictif de la gravité de l'évolution de la tumeur. Dans ce travail, nous n'avons pas corrélié l'expression des gélatinases avec le grade de la tumeur ou avec l'apparition des métastases, mais nous avons observé que la MMP-2 était présente en quantité supérieure à la MMP-9 (Figure 4) et que seule la MMP-2 était modulée par l'inhibition du NF- κ B par le PDTTC. Ceci nous permet donc de supposer que les mécanismes à l'origine de l'induction des gélatinases diffèrent pour la MMP-2 et la MMP-9.

Il n'y a pas encore de consensus établi quant à la méthode qui serait la plus efficace pour tester les gélatinases ou leurs inhibiteurs en matériel clinique. En effet, jusqu'à présent, différentes méthodes ont été utilisées ; certains travaux ont effectué des marquages immunohistochimiques, d'autres ont exploré l'expression des ARNm. Les ARNm ont parfois été investigués au niveau de sections histologiques provenant de la tumeur primaire ou ont été mesurés au niveau du sérum ou d'échantillons plasmatiques provenant de patients (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). À ce jour, il n'a pas encore été déterminé avec certitude laquelle des 2 MMP a le rôle le plus déterminant dans la progression du cancer, en partie parce que leur rôle varie souvent dans les processus utilisés pour définir les facteurs pronostiques pour les différents types de cancer. De plus, il apparaît que l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 n'est pas nécessairement coordonnée dans tous les néoplasmes (Turpeenniemi-Hujanen, 2005).

La grande problématique des MMP quant à leur rôle dans l'invasion tumorale vient du fait qu'elles ont des effets souvent contradictoires sur différentes étapes de la progression tumorale. Ainsi, il a été démontré que les MMP pouvaient non seulement venir induire l'angiogenèse, mais pouvaient également inhiber, ou du moins réguler à la baisse cette néovascularisation. En effet, la dégradation du plasminogène qui produit le fragment anti-angiogénique angiostatine peut être médiée par diverses MMP *in vitro* et *in vivo* (Cornelius et al, 1998, Dong et al, 1997, Lijnen et al, 1998, Pattersen et al, 1997 et Pozzi et al, 2000). Cela pourrait en partie expliquer le manque de résultats concluants lors des études cliniques utilisant des inhibiteurs des MMP.

Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer ce manque de réponse pour les traitements utilisant des inhibiteurs des MMP. D'abord, les essais ont été conduits avec des inhibiteurs de la MMP-2 et de la MMP-9. Il est donc possible que l'inhibition de ces seules MMP ne soit pas suffisante pour stopper le processus du cancer. Plusieurs autres MMP peuvent prendre part à ce processus. L'inhibition de ces MMP inhibe aussi la production de facteurs anti-angiogéniques tels que l'endostatine et l'angiostatine. De plus, les essais qui ont été arrêtés en cours d'études ont été effectués lorsqu'il y avait présence de tumeurs de stage avancé alors que les essais pré-cliniques avaient préalablement démontré que les effets optimaux étaient atteints aux stages précoces du cancer. Finalement, les doses lors de ces essais n'ont pas été optimisées pour les inhibiteurs de MMP puisque les points limites des essais de phase I et II n'ont pas été atteints (Klein et al, 2003).

5.4. Le rôle du NF- κ B

Ayant constaté qu'il était possible d'induire l'activité et l'expression des MMP, nos travaux se sont orientés vers les différentes voies de mécanismes d'induction possibles. Nos résultats ont montré que l'ET-1 ainsi que la Big ET-1 vont amener une translocation du NF- κ B du cytoplasme vers le noyau (Figure 8) où il pourra venir activer des gènes, possiblement les gènes régulant l'expression des MMP. Nous avons aussi effectué une stimulation de cellules d'ostéosarcome avec l'ET-1 pour différents temps (Figure 9), et nous avons constaté que pour un

temps de stimulation supérieur, une augmentation de la translocation du NF- κ B p65 du cytoplasme, où il est présent sous forme inactive, vers le noyau a été observée. Nous avons donc démontré le rôle que l'ET-1 joue sur le NF- κ B alors que dans la littérature, c'est le rôle d'induction de l'ET-1 par le NF- κ B qui est principalement documenté (Woods et al, 2003 et Sugii et al, 2005). Notre hypothèse était que l'induction des MMP par l'ET-1 implique la voie du NF- κ B. Pour venir appuyer cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur du NF- κ B (le PDTC) et nous avons regardé l'effet que cette inhibition a sur l'expression de la MMP-2. Nous avons observé que l'expression de la MMP-2 est inhibée par l'ajout de PDTC (Figure 6) ce qui nous a amené à faire l'hypothèse que l'induction des MMP par l'ET-1 implique la voie de signalisation du NF- κ B.

5.5. Le rôle des TIMP

Dans la littérature, il a été montré qu'un des rôles de l'ET-1 est d'agir sur les TIMP pour diminuer leur expression. Cela suggère que l'ET-1 agit non seulement en augmentant les MMP, mais également en diminuant l'expression des TIMP, ce qui conduit à un déséquilibre entre ces facteurs. Cet équilibre apparaît important puisque l'activité biologique et la biodisponibilité des MMP dans le microenvironnement tumoral est directement contrôlé par le ratio MMP/TIMP. Les TIMP sont des inhibiteurs naturels de l'activité des MMP et il est connu que leur affinité de liaison n'est pas la même pour toutes les MMP. Par exemple, la liaison de la TIMP-2 est préférentielle pour la MMP-2, alors que celle de la TIMP-1 l'est pour la MMP-9. Dans cette étude, nous avons exploré la TIMP-1 et la TIMP-2, malgré que d'autres TIMP telle que la TIMP-4 pourrait être pertinente. Nous n'avons pas investigué en profondeur l'effet de l'ET-1 sur les TIMP, mais nous avons constaté que lors de l'inhibition du NF- κ B par le PDTC, la TIMP-1 et la TIMP-2 étaient inhibées selon le même patron que celui de la MMP-2 (Figure 6). Ainsi, la voie de signalisation des ces deux TIMP suivrait la même que celle des gélatinases. Comme ces deux TIMP sont induites par l'ajout d'ET-1 exogène (Figure 6), cela nous permet également de supposer qu'au niveau de l'ostéosarcome, il n'y a pas de diminution de l'expression des TIMP (donc de diminution du ratio MMP/TIMP), mais qu'au contraire, ces TIMP, qui forment des

complexes préférentiels avec la MMP-9 et la MMP-2 respectivement, ne jouent pas un rôle favorable dans l'évolution de la maladie. Ainsi, nous pouvons conclure qu'au niveau de l'ostéosarcome, le rôle que la TIMP-2 joue est davantage relié à l'activation de la MMP-2 qu'à l'inhibition des MMP.

5.6. Les autres facteurs

Au cours de ce travail, nous avons exploré une nouvelle protéine spécifique à l'os qui a récemment été découverte; l'ostéocrine. Cette protéine est fortement sécrétée lors de la production et de la maturation de la matrice osseuse, et son niveau d'expression est maintenu tout au long du phénomène de maturation, lui suggérant ainsi un rôle au niveau des ostéoblastes actifs (Thomas et al, 2003). Par contre, lorsque les ostéoblastes ont atteint leur pleine maturité, lors de la différenciation terminale, une baisse significative de l'expression de l'ostéocrine est observée. L'équipe de Thomas attribue un rôle à l'ostéocrine dans la modulation du phénotype de l'ostéoblaste (Thomas et al, 2003). Dans les tumeurs osseuses étudiées dans ce travail, une très forte expression de l'ostéocrine a été observée au niveau de l'ARN messager (Figure 11). Ainsi, nous pouvons croire qu'au niveau des tumeurs osseuses, il y a une majorité de cellules qui ont une production d'ostéoblastes qui jouent un rôle encore inconnu à ce jour.

La cyclooxygénase-2 (COX-2) a récemment été impliquée dans diverse pathologies, notamment dans la carcinogénèse et la malignité des tumeurs (Sutton et al, 2004). En effet, sa surexpression amène les cellules à développer des changements phénotypiques tumorales, c'est-à-dire, un phénomène d'apoptose réduit, un cycle cellulaire altéré et une prolifération cellulaire augmentée (Gilroy et al, 2001). Nous avons démontré que la production de la COX-2 par les cellules d'ostéosarcome est régulée selon le cycle cellulaire (Figure 10). En effet, une des caractéristiques des cellules cancéreuses est qu'elles se multiplient de manière incontrôlée, donc qu'elles ne se retrouvent pas à la phase G_0 qui est la phase dormante des cellules. Nous avons constaté que les cellules d'ostéosarcome surexprimaient la COX-2 lors des phases mi- G_1 , S et

G₂/M qui correspondent aux phases de réplication des cellules. Une étude de la COX-2 avec des fibroblastes humains pour des conditions de stimulations sensiblement comparables à celles faites dans ce travail a illustré l'expression de la COX-2 lors de la phase G₀ (Gilroy et al, 2000). Lors de nos essais avec des cellules cancéreuses, c'est lors de la phase de réplication que cette expression a été retrouvée. Comme l'expression de la COX-2 diffère dans les cellules cancéreuses, cela nous laisse supposer qu'elle joue un rôle différent à ce niveau, c'est-à-dire non plus un rôle de protection de l'organisme, mais un rôle qui amène des dommages à l'ADN et par conséquent, qui mène au développement tumoral.

Différents facteurs peuvent être impliqués dans la propagation tumorale. Nous avons investigué l'expression de plusieurs facteurs potentiellement impliqués à ce niveau. Ainsi, comme les MMP, conjointement peuvent dégrader pratiquement tous les composants de la MEC, il s'avère pertinent d'investiguer leur degré d'expression dans les différentes lignées cellulaires tumorales osseuses. Nous avons constaté que la MMP-2 et la MMP-9 sont exprimées par plusieurs des lignées cellulaires, mais qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre le degré de tumorigénicité et l'expression des gélatinases (Figure 12). Par exemple, les cellules SK-ES-1 sont très tumorigéniques et expriment les 2 gélatinases alors que les MNNG/HOS qui sont aussi tumorigéniques ne les expriment pas. Les MMP-3 et MMP-13 sont exprimées par toutes les lignées cellulaires investiguées (Figure 12). Il serait donc envisageable de leur attribuer un rôle majeur dans la dégradation de la MEC et par conséquent, dans la propagation tumorale. La MMP-1 est très peu exprimée par les différentes lignées et ne l'est pas du tout par les lignées cellulaires les plus tumorigéniques (Figure 12). La MT1-MMP, qui est aussi une des MMP qui participe à l'activation de la pro-MMP-2, est exprimée à des degrés variables par toutes les cellules tumorales. Les 4 TIMP sont exprimées dans certaines des cellules tumorales avec des variations pour chacune des 4 membres de cette famille. La TIMP-1 et la TIMP-3 sont constitutivement exprimée par toutes les lignées cellulaires alors que la TIMP-2 est exprimée par les mêmes lignées cellulaires que la MMP-2, ce qui corrobore notre hypothèse qu'au niveau de l'ostéosarcome, la TIMP-2 joue principalement un rôle d'activateur de la pro-MMP-2.

La PARP-1 est exprimée par la plupart des lignées cellulaires tumorales. Cette molécule est impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la propagation tumorale, particulièrement de sarcomes osseux (DeBlasio et al, 2005). L'IL-1 β , qui est une cytokine pro-inflammatoire, a un rôle reconnu d'induction de diverses MMP (Liacini et al, 2002) et par conséquent sa présence au niveau des tumeurs osseuses serait un autre mécanisme potentiel d'induction de ces MMP et signe d'un mauvais pronostic pour ces tumeurs. Finalement, la chymase est une des enzymes responsable de la formation de l'ET-1 active (D'Orléans-Juste et al, 2003). Son expression au niveau des tumeurs osseuses démontre que celles-ci ont la capacité de former de l'ET-1 active qui pourrait venir activer les gènes des MMP.

Tous ces facteurs sont des cibles potentielles pour le traitement de l'invasion tumorale des sarcomes osseux. Dans ce travail, nous n'avons fait que survoler leur degré d'expression dans différentes tumeurs osseuses afin de déterminer pour lesquels il serait le plus pertinent d'investiguer davantage afin de déterminer si leur inhibition serait bénéfique en terme de réduction de la propagation tumorale.

CHAPITRE 6. CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons pu confirmer que les MMP, particulièrement les MMP-2 et MMP-9, étaient hyperexprimées dans les cellules et les tissus d'ostéosarcomes humains. Nous y avons également démontré la présence de l'ET-1 et de ses deux récepteurs spécifiques via lesquels elle agit. Les interactions existantes entre l'ET-1, les MMP et les TIMP apparaissent pertinentes dans la propagation de l'invasion tumorale. Nous pouvons ainsi affirmer qu'il y a une induction des MMP-2 et MMP-9 par l'ET-1 et que cette induction implique la voie de signalisation du NF- κ B. Par conséquent, l'inhibition de cette voie pourrait s'avérer bénéfique en terme de diminution des MMP. Le fait que la Big ET-1 interagisse avec ces deux mêmes MMP (2 et 9) nous incite à développer une hypothèse voulant que des formes alternatives de l'ET-1 (telle la forme 1-32) interviendraient dans l'invasion tumorale.

Il reste cependant à déterminer quel serait l'impact de ces inhibitions *in vivo*. Un modèle animal de souris serait envisageable afin de vérifier si l'inhibition de l'endothéline et des MMP conjointement serait bénéfique en terme de réduction de l'invasion tumorale et en terme de réduction de l'apparition de métastases *in vivo*. Ainsi, une injection de cellules tumorales d'ostéosarcome dans des souris *nudes* dans le but de former une tumeur s'avérerait un modèle pertinent dans le contexte de notre étude. Il serait également intéressant de comparer la quantité d'ET-1 et de MMP retrouvés au niveau de la tumeur primaire par rapport à la quantité retrouvée au niveau des métastases, ceci afin de confirmer le rôle des MMP et de l'endothéline-1 dans la propagation tumorale de l'ostéosarcome.

Par ailleurs, comme les MMP ainsi que l'ET-1 jouent des rôles divers à plusieurs niveaux de la propagation tumorale, il serait pertinent pour une future orientation de ce projet de recherche d'investiguer l'effet de la double inhibition (MMP et ET-1) sur d'autres étapes de la propagation tumorale, notamment sur l'angiogenèse. Des tests *ex vivo* existent qui consistent en culture d'explant aortique circulaire de rat. Trois conditions expérimentales seraient envisageables, soit, après l'ajout d'ET-1 exogène, une expérience contrôle sans inhibiteurs, une situation avec l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs de l'ET-1 et une expérience où un inhibiteur des

récepteurs de l'ET-1 serait utilisé conjointement avec des inhibiteurs des MMP. Cette expérience permettrait d'investiguer l'impact des MMP et de l'ET-1 *in vitro* d'abord et si les résultats s'avéraient concluants, la poursuite de l'étude impliquerait des tests *in vivo*.

Il serait également très intéressant d'explorer le potentiel d'invasion des cellules dérivées des tissus de tumeurs localisées versus le potentiel d'invasion des cellules des tumeurs provenant des métastases. Les métastases pulmonaires sont les plus fréquentes lorsqu'un ostéosarcome est diagnostiqué et dans ce contexte, il serait intéressant d'obtenir des tissus (de la tumeur primaire et des métastases pulmonaires) provenant des mêmes patients. Il serait également intéressant de comparer l'ostéosarcome provenant d'autres sites anatomiques. Par exemple, une localisation mandibulaire a été discutée dans la littérature et son étude pourrait compléter nos connaissances sur ce type de tumeur.

Cette étude ouvre la porte à de nombreux autres questionnements. Les voies de signalisation exactes impliquant l'induction des MMP par l'ET-1, le mécanisme d'induction du NF- κ B, la possibilité que des MMP, autres que les MMP-2 et MMP-9 puissent interagir avec le précurseur de l'ET-1, l'effet des inhibiteurs des MMP et de l'ET-1, la possibilité d'une interaction du PTHrP, sont tous des perspectives à investiguer afin de pouvoir envisager un traitement efficace de l'invasion tumorale de l'ostéosarcome. Les résultats que nous avons obtenus à ce jour nous permettent cependant d'émettre une hypothèse quant aux mécanismes en partie responsable du potentiel invasif de l'ostéosarcome (Figure 14). Cette hypothèse consiste en la formation d'une forme d'ET-1 active par la MMP-2, la MMP-9 et possiblement la MMP-3. Cette ET-1 de 32 acides aminés viendraient à son tour induire l'activation de MMP. Puis, les MMP activées ainsi que l'ET-1 viendraient induire le NF- κ B qui induirait l'invasion des cellules tumorales, la dégradation de la matrice extracellulaire et également l'apparition de métastases.

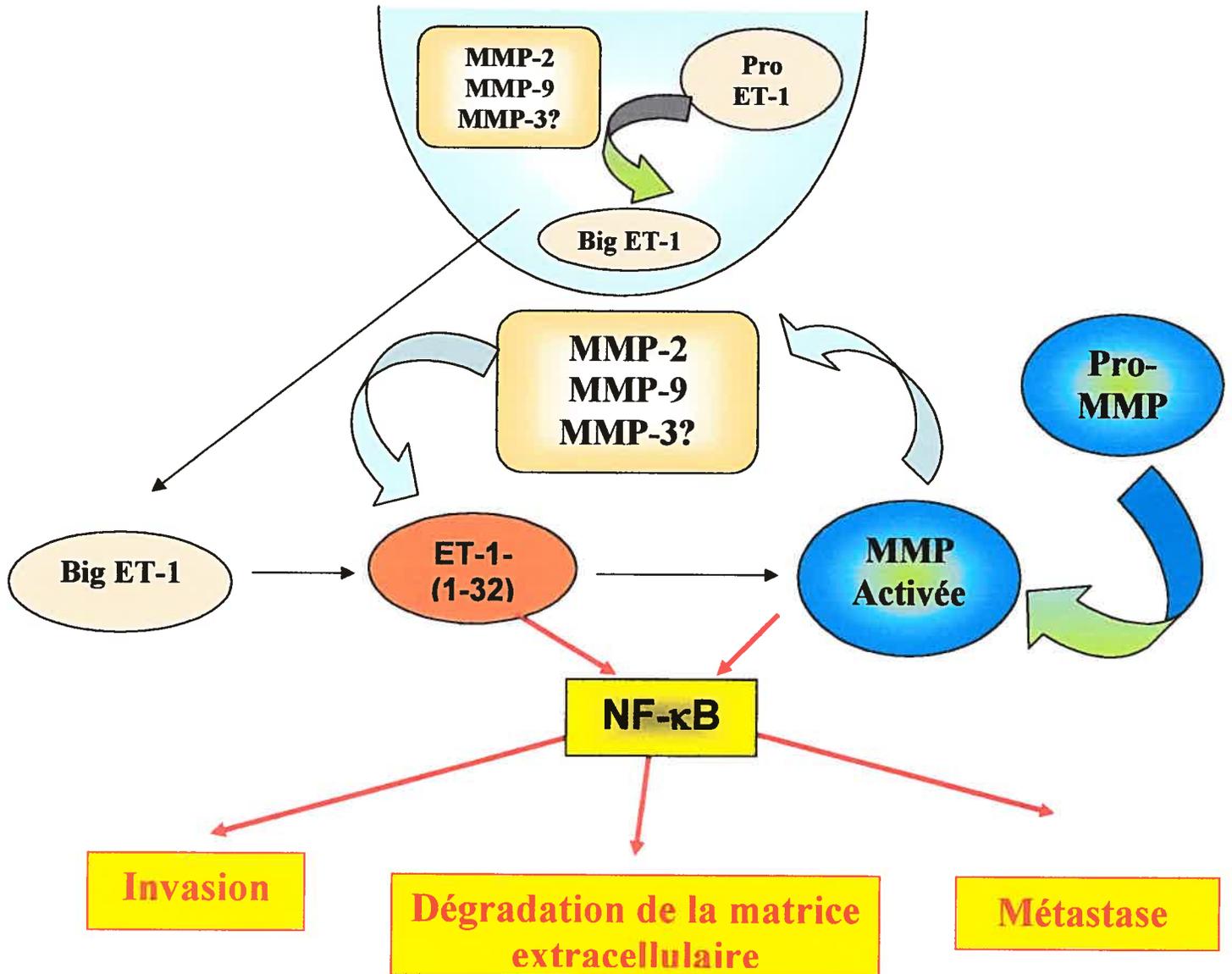


Figure 14 : Hypothèse des mécanismes responsables de l'invasion tumorale de l'ostéosarcome

CHAPITRE 7. LES SOURCES
DOCUMENTAIRES

1. Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 1998;273:4616-4621
2. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinases-2 is an interstitial collagenase : inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4 length fragments. *J Biol Chem* 1995;270:5872-5876
3. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK. Expression of collagenase-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 1999;80(5-6):733-743
4. Ali H., Loizidou M., Dashwood M., Savage F., Sheard C., Taylor I. (2000) Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ETA antagonists. *Gut.* 47, 685-688
5. Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, Rosier RN, Goater JJ, Lewis GD, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ. NFκB : a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin Orth Rel Res* 2003;415S:75-85
6. Asham EH., Shankar A., Loizidou M., Fredericks S., Miller K., Boulos PB., Burnstock G., Taylor I. (2001) Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ETA receptor antagonism. *Br. J. Cancer.* 85, 1759-1763
7. Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling. *Biochem J* 1999;340:171-181

8. Aung L, Gorlick R, Healey JH, Shi W, Thaler HT, Shorter NA, Huvos AG, Meyers PA, Metachronous skeletal osteosarcoma in patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):342-8.
9. Bacci G, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Ruggeri P, Versari M, Picci P. Primary high-grade osteosarcoma Comparison between preadolescent and older patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27 (3):129-134
10. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of FN-kappaB in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-179
11. Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res*. 2004 Feb 15;64(4):1436-43
12. Bagnato A., Salani D., Di CV., Wu-Wong JR., Tecce R., Nicotra MR., Venuti A., Natali PG. (1999) Expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma : evidence for an autocrine role in tumour growth. *Cancer Research*. 59, 720-727
13. Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell. Science*. 115, 3719-3727
14. Beard C, Buswell L, Rose MA, Noll L, Johnson D, Coleman CN. Phase II trial of external beam radiation with etanidazole (SR 2508) for the treatment of locally advanced prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29(3):611-616
15. Bek E, McMillen M. Endothelins are angiogenic. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:S135-S139

16. Benassi MS, Gamberi G, Magagnoli G, Molendini L, Ragazzini P, Merli M, Chiesa F, Balladelli A, Manfrini M, Bertoni F, Mercuri M, Picci P. Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 2001;12(1):75-80
17. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Yamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744
18. Bergers G., Javaherian K., Lo K., Folkman J., Hanahan D. (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 284,808-812
19. Berry P, Burchill S. Endothelins may modulate invasion and proliferation of Ewing's sarcoma and neuroblastoma, *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103 Suppl 48:322S-326S
20. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002;20:776-790
21. Birekedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birekedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinase: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250
22. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Act*. 2005;1755:37-69
23. Bjornland K, Winberg JO, Odegaard OT, Hovig E, Loennechen T, Aasen AO, Fodstad O, Maelandsmo GM. S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4702-8.

24. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett* 2002;524:43-48
25. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 1998;435:29-34
26. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases : a tail of a frog that became a prince. *Mol Cell Biol* 2002;3:207-214
27. Brown PD, Davidson AH, Drummond AH, Gearing A, Whittaker M. Matrix metalloproteinase inhibition in cancer therapy
28. Carducci M, Nelson JB, Bowling K, Rogers T, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Donehower R, Leahy TL, Carr RA, Isaacson JD, Janus TJ, Andre A, Hosmane BS, Padley RJ. Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J Clin Oncol*. 2002 Apr 15;20(8):2171-80. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2003 Jun 15;21(12):2449.
29. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 1997;72:155-161
30. Chantrain C., DeClerck Y.A. (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Médecine/Science*. 18, 565-75
31. Chiao W, Moonga BS, Yang Y, Kancherla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, Ahmed T. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone reabsorption. *Br J Cancer* 2000;83:360-365

32. Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M. Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient-mice. *Dev Biol* 2002;217:10-24
33. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998;161:6845-6852
34. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295:2387-2392
35. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621-1630
36. D'Orleans-Juste P., Plante M., Honoré J. C., Carrier E., Labonté J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81, 503-510
37. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993;67(5):1126-1131
38. De Blasio A, Messina C, Santulli A, Mangano V, Di Leonardo E, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP, in human osteosarcoma MG-63 cells. *FEBS Lett.* 2005 Jan 31;579(3):615-20.
39. DeClerk, Y.A. (2000) Interactions between tumour cells and stroma cells and proteolytic modification of the extra cellular matrix by MMPs in cancer, *Eur. J. Cancer* 36, 1258-68

40. Denault JB., Claing A., D'Orleans-Juste P., Sawamura T., Kido T., Masaki T., Leduc R. (1995) Processing of proendothelin-1 by human furine convertase. FEBS Lett. 362, 276-80
41. Devita VT., Hellman S, Rosenberg SA., (1997) CANCER, Principles and Practice of oncology, Vol.2, 5th Édition, par Lippincott Raven
42. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. Cell 1997;88:801-810
43. Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, Laule M, Baumann G, Stangl K. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist. Attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor- κ B. Circ Res 2003;92:32-40
44. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Cancer 2002;2:161-174
45. Enneking W.S. (1989) Musculoskeletal tumor staging: 1998 update. Cancer treatment research 44,39-49
46. Estrada-Aguilar J, Greenberg H, Walling A et al. Primary treatment of pelvic osteosarcoma. Report of five cases. Cancer. 1992;69:1137-1145
47. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. FASEB J. 2001 Oct;15(12):2230-40.
48. Fernandez-Patron C., Radomski M. W., Davidge S. T. (1999) Vascular MMP-2 cleaves big ET-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ. Res. 85, 906-911

49. Ferrari C, Benassi MS, Ponticelli F, Gamberi G, Ragazzini P, Pazzaglia L, Ballardelli A, Bertoni F, Picci P. Role of MMP-9 and its tissue inhibitor TIMP-1 in human osteosarcoma. *Acta Orthop Scand* 2004;75(4):487-491
50. Ferrari-Bravo A., Franciosi C., Lissoni P., Fumagalli L., Uggeri F. Effects of oncological surgery on endothelin-1 secretion in patients with operable gastric cancer. 2000 *Int. J. Biomarkers*. 15, 56-57
51. Foukas AF, Deshmukh NS, Grimer RJ, Mangham DC, Mangos EG, Taylor S. Stage-IIB osteosarcoma around the knee. A study of MMP-9 in surviving tumour cells. *J Bone Joint Surg* 2002;84-B:706-11
52. Fuchs B., Pritchard D. (2002) Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*. 397, 40-52
53. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, de e Nictolis M, Garbisa S, Masiero L, Romanini C, Graziella B. Tissue and serum metalloproteinase (MMP-2) expression in advanced ovarian serous cystadenocarcinomas: clinical and prognostic implications. *Anticancer Res*. 1995 Nov-Dec;15(6B):2799-804.
54. Gasparini M, Rouesse J, van Oosterom A et al. Phase II study of cisplatin in advanced osteogenic sarcoma. European Organization for Research on Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Treat Rep*. 1985;69:211-213
55. Ghosh S, May M, Kopp E. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60

56. Gilroy DW, Saunders MA, Sansores-Garcia L, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. Cell cycle-dependent expression of cyclooxygenase-2 in human fibroblasts *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):288-90
57. Glasser DB, Lane JM, Huvos AG, Marcove RC, Rosen G. Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. *Cancer* 1992;69:698-708
58. Gohji K, Fujimoto N, Hara I, Fujii A, Gotoh A, Okada H, Arakawa S, Kitazawa S, Miyake H, Kamidono S, Nakajima M. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer*. 1998 Feb 20;79(1):96-101.
59. Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, Arndt C et al. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res* 2003;9:5442-5453
60. Grant K., Loizidou M., Taylor I. (2003) Endothelin-1 : a multifunctional molecule in cancer. *British Journal of cancer*. 88, 163-166
61. Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C, Balkwill FR. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 2004;64:2461-2468
62. Grimshaw MJ. Endothelins in breast tumour cell invasion. *Cancer Letters* 2005;222:129-138
63. Guise AT, Yin JJ, Mohammad KS. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastase. *Cancer Supp* 2003;97(3):779-784
64. Gurney JG, Swenson AR, Bulterys M, Malignant bone tumours . In : Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al., eds. *Cancer Incidence and survival among children and adolescents : United*

States SEER Program 1975-1995. Bethesda, MD:National Cancer Institute, SEER Program, 1999:99-110

65. Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70

66. Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):849-60

67. Herzog CE. Overview of Sarcomas in the Adolescent and Young Adult Population. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27:215-218

68. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T1-2N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treatm* 2003; 77:85-91

69. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T et al. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:S11-S14

70. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ788. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4892-4896

71. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ et al. Degradation of interleukin-1 β by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996;271:14657-14660

72. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase-A deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048-1051

73. Johansson N., Ahonen M., Kähäri VM., (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57, 5-15
74. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. (1998) RNA quantitation by fluorescence-based solution assay : Ribogreen reagent characterization. *Anal. Biochem*. 265, 368-74
75. Kähäri V.-M, Saarialho-Kere U. (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann. Med*. 31, 34-45
76. Kähäri V.-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6:199-213
77. Kikuchi K, Nakagawa H, Kaduno T, Etoh T, Byers HR, Mihm MC, Tamaki K. Decreased ETB receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1996;219:734-739
78. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, deBont ESJM. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Oncol Hematol* 2004;50:87-100
79. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994;368:703-710
80. Kusuhara M., Yamaguchi K., Nagasaki K., Hayashi C., Hori S., Handa S., Nakamura Y., Abe K. (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Research*. 50, 3257-3261
81. Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) but not for TIMP-2 protein

is associated with a favourable prognosis in aggressive breast carcinoma. *Oncology* 2005 (in press)

82. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004 ;49 :187-198

83. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 2002 Apr;21(3):251-62

84. Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 1998;37:4699-4702

85. Link MP, Eilber F. Osteosarcoma, in Pizzo PA, Poplack DG (eds) : *Principles and Practice of Pediatric oncology* (ed 3). Philadelphia, PA, Lippencott-Raven, 1997, pp889-920

86. Link MP, Goorin AM, Miser AW et al, The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N. Engl J Med* 1986;314:1600-1606

87. Liotta LA., Tryggvason K., Garbisa S., Hart I., Foltz CM., Shafie S.(1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 284, 67-68

88. Liu SJ, Hu GF, Liu YJ, Liu SG, Gao H, Zhang CS, Wei YY, Xue Y, Lao WD. Effect of human osteopontin on proliferation, transmigration and expression of MMP-2 and MMP-9 in osteosarcoma cells. *Chin Med J* 2004;117(2):235-240

89. Loukopoulos P, O'Brien T, Ghoddsi M, Mungall BA, Robinson WF. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Res in Vet Science* 2004;77:131-141
90. MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kDa gelatinase B is expressed by advance stage melanoma cells: suppression by somatic cells hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res* 1995;55(18):4174-4181
91. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R, Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The Oncologist*. 2004;9:422-441
92. Marina NM, Pratt CB, Rao BN et al, Improved prognosis of children with osteosarcoma metastatic to the lung(s) at the time of diagnosis. *Cancer* 1992;70:2722-2727 Erratum in *Cancer* 1993;71:2879
93. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* 1999;375:133-138
94. McCawley L. J., Matrisian L. M. (2001) Matrix metalloproteinases : they're not just for matrix anymore. *Current opinion in cellular Biology*. 13, 534-540
95. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells:AP-1 as secondary anti-oxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993;12:2005-2015
96. Meyers PA, Heller G, Healey JH et al. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol* 1993;11:449-453

97. Meyers PA, Schwartz CL, Bernstein M et al. Addition of ifosfamide and muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin and high-dose methotrexate improves event free survival (EFS) in localized osteosarcoma (OS). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:367a
98. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleiner ES and al. Osteosarcoma : A randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 2005;23:2004-2011
99. Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* 2001;276(50):47402-47410
100. Nakamuta M., Ohashi M., Tabata S., Tanabe Y., Goto K., Narise M., Narise K., Hiroshige K., Nowata H. (1993) Raised plasma concentration of endothelin-like immunoreactivity in patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 88, 248-252
101. Nakopoulou L, Katsarou S, Giannopoulou I, Alexandrou P, Tsirmpa I, Panayotopoulou E, Mavrommatis J, Kermopoulos A. Correlation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 with proliferative activity and patients survival in breast cancer. *Mod Pathol* 2002;15:26-34
102. Nambi P., Wu HL., Lipshutz D., Prabhakar U. (1995) Identification and characterization of endothelin receptors on rat osteoblastic osteosarcoma cells: down-regulation by 1,25-dihydroxy-vitamin D3. *Mol Pharmacol.* 47(2), 266-71
103. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis : emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:110-116

104. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson S, Opgenorth TJ, Bora G. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996;56:663-668
105. Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon BD, Chung LW, Inoue N. New bone formation in an osteoblastic tumour model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by ETA receptor blockade. *Urology* 1999;53:1063-1069
106. Nelson JB., Hedican SP., George DJ., Reddi AH., Piantasposi S., Eisenberger MA., Simons JW. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med.* 1, 994-999
107. Ntayi C, Homebeck W, Bernard P. Implication des métalloprotéinases matricielles (MMPs) dans la progression du mélanome cutané. *Pathol Biol* 2004 ;52 :154-159
108. Okada Y, Nara K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N et al. Localization of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts : implications for bone resorption. *Lab Invest* 1995;72:311-322
109. Ossowski L, Reich E (1983) Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis, *Cell*, 35 : 611-619
110. Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. Potential roles of osteopontin and $\alpha V\beta 3$ integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9308-13

- 111.Pao M, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, Jones P. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumour cells. *Hum Mol Genet* 2001;10:903-910
- 112.Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997;272:28823-28825
- 113.Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin E. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* 1997;272:17097-17103
- 114.Peduto-Eberl L, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin J, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;86:182-187
- 115.Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces Nuclear factor κ B-mediated pro-matrix metalloproteinase-2 activation through $I\kappa$ B α /IKK signalling pathways, and curcumin (diferulolymethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem* 2003;278(16):14487-14497
- 116.Pinot F. À quoi sert le système endothéline ? *Medecine Sciences* 2004 ;20 :339-345
- 117.Pochanugool L, Subhadharaphandou T, Dhanachai M, Hathirat P, Sangthawan D, Pirabul R, et al. Prognostic factor among 130 patients with osteosarcoma. *Clin Orthop* 1997;345:206-14
- 118.Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA. Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2202-2207

119. Pratt CB, Howarth C, Ransom JL et al. High-dose methotrexate used alone and in combination for measurable primary or metastatic osteosarcoma. *Cancer Treat Rep* 1980;64:11-20
120. Pratt CB, Shanks EC. Doxorubicin in treatment of malignant solid tumors in children. *Am J Dis Child* 1974;127:534-536
121. Price CH. Primary bone-forming tumour and their relationship to skeletal growth. *J Bone Joint Surg Br.* 1958;40:574-593
122. Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Kakonen S, Swoboda B. Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone. *Calcif Tissue Int.* 2000 Sep;67(3):230-40
123. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells *Diabetes* 2000;49:1561-1570
124. Ramos-Desimone N., Hahn-Dantona E., Siple J., Nagase H., French D. L., Quigley J. P. Activation of MMP-9 via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *Journal of biological chemistry.* 1999 (274) 19, 13066-13076
125. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/I κ B α kinase-dependant nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 2004;279 (37) :38921-38935

126. Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003;106:745-751
127. Remacle AG, Noel A, Duggan C, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, Duffy MJ. Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer*. 1998 Mar;77(6):926-31
128. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):753-62
129. Rosano L, Spinella F, Salani D, Di Castro V, Venuti A, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003 May 15;63(10):2447-53
130. Rosano L, Varmi M., Salani D., Di CV., Spinella F., Natali PG., Bagnato A. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. 2001 *Cancer Research*. 61, 8340-8346
131. Rubanyi GM, Polokoff MA, Endothelins : molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46:325-415
132. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Matrix metalloproteinase-2 expression correlates with morphological and immunohistochemical epithelial characteristics in synovial sarcoma. *Histopathology* 2002;40:279-285
133. Salani D, Di CV, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, Natali PG, Bagnato A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000a;157:1537-1547

- 134.Salani D., Taraboletti G., Rosano L., Di Castro V., Borsotti P., Giavazzi R., Bagnato A. (2000b) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *In vivo*. Am. J. of pathology. 157, 1703-1711
- 135.Sasaki T, Hong MH, Endothelin-1 localization in bone cells and vascular endothelial cells in rat bone marrow. Anat Rec 1993;237:332-337
- 136.Sasaki T, Hong MH. Localization of endothelin-1 in the osteoclast. J Electron Microsc 1993;42:193-196
- 137.Sehgal G, Hua J, Bernhard EJ, Sehgal I, Thompson TC, Muschel RJ. Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma. Am J Pathol. 1998 Feb;152(2):591-6.
- 138.Shapiro S.D. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix : biological consequences. Current opinion cellular biology. 10, 602-608
- 139.Shioide M et Noda M. Endothelin modulates osteopontin and osteocalcin messenger ribonucleic acid expression in rat osteoblastic osteosarcoma cells., J Cell Biochem. 1993 Oct;53(2):176-80
- 140.Soderstorm M, Aro HT, Ahonen M, Johansson N, Aho A, Efkers T, Bohling T, Kähäri VM, Vuorio E. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrosarcomas. APMIS 2001;109:305-315
- 141.Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling.Exp Oncol. 2004 Sep;26(3):179-84.

142. Sugii M, Ohkita M, Taniguchi M, Baba K, Kawai Y, Tahara C, Takaoka M, Matsumura Y. Xanthoangelol D isolated from the roots of *Angelica keiskei* inhibits endothelin-1 production through the suppression of nuclear factor- κ B. *Biol Pharm Bull* 2005;28(4):607-610
143. Suzuki T, Watanabe K., Kasukawa R., Suzuki T. (1998) Immunohistochemical localisation of endothelin-1/big endothelin-1 in normal liver, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Fukushima J. Med. Sci.* 44, 93-105
144. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer*. 1998 Sep 15;83(6):1153-62.
145. Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. High preoperative serum TIMP-1 is a prognosis indicator for survival in breast carcinoma. *Breast Res Cancer Treatm* 2005;89:29-34
146. Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 level is prognostic in breast carcinoma. *Cancer Lett* 2005;217:237-242
147. Thomas G, Moffatt P, Salois P, Gaumond MH, Gingras R, Godin E, Miao D, Goltzman D, Lanctôt C. Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem* 2003;278(50):50563-50571
148. Thorpe W, Loeb W, Hyatt C et al. Alkaline phosphatase measurements of paired normal and osteosarcoma tissue cultured lines obtain from the same patient. *Cancer Res.* 1979;39:277-279
149. Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC. Matrix metalloproteinases : pathway of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 2004;9:53-61

150. Turek SL, (1959) ORTHOPAEDICS, Principles and their Application, par J.B. Lippincott Company
151. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 2005;87:287-297
152. Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of the human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol* 1996;180(3):283-289
153. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;93:411-422
154. Weber GF The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Dec 28;1552(2):61-85
155. Westerlund A, Apaja-Sarkkinen M, Hoyhtya M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinase A-immunoreactive protein in ovarian lesions-prognostic value in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1999 Oct;75(1):91-8.
156. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792
157. Westermarck J, Seth A, Kähäri VM. Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* 1997;14:2651-2660

158. Wittig, James C. (2002) Osteosarcoma : A multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *American Family Physician*. (65) 6, 1123-32
159. Woods M, Wood EG, Bardswell SC, Bishop-Bailey D, Barker S, Wort SJ, Mitchell JA, Warner TD. Role for nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2003;64:923-931
160. Wulfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Greb AA et al. Endothelin-1, endothelin-A and endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* 2004;11:791-796
161. Yamashita J., Ogawa M., Inada K., Yamashita S., Matsuo S., Takano S. (1991) A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.* 74, 363-369
162. Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF : effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* 1999;100:5-8
163. Yin JJ, Mohammad KS, Käkönen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM, Guise TA. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases.
164. Yohn JJ, Smith C, Stevens T, Hoffman TA, Morelli JG, Hurt DL, Yanagisawa M, Kane MA, Zamora MR. Human melanoma cells express functional endothelin-1 receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;201:449-457

165. Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4052-4057
166. Chen X, Macica CM, Dreyer BE, Hammond VE, Hens JR, Philbrick WM, Broadus AE, Initial Characterization of PTH-Related Protein Gene-Driven lacZ Expression in the Mouse. *J Bone Miner Res.* 2006 Jan;21(1):113-23
167. Guise TA, Kozlow WM, Heras-Herzig A, Padalecki SS, Yin JJ, Chirgwin JM, Molecular mechanisms of breast cancer metastases to bone. *Clin Breast Cancer.* 2005 Feb;5 Suppl(2):S46-53. Review
168. Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005 Apr;10(2):169-80. Review
169. Schluter KD, Katzer C, Piper HM. A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET(A) receptors. *Br J Pharmacol.* 2001 Jan;132(2):427-32
170. Yang D, Guo J, Divieti P, Bringhurst FR., Parathyroid hormone activates PKC-delta and regulates osteoblastic differentiation via a PLC-independent pathway. *Bone.* 2005 Nov 29.