

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**Profil d'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la
PARP-1 et de l'ezrine dans l'ostéosarcome humain**

par

Marie-Claude Guyot

Université de Montréal

Faculté de Médecine

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

Août 2007

© Marie-Claude Guyot, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Profil d'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la
PARP-1 et de l'ezrine dans l'ostéosarcome humain

présenté par :
Marie-Claude Guyot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Adel Kauzman, président-rapporteur
Florina Moldovan, directeur de recherche
Alain Moreau, co-directeur
Hassan Fahmi, membre du jury

Résumé

La mise en évidence de marqueurs biologiques de l'ostéosarcome humain est très importante puisqu'à ce jour, il n'existe aucune molécule pouvant prédire la progression de ce cancer. Le profil d'expression de l'endothéline-1 (ET-1), de l'ostéocrine, de la PARP-1 ainsi que de l'eitrine représente de bons candidats en tant que marqueurs du caractère agressif de l'ostéosarcome. En effet, un niveau d'expression élevé de l'ET-1, de la PARP-1 ainsi que de l'eitrine a été mise en évidence dans des tissus tumoraux ainsi qu'au niveau du gène des cellules dérivées d'ostéosarcomes de hauts grades. Quant à l'expression de l'ostéocrine, un patron d'expression inverse et ce, tant au niveau génique qu'au niveau protéique a été établi. Des études *in vivo* ont également appuyé le rôle important du récepteur ET_A de l'endothéline dans le développement d'une tumeur induite *in vivo* chez la souris *nude*. Cette étude suggère, pour la première fois, un lien entre le patron d'expression de ces quatre molécules et le grade histologique de l'ostéosarcome. Ces molécules sont d'autant plus importantes vu leurs rôles dans la carcinogenèse, plus précisément dans l'apparition et le développement d'une tumeur osseuse. De plus, cette étude souligne l'implication de divers gènes dans la pathogenèse de l'ostéosarcome, ce qui ouvre plusieurs portes d'étude dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent le développement de l'ostéosarcome humain.

Mots-clés : ostéosarcome, endothéline-1, ostéocrine, PARP-1, eitrine, PTHrP, grade, métastase, progression tumorale.

Abstract

Highlighting biological markers in human osteosarcoma is very important since, to this day, there is no existing molecule that can predict the clinical behaviour of this malignancy. The expression profiles of endothelin-1 (ET-1), osteocrin, PARP-1 and ezrin represent good marker candidates for the aggressive character of osteosarcoma. Indeed, a high expression level of endothelin-1, PARP-1 and ezrin has been highlighted in tumoral tissues and also at the gene level of high grade osteosarcoma derived cells. As for the expression of osteocrin, an inverse expression was established for both gene and proteic levels. *In vivo* studies have supported the important role of endothelin ET_A receptor in the development of a tumor induced *in vivo* on *nude* mice. This study suggests for the first time, a link between the expression pattern of these four molecules and the histologic grade of osteosarcoma. These molecules are that much more important due to their role in cancerogenesis, specifically in the appearance and development of bone tumors. Furthermore, this study underlines the implication of diverse genes in the pathogenesis of osteosarcoma, which opens several avenues of study in the pursuit of understanding the mechanisms that control the development of human osteosarcoma.

Keywords: osteosarcoma, endothelin-1, osteocrin, PARP-1, ezrin, PTHrP, grade, metastasis, tumoral progression.

Table des matières

Page 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 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1 L'OSTÉOSARCOME	5
2.1.1 Généralités.....	5
2.1.2 Caractéristiques anatomiques et histologiques.....	5
2.1.2.1 Le grade.....	6
2.1.2.1.1 Différenciation des ostéoblastes	6
2.1.2.1.2 Dédifférenciation des ostéoblastes (anaplasie).....	8
2.1.2.2 Le stade	8
2.1.3 Classement de l'ostéosarcome	9
2.1.3.1 Ostéosarcome central (intramédullaire).....	9
2.1.3.2 Ostéosarcome de surface (périphérique).....	10
2.1.4 Étiologie.....	10
2.1.4.1 Agents environnementaux.....	11
2.1.4.2 Facteurs héréditaires	11
2.1.4.2.1 Syndromes héréditaires	11
2.1.4.2.2 Le rétinoblastome (Rb).....	11
2.1.4.3 Facteurs moléculaires.....	12
2.1.5 Traitements de l'ostéosarcome.....	12
2.1.5.1 Traitements de chimiothérapie	13

2.1.5.1.1	Amélioration des traitements.....	14
2.1.5.1.2	Traitements actuels	14
2.1.6	Études cliniques.....	15
2.1.7	Les modèles animaux	16
2.1.8	L'ostéosarcome et l'angiogenèse	17
2.1.9	Facteurs pronostics	18
2.2	L'ENDOTHÉLINE-1.....	19
2.2.1	Généralités	19
2.2.2	Synthèse de l'endothéline-1	20
2.2.3	Le rôle de l'ET-1 <i>in vivo</i>	20
2.2.4	Récepteurs de l'endothéline-1.....	21
2.2.4.1	Le récepteur ET _A	21
2.2.4.2	Le récepteur ET _B	21
2.2.5	L'endothéline-1 et la PTHrP	22
2.2.6	L'endothéline-1 et la carcinogenèse.....	22
2.2.6.1	La prolifération cellulaire	23
2.2.6.2	L'apoptose.....	23
2.2.6.3	La progression tumorale	23
2.2.6.4	L'angiogenèse tumorale.....	24
2.2.7	Endothéline et traitement du cancer	24
2.2.7.1	Expression des récepteurs ET _A et ET _B	24
2.2.7.1.1	Inhibiteurs des récepteurs ET _A et ET _B	25
2.3	L'OSTÉOCRINE.....	26
2.3.1	Généralités	26
2.3.2	Structure.....	26
2.3.3	Expression de l'ostéocrine	27
2.3.3.1	Expression dans l'os	27
2.3.3.2	Expression chez les femmes ménopausées.....	28
2.3.4	Expression de l'ostéocrine et différenciation des ostéoblastes.....	28
2.4	La PARP-1.....	29
2.4.1	Généralités	29
2.4.2	Structure.....	29

2.4.3	Fonction de la PARP-1	30
2.4.3.1	Réaction de poly (ADP-ribosyl) ation	30
2.4.3.2	Mort cellulaire par apoptose.....	31
2.4.3.3	Nécrose versus apoptose.....	31
2.4.4	PARP-1, nouvelle cible thérapeutique.....	32
2.4.4.1	Inhibiteurs de la PARP-1 et la carcinogenèse	32
2.5	L'EZRINE	33
2.5.1	Généralités	33
2.5.2	Structure.....	33
2.5.3	Fonctions de l'ezrine	34
2.5.4	Activation/inactivation de l'ezrine	34
2.5.4.1	Activation de la voie de signalisation Rho	35
2.5.5	L'ezrine et le cancer	36
2.6	HYPOTHÈSE	36
2.7	OBJECTIFS	37
CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES		38
3.1	Lignée cellulaire.....	39
3.2	Tissus humains.....	39
3.3	Isolation des cellules à partir des tumeurs osseuses.....	40
3.4	Culture cellulaire.....	40
3.5	Test de la phosphatase alcaline.....	41
3.6	Extraction et dosage de l'ARN	41
3.7	RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).....	42
3.8	Extraction et dosage des protéines totales.....	44
3.9	Précipitation à l'acide trichloroacétique.....	44
3.10	Buvar dage de type Western.....	44
3.11	Densitométrie.....	45
3.12	Coloration éosine/hématoxyline	46
3.13	Immunohistochimie	46
3.14	Expériences in vivo	48
3.15	Considérations éthiques.....	48

3.16	Analyses statistiques	49
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....		50
4.1	Expression de l'ET-1 et de ces récepteurs dans l'ostéosarcome humain.....	51
4.2	Expression de l'ostéocrine (ostn) dans l'ostéosarcome humain	55
4.3	Expression de la PARP-1 dans l'ostéosarcome humain.....	61
4.4	Expression de l'ezrine dans l'ostéosarcome humain	65
4.5	Effet de l'antagoniste du récepteur ET _A sur la taille des tumeurs induites <i>in vivo</i>	69
4.6	Évaluation histologique des poumons et des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	73
4.7	Expression des protéines candidates : l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 et l'ezrine dans les tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	78
4.8	Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines	83
CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....		85
5.1	Profil d'expression des protéines candidates dans l'ostéosarcome humain .	86
5.1.1	L'endothéline-1 et ces récepteurs.....	86
5.1.2	La PTHrP	87
5.1.3	L'ezrine.....	88
5.1.4	L'ostéocrine	90
5.1.5	La PARP-1	91
5.2	Effet du BQ-123, sur une tumeur induite <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	93
5.2.1	Effet du BQ-123 sur le développement d'une tumeur induite <i>in vivo</i>	93
5.2.2	Effet du BQ-123 sur l'expression des potentiels marqueurs de la progression tumorale	94
CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		96
RÉFÉRENCES.....		101
ANNEXES.....		129
	Article Felx <i>et al.</i> , 2006	130

Liste des tableaux

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
Tableau I Stades de l'ostéosarcome selon le Système Enneking.....	9
Tableau II Catégories et sous-type d'ostéosarcomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé	10
CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	38
Tableau III Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines utilisées lors de l'étude	40
Tableau IV Amorces et conditions pour la réaction de PCR	43
Tableau V Anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages de type Western	45
Tableau VI Anticorps primaires utilisés pour la technique d'immunohistochimie.....	47
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....	50
Tableau VII Analyses statistiques de l'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1 et de l'ezrine, suite à des immunohistochimies réalisées sur des coupes de tissus d'ostéosarcomes humains.....	69
Tableau VIII Effet de l'antagoniste du récepteur ET _A (BQ-123) sur la taille d'une tumeur induite <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	70
Tableau IX Analyses statistiques de l'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1 et de l'ezrine, suite a des immunohistochimies réalisées sur des coupes de tissus des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez quatre souris <i>nude</i>	83
Tableau X Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines.....	84

Liste des figures

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
Figure 1 Gènes nécessaires à la différenciation des cellules pluripotentes mésenchymateuses en ostéoblastes différenciés et expression des différents marqueurs des ostéoblastes au cours de la différenciation cellulaire.	7
 CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....	50
Figure 2 Expression du gène de l'endothéline-1 (ET-1), de ces récepteurs (ET _A et ET _B) et de la PTHrP dans des ostéoblastes humains.	52
Figure 3 Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans des tissus d'ostéosarcomes humains.	53
Figure 4 Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans un tissu de tumeur à cellules géantes.	54
Figure 5 Expression du gène de l'ostéocrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	57
Figure 6 Expression protéique de l'ostéocrine (Ostn) dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	58
Figure 7 Expression protéique de l'ostéocrine dans des tissus d'ostéosarcomes humains.	59
Figure 8 Expression protéique de l'ostéocrine dans un tissu de tumeur à cellules géantes.	60
Figure 9 Expression du gène de la PARP-1 dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	62
Figure 10 Expression protéique de la PARP-1 dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	63
Figure 11 Expression protéique de la PARP-1 dans des tissus d'ostéosarcomes humains.	64
Figure 12 Expression du gène de l'ezrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	66
Figure 13 Expression protéique de l'ezrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.	67

Figure 14	Expression protéique de l'ezrine dans des tissus d'ostéosarcomes humains.....	68
Figure 15	Radiographies démontrant l'effet de l'antagoniste du récepteur ET _A sur la taille d'une tumeur induite <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	71
Figure 16	Apparence macroscopique des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	72
Figure 17	Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des coupes de poumons de souris <i>nude</i> ayant reçu des injections de PBS (contrôle).....	74
Figure 18	Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des coupes de poumons de souris <i>nude</i> ayant reçu des injections de BQ-123.....	75
Figure 19	Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i> ayant reçu des injections de PBS (contrôle).....	76
Figure 20	Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i> ayant reçu des injections de BQ-123.....	77
Figure 21	Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	79
Figure 22	Expression protéique de l'ostéocrine dans des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	80
Figure 23	Expression protéique de la PARP-1 dans des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	81
Figure 24	Expression protéique de l'ezrine dans des tumeurs induites <i>in vivo</i> chez la souris <i>nude</i>	82

Liste des sigles et abréviations

ADM : Doxorubicine

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

Akt: Focal Adhesion Kinase

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor

BMP2: Bone morphogenetic Protein 2

BRCT: Breast Cancer Susceptibility Protein C-Terminus

Cbfa1: Core-Binding Factor Alpha 1

CD44: CD44 molecule (Indian blood group)

CDP: Cisplatine

COG: North American Children's Oncology Group

COSS: German-Austrian-Swiss Cooperative Osteosarcoma Study Group

DAB : Diamino-3,3'benzidine

ECE: Enzyme de Conversion de l'Endothéline

EGF: Epidermal Growth Factor

EPB41: Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1

EOI : European Osteosarcoma Intergroup

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

ERM : Ezrin/Radixin/Moesin

ET-1 : Endothéline-1

irET-1 : Endothéline-1 Immunoréactive

ET-2 : Endothéline-2

ET-3 : Endothéline-3

ET_A : Récepteur A de l'endothéline

ET_B : Récepteur B de l'endothéline

FAK : Focal Adhesion Kinase

FBJ: Finkel, Biskis and Jinkins

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

HEK 293: Human Embryonic Kidney cells

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
IFO: Ifosfamide
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MDM2 : Murine Double Minute 2
MMP : Métalloprotéase Matricielle
MTX : Méthotrexate
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OPN: Ostéopontine
OS: Ostéosarcome
Ostn: Ostéocrine
p53: Protein 53
PARP: poly (ADP-ribose) polymérase
PBS: Phosphate Buffer Saline
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PDTC: Pyrrolidinecarbodithioic Acid
PI3K: Phospho-Inositide 3 Kinase
PIP₂: Phosphatidylinositol 4, 5-Biphosphate
PPET-1: Préproendothéline-1
PTHrP: Parathyroid-hormone-related peptide
PTH: Parathyroid-hormone
Rb: Rétinoblastome
RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Runx2: Runt-Related Transcription Factor 2
SEER: Surveillance Epidemiology and End Results
SLIT: Sustained release Lipid Inhalation Targeting
SSG: Scandinavian Sarcoma Group
TBS : Tris Buffer Saline
TCG: Tumeur à Cellules Géantes
TGFβ: Transforming Growth Factor
TIMP: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases
TP53: Tumor Protein p53
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Remerciements

Je tiens à remercier Florina Moldovan, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et pour m'avoir permise de travailler sur ce projet d'étude. Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche, Alain Moreau, pour sa disponibilité, mais surtout pour ses connaissances scientifiques. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour leurs précieux conseils et pour avoir contribué à travailler dans un endroit motivant et chaleureux.

Merci à tous les membres du laboratoire ainsi qu'à tout ceux qui m'ont aidé et supporté lors de ce projet de maîtrise. Je voudrais également remercier Mélanie Felix pour m'avoir initiée au projet de recherche. Je tiens à remercier tout particulièrement Kareen Letellier, Mathilde Cancel, Karen Dahan et Dominique Leboeuf pour leur écoute et leur soutien lors de ma rédaction.

Je remercie Ginette Lacroix pour sa disponibilité et son aide à la collecte des tissus et des données cliniques.

Je tiens à remercier le Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine ainsi que le Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse du FRSQ pour les fonds attribué pour la participation aux différents congrès scientifiques.

Et finalement, un merci spécial à mes parents et surtout à mon copain, Mathieu Gagnon, pour m'avoir encouragé et supporté tout au long de ma maîtrise.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

L'ostéosarcome (OS) est la tumeur primaire de l'os la plus commune en pédiatrie. Cette tumeur maligne est caractérisée par une forte agressivité, ce qui cause l'apparition très précoce des métastases pulmonaires (Arndt *et al.*, 1999; Marina *et al.*, 2004). Au cours des 25 dernières années, plusieurs progrès importants ont été réalisés, dont le plus considérable correspond à la mise en place des traitements de chimiothérapie pré et post-opératoire (Rosen *et al.*, 1982). Grâce à l'élaboration de ce protocole durant les années 1980, le taux de survie des patients à cinq ans est passé de 12%, suite à une exérèse complète de la tumeur, à 60%-70% (Bacci *et al.*, 2000; Renard *et al.*, 1999). Cependant, depuis l'arrivée de ces traitements, les progrès dans ce domaine de recherche ont atteint un plateau. En effet, bien que certains nouveaux médicaments aient été introduits, comme le cisplatine, l'ifosfamide et l'étoposide, le taux de survie ne dépasse toujours pas les 75% et le pronostic est imprévisible (Bacci *et al.*, 2000). En effet, le principal problème est que certaines tumeurs avec un bon pronostic peuvent évoluer subitement en tumeurs très agressives suite aux phénomènes de dédifférenciation cellulaire. Cet événement de transformation serait le résultat d'un dysfonctionnement des gènes qui interviennent dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion et l'apoptose des cellules. L'ET-1, l'ostéocrine, l'ezrine et la PARP-1 interviennent respectivement dans ces processus, et leur profil d'expression pourrait être utilisé en tant que marqueurs biologiques prédictifs de l'évolution de l'ostéosarcome.

L'ET-1, en tant que mitogène, joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la carcinogénèse. Plusieurs études, incluant les résultats de notre laboratoire, indiquent que le blocage des récepteurs de l'ET-1 influence l'invasion des cellules et le développement des métastases (Felx *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2003). Felx *et al.*, ont démontré *in vitro* que le récepteur ET_A est une cible thérapeutique à considérer afin de limiter le pouvoir invasif des cellules d'ostéosarcomes humains, bien que ces résultats *in vitro* nécessitent d'être renforcés par des études *in vivo* pour confirmer le rôle du récepteur ET_A dans la progression tumorale de l'ostéosarcome.

L'ostéocrine (ostn), impliqué dans la différenciation des ostéoblastes, est une autre molécule importante à étudier dans l'ostéosarcome (Bord *et al.*, 2005). Cette molécule démontre un patron d'expression plus élevé dans les os jeunes, puisque le processus de différenciation des cellules osseuses est très sollicité (Komori, 2006).

Établir une corrélation entre l'expression de cette protéine et le grade de l'ostéosarcome pourrait démontrer que l'ostéocrine est un bon candidat en terme de biomarqueur de l'ostéosarcome et pourrait conférer un effet protecteur aux ostéoblastes.

L'implication de la PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymérase) dans la pathogenèse de l'ostéosarcome semble importante. En effet, plusieurs papiers ont étudié l'expression de cette molécule dans diverses pathologies et cancers (Zhang *et al.*, 1994). Ces études mettent en évidence le rôle primordial de la PARP-1 lors du processus d'apoptose (Ha *et al.*, 2000). Une corrélation entre les niveaux d'expression de la PARP-1 et le grade de l'ostéosarcome démontrerait l'implication cruciale de cette molécule dans l'ostéosarcome.

Une autre molécule candidate, l'ezrine, a été étudiée dans le cadre de l'apparition des métastases de divers cancers. Cette protéine est surexprimée chez les patients ayant le cancer de la prostate et ayant développé des métastases. De récentes études abondent dans le même sens en ce qui concerne l'ostéosarcome humain (Khanna *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2002). L'ezrine semble donc un bon candidat comme marqueur de l'apparition des métastases chez les gens atteints d'un ostéosarcome. L'ezrine, mis en commun avec d'autres molécules comme le système de l'ET-1, l'ostéocrine et la PARP-1, permettrait d'augmenter la fiabilité de ce marqueur chez les gens atteints d'un ostéosarcome.

Malgré l'évidence de l'implication de ces molécules dans la carcinogenèse, aucun travail de recherche n'a étudié le système de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1, ainsi que de l'ezrine en tant que biomarqueur de l'ostéosarcome humain. L'analyse du profil d'expression de ces molécules pourrait contribuer à donner un meilleur pronostic aux patients atteints d'un ostéosarcome en plus d'aider dans le développement de nouveaux traitements contre cette tumeur maligne de l'os.

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 L'OSTÉOSARCOME

2.1.1 Généralités

L'ostéosarcome (OS) est une tumeur primitive maligne de l'os qui représente moins de 0,2% de tous les cancers humains (Papachristou *et al.*, 2007). Ce type de tumeur affecte principalement les enfants et les adolescents (Arndt *et al.*, 1999; Marina *et al.*, 2004). Plus précisément, ce cancer représente 2,5% de tous les cancers touchant les enfants et les adolescents (0-19 ans) au Canada (Canadian Cancer Society, 2007) et 2,4% aux États-Unis (American Cancer Society, 2007). L'ostéosarcome est la tumeur primitive maligne de l'os la plus répandue et la plus diagnostiquée (47%) devant le sarcome d'Ewing (27%) et le chondrosarcome (15%) (Marina *et al.*, 2004). Chez les personnes âgées, l'ostéosarcome survient souvent suite à une pathologie préexistante, comme la maladie de Paget (Hansen, 2002). L'ostéosarcome s'observe donc principalement chez les enfants et les adolescents de 10 à 20 ans, touchant plus souvent les garçons que les filles selon un ratio garçon : fille de 1,6 :1 (Rytting *et al.*, 2000). Plus précisément, cette tumeur maligne de l'os affecte les enfants avec un âge moyen de 16 ans pour les filles et de 18 ans pour les garçons. Cette différence d'âge est due à la période rapide de la croissance osseuse qui arrive un peu plus tôt chez le sexe féminin, comparativement au sexe masculin (Gurney *et al.*, 1999; Rytting *et al.*, 2000).

2.1.2 Caractéristiques anatomiques et histologiques

L'ostéosarcome est une tumeur maligne de l'os qui se caractérise par la production anormale de matrice osseuse et d'ostéoïde par les cellules tumorales (Dahlin *et al.*, 1967; Longhi *et al.*, 2006). Ce type de tumeur peut toucher tous les os du corps, mais on la retrouve préférentiellement au niveau de la métaphyse des os longs. Près de 50% des ostéosarcomes chez l'enfant et le jeune adulte se développent autour du genou (Dahlin *et al.*, 1967; Weinfeld *et al.*, 1962). Plus précisément, l'ostéosarcome se situe principalement au niveau distal du fémur (40%), au niveau proximal du tibia (15%) ainsi qu'au niveau proximal du fémur et de l'humérus (14%). Ces localisations correspondent aux segments osseux ayant une croissance très élevée. Les atteintes au niveau de la diaphyse sont peu fréquentes (moins de 10%) et ceux au

niveau de l'épiphyse sont encore plus rares (Mankin *et al.*, 2004; Stiller *et al.*, 2001). L'ostéosarcome peut aussi se développer au niveau du squelette axial dans environ 10% des cas. Lors de cette situation, le site le plus commun chez l'enfant est au niveau du pelvis (Marina *et al.*, 2004). La tumeur à cellules géantes (TCG) est une tumeur bénigne de l'os qui représente 5% des néoplasies osseuses (Gamberi *et al.*, 2003). Les principaux sites d'atteinte sont les mêmes que pour l'ostéosarcome, soit au niveau des os longs, principalement la proximité distale du fémur (Miszczyk *et al.*, 2001). La caractéristique première de cette tumeur osseuse est sa capacité à la destruction locale et son faible risque de métastases à distance. De plus, les patients atteints de ce type de tumeur ont généralement un excellent pronostic, vu la nature bénigne et peu agressive de cette tumeur osseuse (Lewis *et al.*, 2007).

2.1.2.1 Le grade

Le grade de l'ostéosarcome est déterminé selon la classification de Broders (Broders *et al.*, 1939). Cette classification détermine le grade de la tumeur, allant de 1 à 4, selon le degré de différenciation des cellules tumorales. Plus le grade est bas, plus les cellules de la tumeur sont différenciées et meilleur est le pronostic. Ainsi, un ostéosarcome de grade 1 est caractérisé par la présence de cellules différenciées allant de 100% à 50%, une tumeur de grade 2 est composée de 75% à 50% de cellules différenciées, une tumeur de grade 3 est composée de 50% à 25% de cellules différenciées et finalement, une tumeur de grade 4 est composée de moins de 25% de cellules différenciées, donc cette tumeur est composée à plus de 75% de cellules dédifférenciées (Broders *et al.*, 1939; Unni *et al.*, 1984).

2.1.2.1.1 Différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont les cellules osseuses qui assurent principalement le remodelage osseux. Le cycle de remodelage est caractérisé par différentes phases, dont la première consiste à la différenciation des ostéoclastes. Une fois que les ostéoclastes sont matures, ils résorbent la matrice osseuse, ce qui permet l'activation, donc la différenciation des ostéoblastes précoces en ostéoblastes matures. Les ostéoblastes se différencient sous le contrôle de plusieurs gènes. Ainsi, Runx2/Cbfa1, Ostérix et la β -caténine sont des facteurs de transcription essentiels

pour la différenciation des ostéoblastes (Komori, 2006). Plus précisément, Runx2/Cbfa1 permet aux cellules pluripotentes mésenchymateuses de se différencier en pré-ostéoblastes, en plus d'inhiber leur différenciation en adipocytes ou en chondrocytes (Komori *et al.*, 1997). Le complexe Runx2/Cbfa1 est essentiel à l'initiation de la différenciation des ostéoblastes (figure 1).

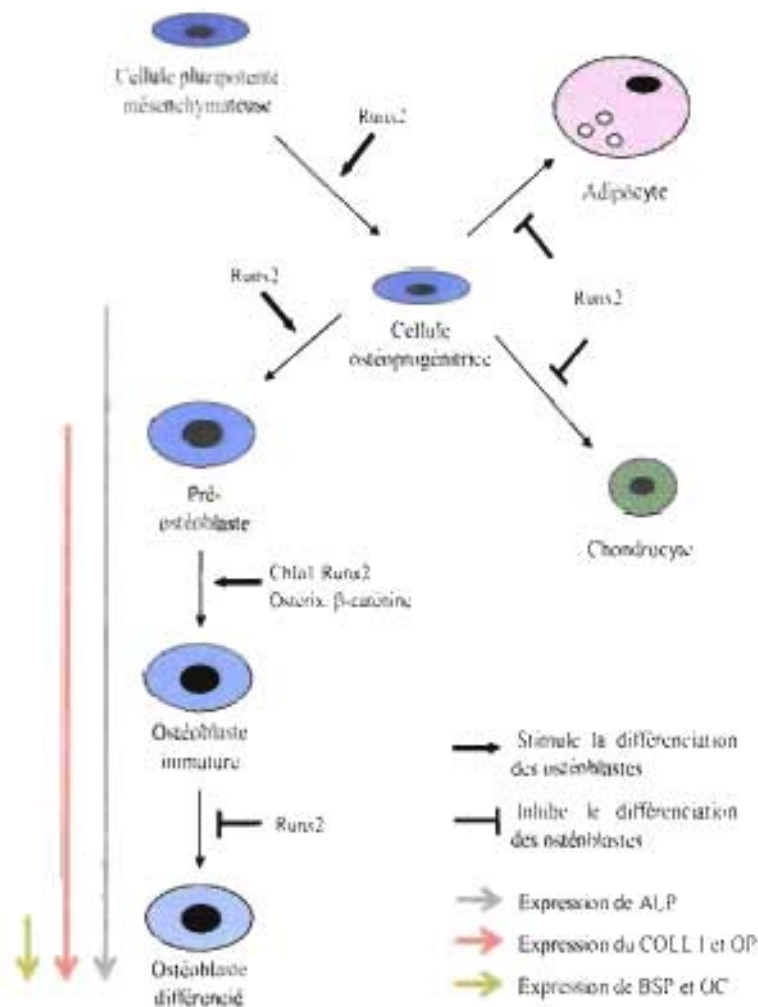


Figure 1 : Gènes nécessaires à la différenciation des cellules pluripotentes mésenchymateuses en ostéoblastes différenciés et expression des différents marqueurs des ostéoblastes au cours de la différenciation cellulaire. (ALP : phosphatase alcaline, COLL I : collagène de type I, OP : ostéopontine, BSP : sialoprotéine osseuse, OC : ostéocalcine).

La β -caténine est quant à elle plus particulièrement impliquée dans la différenciation des ostéoblastes, plus spécifiquement au stade de pré-ostéoblaste (Day *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005). Quant au facteur de transcription Ostérix il permet aux pré-ostéoblastes de se différencier en ostéoblastes immatures (Nakashima *et al.*, 2002). Au cours de la différenciation de l'ostéoblaste, différents marqueurs sont exprimés de façon séquentielle par la cellule. En fait, l'ostéoblaste exprime des marqueurs de différenciation précoces, des marqueurs de prolifération cellulaire ainsi que des marqueurs de minéralisation (figure 1) (Komori, 2006).

2.1.2.1.2 Dédifférenciation des ostéoblastes (anaplasie)

Les cellules tumorales sont caractérisées par une perte de différenciation. Ce processus, appelé dédifférenciation cellulaire ou anaplasie, est défini par le fait que les cellules tumorales qui composent la tumeur perdent en grande partie, voir complètement, leurs caractères morphologiques et fonctionnels. Plus précisément, les cellules deviennent plus fusiformes, il y a présence d'atypie nucléaire et les noyaux ont une forme plutôt irrégulière (Longhi *et al.*, 2006). De plus, il y a production d'ostéoïde (Dahlin *et al.*, 1967; Longhi *et al.*, 2006). Plus la tumeur est composée de cellules dédifférenciées et plus cette tumeur est agressive.

2.1.2.2 Le stade

Le stade des tumeurs osseuses est déterminé selon le système Enneking (tableau I). Ce système classe les tumeurs malignes de l'os selon le grade (bas grade, haut grade), l'étendue anatomique locale (intracompartmentale ou extracompartmentale) en plus de préciser s'il y a présence ou non de métastases (Enneking *et al.*, 1980). Selon cette classification, seuls les patients qui présentent des métastases à distance ont une tumeur de stade III. Quant au statut compartimental, il est déterminé selon l'extension de la tumeur par rapport au cortex (Marina *et al.*, 2004). Ainsi, si la tumeur n'a pas atteint le cortex, on parlera d'une tumeur intracompartmentale et dans le cas où la tumeur a franchi le cortex on dira qu'elle est extracompartmentale. Les ostéosarcomes sont principalement diagnostiqués au stade IIB selon le système Enneking.

Tableau I : **Stades de l'ostéosarcome selon le système Enneking.** G1 : lésion de bas grade, G2 : lésion de haut grade, T1 : lésion intracompartmentale, T2 : lésion extracompartmentale, M0 : sans métastase, M1 : métastases distantes.

Stade	Grade	Topographie	Diffusion Métastatique
IA	G1	T1	M0
IB	G2	T2	M0
IIA	G2	T1	M0
IIB	G2	T2	M0
III	G1 ou G2	T1 ou T2	M1

On dénombre peu d'ostéosarcome au stade IIA car les ostéosarcomes de haut grade atteignent le cortex très tôt lors du développement de la tumeur. Ainsi, la majorité des ostéosarcomes qui se développent chez les enfants sont des lésions de haut grade au stade IIB ou III, selon s'il y a présence ou non de métastases à distance (Marina *et al.*, 2004). Le stade de la tumeur a une influence majeure sur le choix des traitements thérapeutiques.

2.1.3 Classement de l'ostéosarcome

La classification des ostéosarcomes est basée sur des critères histologiques, en particulier sur le type de différenciation des cellules ainsi que du type de matrice extracellulaire qu'elles produisent. L'ostéosarcome se divise en deux grandes classes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (Fernandez-Patron *et al.*) : l'ostéosarcome central (intramédullaire) et l'ostéosarcome de surface (périphérique). Chacune de ces catégories renferme plusieurs sous-types.

2.1.3.1 Ostéosarcome central (intramédullaire)

L'ostéosarcome central est le plus fréquent des cas d'ostéosarcomes. Cette catégorie regroupe l'ostéosarcome conventionnel, l'ostéosarcome télangiectasique, l'ostéosarcome bien différencié (de bas grade) ainsi que l'ostéosarcome à petites cellules rondes (tableau II). Toutes ces formes, sauf la forme dite bien différenciée, sont hautement malignes (Schajowicz *et al.*, 1995). Parmi les ostéosarcomes

intramédullaires, l'ostéosarcome conventionnel (à haut grade) est de loin celui qui est le plus souvent diagnostiqué, soit dans environ 75% des cas (Dahlin *et al.*, 1967). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'ostéosarcome conventionnel est réparti en trois sous-classe : ostéoblastique, chondroblastique et fibroblastique. Ce classement est basé sur le type de matrice majoritairement produite par les cellules tumorales.

2.1.3.2 Ostéosarcome de surface (périphérique)

La catégorie ostéosarcome de surface, est composée de l'ostéosarcome périosté, l'ostéosarcome juxtacorticale (parostal) et l'ostéosarcome de haut grade (tableau II), selon l'OMS.

Tableau II : Catégories et sous-type d'ostéosarcomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

Ostéosarcome.	
Central (Intramédullaire)	De Surface (Périphérique)
Conventionnel (de haut grade)	Périosté
Télangiectasique	Juxtacorticale (parostal)
Bien différencié (de bas grade)	À haut grade
À petites cellules rondes	

2.1.4 Étiologie

Les connaissances sur les causes de l'ostéosarcome ne sont pas évidentes. Cependant, il existe certains facteurs de risque qui sont en partie responsable de l'apparition d'une tumeur osseuse maligne. Ces facteurs sont séparés en trois classes : les agents environnementaux, les facteurs héréditaires et les facteurs moléculaires.

2.1.4.1 Agents environnementaux

Une origine chimique (Dutra *et al.*, 1950; Tapp, 1966) ou virale (Fuchs *et al.*, 2002), une radiation (Longhi *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 1975) ou encore un traumatisme (Aboulafia *et al.*, 1999) pourrait être à l'origine de l'apparition d'un ostéosarcome. Ces causes ont surtout été étudiées chez le lapin et le rongeur. Plus spécifiquement, le silicate de zinc béryllium et l'oxyde de béryllium ont été étudiés chez le lapin et le virus FBJ (Finkel, Biskis and Jinkins) chez la souris (Fuchs *et al.*, 2002).

2.1.4.2 Facteurs héréditaires

Bien que la plupart des cas d'ostéosarcomes soient sporadiques, un faible pourcentage des tumeurs est dû à une prédisposition génétique (Gelaw *et al.*, 2004; Quesnel *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Woods, 1998).

2.1.4.2.1 Syndromes héréditaires

Une association entre certains syndromes héréditaires et l'apparition d'un ostéosarcome est bien documentée dans la littérature. De façon plus précise, les gens atteints du syndrome de Bloom (German, 1997; Woods, 1998), du syndrome Rothmund-Thompson (Gelaw *et al.*, 2004) et du syndrome de Li-Fraumeni (Quesnel *et al.*, 1999; Varley *et al.*, 1997) ont un facteur de risque beaucoup plus élevé de développer un ostéosarcome. Le syndrome de Li-Fraumeni est le mieux documenté par rapport à l'ostéosarcome. Ce syndrome est caractérisé par une mutation du gène TP53, gène qui code pour la protéine p53. Cette protéine est un suppresseur de tumeur qui exerce son action via le cycle cellulaire, plus spécifiquement au point de contrôle lors de la transition de la phase G1 à la phase S (Zamzami *et al.*, 2005). Une mutation du gène TP53 dérègle le cycle cellulaire, ce qui permet à une cellule anormale de ne pas mourir via le mécanisme de l'apoptose et ainsi de se multiplier (Lane, 1992).

2.1.4.2.2 Le rétinoblastome (Rb)

Une autre association a été faite en ce qui concerne certaines formes du rétinoblastome (Rb) et l'apparition subséquente d'un ostéosarcome. Au départ, ces ostéosarcomes ont été associés à la radiation subie par la personne pour traiter le

rétinoblastome. Cependant, l'ostéosarcome se développe ailleurs que dans la région de l'orbite, site du rétinoblastome. Ceci indique qu'une mutation du gène Rb est plutôt responsable de l'apparition de l'ostéosarcome (Mitelman, 2000; Scholz *et al.*, 1992). Une personne ayant un rétinoblastome héréditaire a 500 fois plus de risque qu'une personne en santé de développer un ostéosarcome (Gurney *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2001).

2.1.4.3 Facteurs moléculaires

Certains facteurs moléculaires sont associés à la pathogenèse de l'ostéosarcome. Plus précisément, diverses études démontrent que plusieurs proto-oncogènes, dont *c-myc* et *c-fos*, sont surexprimés dans l'ostéosarcome (Ladanyi *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1990). Il est déjà établi dans la littérature que la surexpression de HER2 (human epidermal growth factor receptor-2), est associée à un mauvais pronostic pour les femmes atteintes d'un cancer du sein (Slamon *et al.*, 1987). Selon l'étude de Onda et collaborateurs, une surexpression de ce proto-oncogène serait aussi associée avec un mauvais pronostic pour l'ostéosarcome (Morris *et al.*, 2001; Onda *et al.*, 1996). En fait, l'étude de Fellenberg et collaborateurs spécifie qu'une surexpression de HER2 corrèle avec une mauvaise réponse histologique suite aux traitements pré-opératoires de chimiothérapie. Ceci explique donc la raison pour laquelle une surexpression de HER2 mène à un mauvais pronostic chez les gens atteint d'un ostéosarcome (Fellenberg *et al.*, 2004). Plusieurs autres facteurs, dont MDM2, BMP2, PDGF, TGF α , ont été étudiés dans la pathogenèse de l'ostéosarcome (Fuchs *et al.*, 2002; Marina *et al.*, 2004; Wang, 2005). Ces facteurs contribuent à mieux comprendre l'initiation et la progression de la tumeur osseuse, puisque la plupart de ces facteurs interviennent dans le cycle cellulaire.

2.1.5 Traitements de l'ostéosarcome

Environ 15% à 20% des patients présentent des métastases détectables à l'aide de radiographies (Kaste *et al.*, 1999; Meyers *et al.*, 1997). Le site principal des métastases est les poumons (Fitzgerald *et al.*, 1973; Meyers *et al.*, 1997) mais les métastases peuvent aussi se retrouver, plus rarement, au niveau d'autres os ou des tissus mous (Jeffrey *et al.*, 1975; Kaste *et al.*, 1999). En présence de métastases

disséminées, l'atteinte du système nerveux central (Marina *et al.*, 1993) ou d'autres sites peuvent être identifiées (Jeffrey *et al.*, 1975). La mort dans ces cas est souvent due à la progression des métastases pulmonaires (Meyers *et al.*, 1997).

Depuis le milieu des années soixante-dix, les techniques pour traiter l'ostéosarcome ont grandement évoluées. À cette époque, seule la chirurgie ou la radiothérapie étaient utilisées dans le traitement de l'ostéosarcome. De plus, suite à une chirurgie, le taux de survie à cinq ans était de 12% et trois personnes sur quatre décédaient dans les deux ans suivant leur diagnostic (Friedman *et al.*, 1972; Longhi *et al.*, 2006; Weinfeld *et al.*, 1962). Pour ces raisons, divers traitements de chimiothérapie ont été élaborés et mis en place. Plusieurs médicaments ont donc été utilisés lors d'études pionnières, comme le Vincristine, le Bleomycine et le Dactinomycine. Ces médicaments ont cependant été abandonnés quelques temps après, vu leurs très minces effets bénéfiques chez le patient (Avella *et al.*, 1988; Meyers *et al.*, 1992). La Doxorubicine (ADM) et le Méthotrexate (MTX) ont été les premiers médicaments utilisés pour traiter efficacement l'ostéosarcome (Campanacci *et al.*, 1981; Enneking, 1979). Depuis, deux autres médicaments, le Cisplatine (CDP) et l'Ifosfamide (IFO) ont été ajoutés à la liste des produits pour les traitements de l'ostéosarcome humain (Bacci *et al.*, 2002; Kraker *et al.*, 1989).

2.1.5.1 Traitements de chimiothérapie

Les traitements de chimiothérapie adjuvants sont très importants puisqu'ils ont la capacité d'éliminer toutes traces de micro métastases et ainsi augmenter le taux de survie du patient. Rosen et collaborateurs ont introduit au début des années quatre-vingts les traitements de chimiothérapie néoadjuvants, soit des traitements administrés avant l'exérèse de la tumeur (Rosen *et al.*, 1982). Ces traitements préopératoires ont deux objectifs : détruire les cellules cancéreuses de la tumeur primaire pour ainsi en diminuer la taille, en plus de tester la réponse face aux médicaments utilisés lors de la chimiothérapie (réponse histologique). De cette façon, il est possible d'évaluer si la combinaison de médicaments utilisés est appropriée, puisqu'il existe plusieurs combinaisons possibles pour le traitement des tumeurs osseuses malignes (Ferrari *et al.*, 2007; Rosen *et al.*, 1982). La nécessité des traitements de chimiothérapie en complément d'une résection chirurgicale a fait ses preuves lors de deux importantes études randomisées. Les études de Link et

collaborateurs indiquent que le groupe expérimental, ayant reçu les traitements de chimiothérapie en plus de la chirurgie, présentait un taux de survie à deux ans supérieur au groupe contrôle, ayant seulement subi la chirurgie (66% vs 17%) (Eilber *et al.*, 1987; Link *et al.*, 1986). À plus long terme, la différence entre ces deux groupes de patients est toujours significative, puisque le taux de survie à cinq ans est de 66% pour le groupe expérimental versus 11% pour le groupe contrôle (Link *et al.*, 1991).

2.1.5.1.1 Amélioration des traitements

Ces progrès en matière de traitement ont grandement contribué à augmenter le taux de survie à cinq ans qui se situe maintenant entre 60% et 70% chez les patients n'ayant pas développé de métastases à distance (Bacci *et al.*, 2000; Renard *et al.*, 1999). De plus, la chimiothérapie pré et post-opératoire a permis de diminuer le taux d'amputation de façon drastique. En effet, avant 1980 les traitements conventionnels impliquaient presque systématiquement l'amputation du membre. Cependant, grâce à toutes les avancées médicales, l'amputation est désormais utilisée dans seulement 15% à 20% des cas (Wafa *et al.*, 2006).

2.1.5.1.2 Traitements actuels

À ce jour, les traitements pour l'ostéosarcome sont multidisciplinaires. En effet, les traitements pour ce type de tumeur maligne consiste à administrer de la chimiothérapie pré et post-opératoire, en plus de faire l'ablation chirurgicale de la tumeur selon des marges adéquates. Les traitements de chimiothérapie sont constitués de différents médicaments, dont le MTX à forte dose. Ce médicament a fait l'objet de plusieurs études et il en ressort que ce médicament est beaucoup plus efficace lorsqu'il est utilisé en combinaison avec un autre médicament, dont la Doxorubicine (Meyers *et al.*, 1992; Saeter *et al.*, 1991; Winkler *et al.*, 1988). Cependant, la Doxorubicine a un effet secondaire majeur. En effet, cette molécule appartenant à la famille des anthracyclines, provoque une augmentation du Ca^{+} dans le muscle cardiaque, ce qui peut aboutir à une insuffisance cardiaque dans certains cas (Doroshov, 1991; Henderson *et al.*, 1979; Olson *et al.*, 1990). Bien que le Méthotrexate soit très toxique et difficile à supporter, les traitements à fortes doses

sont à privilégier pour espérer un meilleur pronostic (Bacci *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 1992). Cependant, différentes études indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre un traitement à forte ou faible dose de MTX, dont celle de Krailo et collaborateurs ainsi que celle de Bramwell et collaborateurs (Bramwell *et al.*, 1992; Krailo *et al.*, 1987). Autrefois, les gens ayant des métastases pulmonaires lors du diagnostic de l'ostéosarcome avaient peu de chance de survivre à ce cancer. Aujourd'hui, il est possible de traiter ces métastases, lorsqu'elles sont d'emblée identifiées. En effet, suite aux traitements de chimiothérapie, l'équipe médicale peut procéder à l'exérèse chirurgicale complète de ses lésions pulmonaires, dans la mesure où la chirurgie le permet.

La grande difficulté avec les patients atteints d'un ostéosarcome est leur résistance face aux traitements de chimiothérapie. Heureusement, grâce aux traitements de chimiothérapie néo-adjuvant, des ajustements de médicaments peuvent se faire, suite à l'analyse histologique de la tumeur lors de sa résection. Vu le grand nombre de personnes qui sont résistantes aux traitements de chimiothérapie, différentes molécules sont en essai clinique. Ces nouveaux médicaments pourraient être utiles aux gens démontrant une résistance face aux médicaments conventionnels et pourraient réduire la toxicité des médicaments déjà sur le marché. Étant donné qu'il persiste plusieurs incohérences quant aux médicaments utilisés pour les traitements de chimiothérapie, quatre groupes majeurs de recherche dans le domaine de l'ostéosarcome existent; le COG (North American Children's Oncology Group), le COSS (German-Austrian-Swiss Cooperative Osteosarcoma Study Group), le EOI (European Osteosarcoma Intergroup) et le SSG (Scandinavian Sarcoma Group). Ces associations se sont regroupées afin de mener d'importantes études randomisées (Marina *et al.*, 2004).

2.1.6 Études cliniques

La collaboration entre les quatre grands groupes de recherche sur l'ostéosarcome a permis de mettre en place divers projets d'étude. Ainsi, une étude réalisée par ces quatre groupes de recherche, portant sur les diverses combinaisons possibles des médicaments de chimiothérapie (le Doxorubicine, le Cisplatine, le Méthotrexate à forte dose, l'Ifosfamide et l'Étoposide) ainsi que leurs différentes doses possibles, est présentement en phase clinique III chez des patients atteints d'un ostéosarcome de

grade élevé. Une étude de phase II est présentement en cours aux États-Unis par le COG. Cette étude vise à étudier 75 cas d'ostéosarcome de haut grade d'ici trois à quatre ans. Le traitement à l'étude est la combinaison des médicaments de chimiothérapie conventionnelle avec le Pamidronate. Ce médicament appartient à la classe des bisphosphates qui inhibe l'action des ostéoclastes, diminuant ainsi la résorption osseuse (Forin *et al.*, 2005). Une autre étude de phase II est menée par ces quatre équipes de recherche qui porte sur les patients ayant des métastases aux poumons. Le traitement consiste à l'inhalation en aérosol du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), mieux connu sous le nom de Sargramostime. Ce médicament interagirait avec la croissance des cellules cancéreuses, ce qui permettrait de réduire la taille de la tumeur. Il serait ainsi beaucoup plus facile d'enlever les métastases aux poumons de façon chirurgicale, suite à ce traitement. Une autre étude menée par un groupe de chercheurs des États-Unis (The Albert Einstein College of Medicine Montefiore Medical Center) porte sur le Cisplatine administré non pas par voie intraveineuse, mais plutôt par inhalation dans le but de traiter les métastases pulmonaires. L'inhalation du Cisplatine par la technique SLIT (Sustained release Lipid Inhalation Targeting) permettrait d'obtenir des niveaux plus élevés du médicament au niveau pulmonaire, tout en ayant une faible exposition systémique.

2.1.7 Les modèles animaux

L'utilisation des modèles animaux est une partie très importante en recherche, car il permet de mieux comprendre les divers mécanismes reliés à la pathologie. C'est dans cette optique que des modèles animaux et différentes lignées cellulaires d'ostéosarcome ont été élaborés. Les tous premiers modèles développés résultent de l'administration de produits radioactifs et de divers produits chimiques à des rongeurs au début des années 1930. D'autres recherches durant les années 1960 et 1970 ont mené au développement de plusieurs modèles d'animaux développant des ostéosarcomes lorsqu'ils sont exposés à un faisceau de radiation (Janik *et al.*, 1972), lors de l'inoculation d'isotopes radioactifs (Barnes *et al.*, 1970; Cobb, 1970) ou encore lors d'injections de virus oncogènes (Olson *et al.*, 1977). Cependant, les études réalisées sur ces modèles animaux ne démontraient pas suffisamment de rigueur scientifique, d'autant plus que le développement des tumeurs était souvent

imprévisible. Ainsi, des études récentes ont mis au point divers modèles animaux pour l'ostéosarcome. Parmi ces études, on retrouve l'ostéosarcome spontané chez le chien et la souris (Kirpensteijn *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1988), l'induction par radiation chez les rats Sprague-Dawley (Tinkey *et al.*, 1998) ainsi que l'implantation sous-cutanée de cellules cancéreuses chez la souris (Berlin *et al.*, 1993). En plus de ces modèles animaux, il existe plusieurs lignées cellulaires d'ostéosarcome. On retrouve entre autre, différentes lignées cellulaires dérivées d'ostéosarcomes murins, dont les UMR 106, les K7M2, et les K12. Les lignées cellulaires K7M7 et K12 proviennent de cellules d'ostéosarcome des souris BALB/c (Khanna *et al.*, 2000). Plus précisément, la lignée K7M7 a été développée suite à une injection de K7 dans le tibia proximal d'une souris BALB/c (Khanna *et al.*, 2001). Chez l'humain, il existe diverses lignées cellulaires, dont les MG-63, les MNNG/HOS, les SAOS-2 et les SJSA-1 (Pautke *et al.*, 2004; Rhim *et al.*, 1977).

2.1.8 L'ostéosarcome et l'angiogenèse

Le concept selon lequel le développement de la tumeur, sa croissance, son étendu et son invasion dépend de l'angiogenèse est largement reconnu et accepté dans le monde scientifique (Folkman, 1992; Thompson *et al.*, 1987). Dans un tissu normal, il existe une balance entre les inhibiteurs et les inducteurs de l'angiogenèse, tandis que dans un tissu néoplasique malin, cet équilibre est brisé (Quan *et al.*, 2006). Ainsi, les inducteurs de l'angiogenèse sont sur-exprimés, les inhibiteurs sont sous-exprimés ou encore il y a une combinaison des deux phénomènes (Folkman, 1971). La sur-expression des facteurs pro-angiogéniques augmente la néo-vascularisation de la tumeur, ce qui permet une croissance cellulaire plus soutenue, facilitant du même coup l'apparition de métastases hématogènes (Quan *et al.*, 2006). En effet, l'expression locale, dans les tumeurs, de facteurs pro-angiogéniques, comme VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor) a été démontrée dans plusieurs tumeurs malignes, incluant l'ostéosarcome humain (Handa *et al.*, 2000; Kaya *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999). Lee et collaborateurs ont démontré qu'il existe une corrélation positive entre l'expression de VEGF et le risque de développer de métastases à distance. Plus précisément, il existe cinq isoformes de VEGF (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206) produit via un épissage

alternatif. Ces isoformes semblent posséder des propriétés biologiques différentes et leur expression semble variée selon le type de tumeur ((Oshika *et al.*, 1998; Tokunaga *et al.*, 1998)). L'étude de Lee et collaborateurs, indiquent que VEGF121 est exprimé dans tous les cas d'ostéosarcomes étudiés, VEGF165 est exprimé dans 80% des cas et VEGF189 est exprimé dans 53%. En ce qui concerne les isoformes VEGF145 et VEGF206, aucun n'a été détecté dans les cas d'ostéosarcomes étudiés (Lee *et al.*, 1999). De plus, une expression élevée de ce facteur pro-angiogénique suggère un mauvais pronostic (Lee *et al.*, 1999).

2.1.9 Facteurs pronostics

Suite aux traitements de chimiothérapie, ainsi qu'à l'exérèse de la tumeur, le pronostic pour un ostéosarcome s'est grandement amélioré au cours des deux dernières décennies puisque le taux de survie à cinq ans est désormais de 60 à 70% chez les patients n'ayant pas développés de métastases à distance (Bacci *et al.*, 2000; Renard *et al.*, 1999). Cependant, en présence de métastases, ce taux chute drastiquement et il n'est plus que de 30% chez ces patients (Bacci *et al.*, 1998). En ce qui concerne les rechutes avec croissance locale de la tumeur, elles surviennent très rarement, soit entre 2% et 6% des cas. Elles sont principalement reliées à la précision de la chirurgie, mais surtout aux marges chirurgicales appliquées lors de l'exérèse de la tumeur (Bacci *et al.*, 1998).

Bien que plusieurs facteurs pronostiques aient été mis en évidence par des analyses multivariées, actuellement seule la taille de la tumeur, la présence de métastases et la réponse histologique sont utilisées pour déterminer le pronostic (Bieling *et al.*, 1996). Cependant, différentes études démontrent que le site de la tumeur primaire, le volume de la tumeur et l'âge du patient seraient aussi des facteurs pronostiques valides (Bacci *et al.*, 2005; Bielack *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2001). Le taux de phosphatase alcaline circulant et la lactate déshydrogénase sérique seraient d'autres paramètres à considérer pour établir un pronostic. Cependant, le rôle de ces facteurs, comme indice pronostic a été questionné par Pochanugool et collaborateurs. En effet, ils ont étudié 103 cas d'ostéosarcome et aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau de phosphatase alcaline et le pronostic (Pochanugool *et al.*, 1997).

Il persiste bien des controverses et il y a encore beaucoup de sujet de recherche a exploré sur l'ostéosarcome. En effet, l'identification de nouvelles molécules pourrait améliorer et surtout augmenter la fiabilité du pronostic de l'ostéosarcome, ce qui contribuerait à mieux comprendre le fonctionnement et surtout le développement de cette tumeur maligne de l'os. En fait, le développement de l'ostéosarcome fait intervenir plusieurs molécules, dont le facteur pro-angiogénique VEGF (Lee *et al.*, 1999). Ce facteur est d'ailleurs régulé à la hausse par l'ET-1. L'ET-1 est un puissant peptide qui pourrait être un élément clé dans la progression et la propagation des cellules tumorales. En effet, l'ET-1 exerce des effets prolifératifs en plus d'augmenter l'invasion cellulaire et la néoformation des vaisseaux (Felx *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2003). Récemment, le récepteur ET_A de l'endothéline a été proposé comme cible thérapeutique afin de limiter le pouvoir invasif des cellules d'ostéosarcomes humains, bien que ces résultats *in vitro* devraient être confirmés par des études *in vivo*.

2.2 L'ENDOTHÉLINE-1

2.2.1 Généralités

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur de 21 acides aminés qui exerce des effets mitogènes et pro-angiogéniques. Ce peptide a initialement été isolé des cellules endothéliales de l'aorte d'un porc (Yanagisawa *et al.*, 1988) et il comporte deux ponts disulfures qui sont reliés par des cystéines, ainsi qu'une extrémité carboxy-terminale. Quelques années plus tard, deux autres peptides de 21 acides aminés très semblables ont été identifiés comme étant l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3) par l'équipe de Inoue et collaborateurs (Inoue *et al.*, 1989). Ces trois isoformes sont produits par trois gènes différents et ils ont une très grande homologie de séquence. En effet, l'ET-2 a seulement trois acides aminés de différent de l'ET-1, tandis que l'ET-3 en a 6 de différent (Inoue *et al.*, 1989; Miyauchi *et al.*, 1999).

2.2.2 Synthèse de l'endothéline-1

L'ET-1 est ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est produite par plusieurs types cellulaires. *In vivo*, l'ET-1 est produite principalement par les cellules endothéliales mais aussi par d'autres types de cellules, dont les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, les myocytes cardiaques et les neurones (Battistini *et al.*, 1993). Le gène de l'ET-1 existe d'abord sous la forme d'une préproendothéline-1 (PPET-1) de 212 acides aminés. Ce précurseur est transformé en proendothéline-1 par une peptidase qui clive une courte séquence en N-terminal. Ce produit est par la suite clivé au niveau de deux sites dibasiques par une endopeptidase de la famille des subtilisine, la furine, pour former un intermédiaire biologique inactif appelé la big-ET-1, constitué de 38 acides aminés (Blais *et al.*, 2002). La big-ET-1 est à son tour clivée au niveau de la liaison Trp-Val par l'ECE (enzyme de conversion de l'endothéline) pour former le peptide final de 21 acides aminés, l'ET-1 active (D'Orleans-Juste *et al.*, 2003). La big-ET-1 peut aussi générer deux autres peptides, soit l'ET-1 [1-31] et l'ET-1 [1-32], lorsqu'elle est clivée par la métalloprotéase matricielle 2 (MMP2) et par la chymase, respectivement (Fernandez-Patron *et al.*, 1999; Kido *et al.*, 1998; Kishi *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1997).

2.2.3 Le rôle de l'ET-1 *in vivo*

L'importance physiologique de la conversion de la big-ET-1 en ET-1 est mise en évidence par le fait que l'ET-1 a une activité vasoconstrictrice d'environ 140 fois plus élevée que la big-ET-1. Quant à la pro-ET-1, ce peptide ne démontre aucune activité vasoconstrictrice (Rubanyi *et al.*, 1994). En plus d'être un puissant vasoconstricteur, l'ET-1 joue plusieurs autres rôles importants. Ainsi, l'ET-1 est impliquée dans le développement embryonnaire, rôle qui a été mis en évidence chez la souris par l'inactivation du gène de l'ET-1 (Kurihara *et al.*, 1995). Ce peptide est aussi impliqué dans l'homéostasie rénale (Laghmani *et al.*, 2001), dans le maintien du tonus vasculaire (Miyachi *et al.*, 1999) ainsi que dans l'angiogenèse (Cruz *et al.*, 2001). Le système endothéline joue aussi des rôles délétères importants dans le corps humain. Ainsi, ce peptide a un certain rôle dans l'athérosclérose (Boulanger *et al.*, 1992; Haug *et al.*, 2001; Martin-Nizard *et al.*, 1991), dans l'angiogenèse

tumorale (Egidy *et al.*, 2000) ainsi que dans la maladie d'Alzheimer (Eckman *et al.*, 2001).

2.2.4 Récepteurs de l'endothéline-1

Chez les mammifères, l'ET-1 agit via deux récepteurs, ET_A et ET_B (Martin *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Ces deux récepteurs possèdent chacun sept domaines trans-membranaires hydrophobes, dont les séquences n'ont que 59% d'homologie entre eux (Pinet, 2004). Ces récepteurs sont exprimés dans plusieurs types cellulaires, mais principalement dans les cellules musculaires lisses, dans les fibroblastes ainsi que dans les cellules endothéliales (Katwa *et al.*, 1993; Masaki *et al.*, 1999). Chaque récepteur active les mêmes protéines G, mais entraîne cependant des réponses différentes, selon le type cellulaire (Kloog *et al.*, 1989; Simonson *et al.*, 1990). Ainsi, plusieurs voies de signalisation sont activées via les récepteurs de l'ET-1, dont la voie de ERK, la voie de PI3K/Akt ainsi que la voie de FAK. Ces voies sont impliquées dans divers processus, dont la prolifération, l'invasion, la migration ainsi que dans la survie cellulaire (Cazaubon *et al.*, 2006).

2.2.4.1 Le récepteur ET_A

Ce récepteur a une affinité différente pour les différents isoformes de l'endothéline. Ainsi, ET_A possède une très forte affinité pour l'ET-1 et l'ET-2 et a une affinité plus faible pour l'ET-3 (Adachi *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Le récepteur ET_A est principalement exprimé dans les cellules musculaires lisses. De plus, lorsque l'ET-1 est liée au récepteur ET_A dans ce type cellulaire, l'action vasoconstrictrice est augmentée, ce qui mène à la contraction des vaisseaux sanguins et à la rétention du sodium (Goraca, 2002).

2.2.4.2 Le récepteur ET_B

Principalement exprimé dans les cellules endothéliales, le récepteur ET_B a la même affinité pour les trois isoformes de l'endothéline (Adachi *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Lorsque ce récepteur est couplé à l'ET-1 dans les cellules endothéliales, ceci mène à une action de vasodilatation ce qui permet la

diurèse et la relâche de l'oxyde nitrique (Goraca, 2002). Ce mécanisme permet donc de diminuer la pression sanguine.

2.2.5 L'endothéline-1 et la PTHrP

La PTHrP (parathyroid-hormone-related peptide) et la PTH (parathyroid hormone) sont deux peptides majeurs qui sont impliqués dans le développement et le remodelage osseux (Karaplis *et al.*, 1994). Plus précisément, la PTHrP est une hormone bien conservée entre les diverses espèces et qui est exprimée par différents tissus (Burtis, 1992). Cette hormone est codée par un seul gène, mais il existe plusieurs variantes, générées par épissages alternatifs et des modifications post-traductionnelles (Southby *et al.*, 1995). Cette hormone joue un rôle essentiel au niveau des os, plus particulièrement dans le processus de résorption osseuse/ossification. (Juppner *et al.*, 1991; Uy *et al.*, 1995). La PTHrP se lie à son récepteur PTH-1, ce qui permet d'activer différentes voies de signalisation, qui vont activer la différenciation des ostéoblastes (Mannstadt *et al.*, 1999). Schlüter et collaborateurs ont mis en évidence une ressemblance d'homologie structurale entre l'ET-1 et la PTHrP. Les travaux de cette équipe démontrent que la PTHrP peut se lier au récepteur ET_A de l'ET-1 dans des cellules cardiaques (Schluter *et al.*, 2001). De plus, cette interaction déclenche les mêmes effets que ceux engendrés par la liaison de l'ET-1 à son récepteur (Schluter *et al.*, 2001). L'expression de la PTHrP a été identifiées dans divers types de cancer. Elle est fortement élevée dans le cancer du sein (Southby *et al.*, 1990) ainsi que dans les métastases osseuses du cancer du poumon (Brandt *et al.*, 1991).

2.2.6 L'endothéline-1 et la carcinogénèse

L'ET-1 est impliquée dans plusieurs processus de la carcinogénèse, soit la prolifération cellulaire, l'apoptose, la progression tumorale ainsi que l'angiogénèse. Tout d'abord, en 1995 les travaux de Nelson et collaborateurs ont mis en évidence la présence d'un taux élevé de l'endothéline-1 immunoréactive (irET-1) dans le plasma d'hommes atteints de cancer de la prostate avec métastases. De plus, les lignées cellulaires humaines qui sont dérivées d'un cancer de la prostate démontrent la présence de l'ARNm de l'ET-1 ainsi que la sécrétion de irET-1 (Nelson *et al.*, 1995).

Par la suite, la même constatation a été faite dans divers cancers *in vivo*, dont le cancer de l'ovaire (Bagnato *et al.*, 1999), du sein (Yamashita *et al.*, 1991) et du foie (Suzuki *et al.*, 1998). Différentes études ont aussi mis en évidence l'implication du système de l'ET-1 dans d'autres cancers, dont le cancer du côlon (Asham *et al.*, 2001), des poumons (Filippatos *et al.*, 2001), du cerveau (Bagnato *et al.*, 2002; Venuti *et al.*, 2000), du rein (Nelson *et al.*, 2003), dans le méningiome (Pagotto *et al.*, 1995), dans le mélanome (Lahav *et al.*, 1999) et dans le sarcome de Kaposi (Bagnato *et al.*, 2001). Ces résultats mettent en évidence l'implication importante de l'ET-1 dans la carcinogenèse.

2.2.6.1 La prolifération cellulaire

Il a été démontré que l'ET-1 stimule la prolifération de plusieurs types de cellules, dont les ostéoblastes, les fibroblastes, les mélanocytes, les cellules du muscle lisse cardiaque ainsi que les cellules mésangiales glomérulaires (Bagnato *et al.*, 2004). Cette action est contrôlée via la production du facteur pro-angiogénique VEGF (Pedram *et al.*, 1997; Salani *et al.*, 2000b).

2.2.6.2 L'apoptose

En plus de promouvoir la prolifération cellulaire, l'ET-1 diminue l'activité apoptotique de certaines cellules cancéreuses. Diverses études ont mis en évidence cette fonction de l'ET-1 dans des fibroblastes de rat et des cellules épithéliales humaines (Filippatos *et al.*, 2001; Shichiri *et al.*, 1997; Wu-Wong *et al.*, 1997).

2.2.6.3 La progression tumorale

L'ET-1 influence également la progression tumorale, via la régulation de l'expression des MMP (métalloprotéinases matricielles), plus particulièrement la MMP2 et la MMP9 (Rosano *et al.*, 2001; Salani *et al.*, 2000b). D'autre part, la progression tumorale est favorisée par la diminution de la production de la TIMP1 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) et de la TIMP2 (Rosano *et al.*, 2001). L'ET-1 peut aussi moduler la croissance des métastases osseuses, comme Chiao et collaborateurs l'ont démontré dans le cancer de la prostate (Chiao *et al.*, 2000). La

progression tumorale est définie par le développement et l'invasion locale de la tumeur. Ce processus implique aussi le développement de métastases à distance.

2.2.6.4 L'angiogenèse tumorale

Finally, l'ET-1 favorise l'angiogenèse tumorale, ce qui contribue au développement de la tumeur (Grant *et al.*, 2003). En fait, l'ET-1 augmente l'effet de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, comme le facteur VEGF et PDGF (Pedram *et al.*, 1997; Salani *et al.*, 2000b). Ces facteurs augmentent de façon réciproque la production de l'ET-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, ce qui crée une boucle d'amplification de production des facteurs pro-angiogéniques. L'ET-1 module aussi plusieurs étapes de la néovascularisation, incluant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire, principalement des cellules endothéliales (Salani *et al.*, 2000b).

2.2.7 L'endothéline et traitement du cancer

Étant donnée que l'ET-1 joue un rôle important dans plusieurs étapes de la carcinogenèse, diverses études ont émis la possibilité de faire intervenir des inhibiteurs des récepteurs ET_A et ET_B pour contrer cet effet tumoral.

2.2.7.1 Expression des récepteurs ET_A et ET_B

Il existe une différence d'expression des récepteurs de l'ET-1 dans les tissus cancéreux, comparativement aux tissus sains. Ainsi, dans les tissus sains, les récepteurs ET_A et ET_B sont tous les deux exprimés. Dans les tissus cancéreux et dans les métastases par contre, le récepteur ET_A est dominant et dans certains cas, il y a même une perte totale du récepteur ET_B (Grant *et al.*, 2003). Cette régulation à la baisse du récepteur ET_B dans les tissus malins a d'ailleurs été proposée comme facteur pronostique. En effet, dans le sarcome d'Ewing et dans le neuroblastome, la diminution du récepteur ET_B est associée avec l'apparition de métastases ainsi qu'à une mauvaise réponse histologique suite aux traitements de chimiothérapie (Berry *et al.*, 2002).

2.2.7.1.1 Inhibiteurs des récepteurs ET_A et ET_B

Plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique de différents antagonistes des récepteurs de l'ET-1, dont le Bosentan, l'Atrasentan, le BQ-123, le BQ-788 et le Sitaxsentan, sur le traitement des tumeurs. Étant donné que l'ET-1 ainsi que le récepteur ET_A sont surexprimés chez les patients ayant le cancer de la prostate, l'Atrasentan a fait l'objet de plusieurs études. Ces études démontrent que l'Atrasentan bloque la prolifération cellulaire excessive provoquée par l'augmentation de l'ET-1. Des études cliniques de phase II démontrent l'efficacité de la prise orale d'Atrasentan chez des patients ayant le cancer de la prostate et étant réfractaire à l'hormonothérapie (Carducci *et al.*, 2003; Nelson, 2001).

L'étude de Bagnato et collaborateurs démontre que l'ARN de l'ET-1 ainsi que son récepteur ET_A sont surexprimés dans le cancer primaire de l'ovaire. En fait, le récepteur ET_A contribue à la progression de ce cancer en induisant la prolifération, la survie, l'invasion cellulaire ainsi que l'angiogenèse tumorale (Bagnato *et al.*, 1999). Parmi les différents antagonistes spécifiques du récepteur ET_A, l'Atrasentan (ABT-627) a été étudié dans le cancer de l'ovaire. Selon l'étude *in vivo* de Rosano et collaborateurs, le traitement avec l'Atrasentan diminuerait la taille de la tumeur de 65% chez les souris *nude* qui avaient développé une tumeur suite à une injection des cellules HEY (Rosano *et al.*, 2003). Toujours selon cette étude, la taille de la tumeur a diminué de 90% en taille, lorsque le traitement avec l'Atrasentan a été combiné avec le Paclitaxel, un produit qui active la voie de l'apoptose en inhibant l'activité anti-apoptotique de Bcl2 (Vaux *et al.*, 1988).

D'autres études *in vivo* démontrent l'implication importante du système endothéline dans divers cancers. Dans le cancer du côlon (Grant *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2003), du sein (Alanen *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 1991), de l'ostéosarcome (Felx *et al.*, 2006), dans le mélanome (Lahav *et al.*, 1999) et dans le sarcome de Kaposi (Bagnato *et al.*, 2001), une réponse favorable face aux antagonistes du récepteur ET_A et/ou ET_B a pu être démontré *in vitro* et/ou *in vivo*. D'autres études ont démontré le rôle de l'endothéline et des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 dans les métastases osseuses. En effet, l'ET-1 est augmentée dans les métastases osseuses et le récepteur ET_A prédomine dans ces cellules cancéreuses (Nelson *et al.*, 1999). Toutes ces études font intervenir différents antagonistes des récepteurs ET_A et/ou ET_B. Parmi ces antagonistes, on retrouve ceux qui s'opposent uniquement au récepteur ET_A (BQ-

123, le YM 598, AZD4054), uniquement au récepteur ET_B (BQ-788) ainsi que le Bosentan qui s'oppose à la fois au récepteur ET_A et ET_B.

Suite à tout ce qui précède, il est possible de suggérer ou de soupçonner un rôle important du système de l'ET-1 dans la physiopathologie de l'ostéosarcome et dans le processus de différenciation/dédifférenciation des cellules de l'ostéosarcome. Parmi les molécules intervenant dans la différenciation des cellules productrices de la matrice osseuse, une nouvelle protéine a récemment été découverte : l'ostéocrine (Thomas *et al.*, 2003).

2.3 L'OSTÉOCRINE

2.3.1 Généralités

L'ostéocrine (Ostn), aussi appelé musclin, est une protéine sécrétée qui a récemment été mise en évidence par Thomas et collaborateurs. Découvert par « viral-based signal-trap technology » chez la souris, cette nouvelle protéine a été nommée ostéocrine par Thomas et collaborateur, car est elle exprimée principalement par les ostéoblastes (Thomas *et al.*, 2003).

2.3.2 Structure

Chez la souris, le gène de l'ostéocrine produit un ARNm de 1280 paires de base qui encodent une protéine mature de 103 acides aminés ayant un poids moléculaire de 11,4 kDa. La protéine contient deux sites de clivage dibasique; KKKR à la position 76-79 et KKR à la position 110-112. La protéine de l'ostéocrine contient également un signal peptide ainsi que deux sites de clivage par des peptidases. Ces sites se retrouvent à la position Ala-25 et Ser-27. Diverses analyses suggèrent que cette protéine ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines connues, mis à part deux sites de clivage dibasique que l'on retrouve aussi chez les peptides précurseurs d'hormone (Thomas *et al.*, 2003). Dans le but d'explorer la fonction de ces deux sites de clivage, Thomas et collaborateurs ont étudié ces sites et leur conservation à travers différentes espèces. Ainsi, il a été démontré qu'il existe une grande

homologie de séquence chez les différentes espèces étudiées; la séquence est identique à 74% entre l'humain et la souris et identique à 59% entre l'humain et le poulet. De plus, les deux sites de clivage dibasique sont conservés entre les différentes espèces, dont l'humain, le bovin, la souris, le rat, le poulet et le python (Thomas *et al.*, 2003).

2.3.3 Expression de l'ostéocrine

Dans la littérature, l'expression de l'ostéocrine a été étudiée par des expériences d'immunofluorescence dans deux lignées cellulaires, les HEK 293 et les UMR 106 transfectées avec le vecteur exprimant l'ostéocrine. Ces études concluent que l'ostéocrine est exprimée dans l'appareil de Golgi, donc l'ostéocrine serait une protéine sécrétée. Des études d'immunobuvardage de type Western abonde dans le même sens, puisque la protéine a principalement été retrouvée dans le milieu de culture des cellules transfectées avec le vecteur exprimant l'ostéocrine (Thomas *et al.*, 2003).

Des immunobuvardage de type Northern ont été réalisés chez la souris dans divers tissus. Selon ces expériences, l'ARNm de l'ostéocrine est présent dans les os et absent dans le cerveau, les gonades, les testicules, le cœur, les intestins, les reins, le foie, les poumons et la rate (Thomas *et al.*, 2003). Au même moment, la même protéine a été mise en évidence par Nishizawa et collaborateurs (Nishizawa *et al.*, 2004). Ce groupe de recherche a nommé cette nouvelle protéine musclin, car ils ont observé cette protéine presque exclusivement dans le muscle, tissu qui n'avait pas été étudié par Thomas et collaborateurs (Nishizawa *et al.*, 2004). Mis à part différents tissus explorés, les deux groupes de recherche ont trouvé la même séquence, la même protéine et leurs observations concernant la sécrétion de l'ostéocrine (musclin) sont identiques.

2.3.3.1 Expression dans l'os

L'expression de l'ostéocrine a été étudiée dans le fémur ainsi que dans la calvaria chez la souris (Thomas *et al.*, 2003). Des études ont aussi été réalisées chez l'humain par Bord et collaborateurs (Bord *et al.*, 2005). Dans les deux études, l'expression de l'ostéocrine diminue selon l'âge de l'os. Ainsi, l'expression est plus

marquée dans un fémur d'une souris ayant un mois comparativement à un fémur de trois mois (Thomas *et al.*, 2003). L'expression de l'ostéocrine a aussi été étudiée par immunolocalisation sur des ostéoblastes dérivés de côtes de nouveau-nés ainsi que de la crête iliaque de femmes ménopausées. Selon cette étude, la protéine a été retrouvée dans les ostéoblastes ainsi que dans les ostéocytes nouvellement incorporés à la matrice osseuse (Bord *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2003). Quant aux ostéocytes terminaux ainsi qu'aux ostéoclastes, ils n'expriment pas l'ostéocrine (Bord *et al.*, 2005).

2.3.3.2 Expression chez les femmes ménopausées

Lors de l'étude chez les femmes ménopausées, Bord et collaborateurs ont étudié deux groupes de femmes : celle ayant reçu ou non des traitements à forte dose d'estrogène. Le patron d'expression de l'ostéocrine reste le même, c'est-à-dire que le marquage, lors d'études d'immunolocalisation, se situe principalement au niveau des ostéoblastes et des ostéocytes nouvellement incorporés à la matrice osseuse. Cependant, l'expression en générale de l'ostéocrine est plus élevée chez les femmes ayant reçu des traitements à forte dose d'estrogène, comparativement au groupe de femmes n'ayant pas reçu ce type de traitement (Bord *et al.*, 2005). Ces mêmes résultats ont également été obtenus *in vitro* par le même groupe de recherche. En effet, des ostéoblastes normaux ont été cultivés avec ou sans 17- β -estradiol (10^{-10} M) et le marquage est plus intense dans les cultures ayant été traités avec le 17- β -estradiol (Bord *et al.*, 2005). Cela pourrait être expliqué par le fait que les femmes ayant reçu des traitements à fortes doses d'estrogène ont une activité ostéoblastique plus élevée (Bord *et al.*, 2001; Vedi *et al.*, 1999). À ce jour, aucune équipe de recherche n'a étudié le lien entre l'expression de cette protéine et l'ostéoporose, mais cela reste une piste de recherche intéressante.

2.3.4 Expression de l'ostéocrine et différenciation des ostéoblastes

Diverses expériences *in vitro* permettent d'établir une association entre le niveau d'expression de l'ostéocrine et la différenciation des ostéoblastes. Il a été démontré que l'expression de l'ostéocrine est régulée à la baisse lorsque les ostéoblastes en

culture sont différenciés dans le temps ainsi que par des traitements d'hydrocortisone. En fait, l'ostéocrine démontre un patron d'expression contraire à celui de la phosphatase alcaline, c'est-à-dire que l'ostéocrine est fortement exprimée dans les pré-ostéoblastes et très peu dans les ostéoblastes différenciés (Bord *et al.*, 2005).

Cette nouvelle protéine pourrait être un marqueur de différenciation des ostéoblastes dans la carcinogenèse de l'ostéosarcome, puisqu'un ostéosarcome de haut grade est composé essentiellement de cellules tumorales, cellules qui sont dédifférenciées (Unni *et al.*, 1984).

2.4 La PARP-1

2.4.1 Généralités

Une autre protéine impliquée dans la carcinogenèse est la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase). La PARP est une protéine enzymatique qui fut renommée PARP-1 plusieurs années plus tard. Cette protéine a été identifiée pour la première fois dans des extraits nucléaires de cellules eucaryotes de rat par un groupe de recherche de Strasbourg (Chambon *et al.*, 1963). Cette protéine nucléaire fait partie d'une grande famille qui compte à ce jour 17 membres (Ame *et al.*, 2004).

2.4.2 Structure

La PARP-1 est une protéine de 113 kDa qui est composée de 1014 acides aminés. Cette protéine est composée de trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal, un domaine d'auto-modification ainsi qu'un domaine C-terminal (Kameshita *et al.*, 1984). Le domaine N-terminal correspond au site de liaison à l'ADN et contient deux motifs à doigts de zinc qui sont impliqués dans la reconnaissance des sites de coupure de l'ADN ainsi que dans certaines interactions protéines-protéines. Ce domaine contient également un signal de localisation nucléaire (de Murcia *et al.*, 1994). Le domaine central d'auto-modification est responsable de la plupart des interactions protéines-protéines et contient un motif BRCT (breast cancer

susceptibility protein C-terminus) (D'Amours *et al.*, 1999). Finalement le domaine en C-terminal, le domaine catalytique, permet la liaison avec le NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) (Ruf *et al.*, 1996). Ce domaine catalytique contient le site actif qui est conservé à travers tous les membres de la famille PARP. Lors de conditions normales, la PARP-1 inactive est localisée dans le nucléoplasme de la cellule (Smith, 2001).

2.4.3 Fonction de la PARP-1

Le rôle biologique de la PARP-1 est très complexe et il implique plusieurs processus cellulaires. Son rôle fondamental est la réparation et le maintien de l'intégrité du génome, suite à des dommages à l'ADN (Chatterjee *et al.*, 1999; de Murcia *et al.*, 1994; Schreiber *et al.*, 1995). La PARP-1 régularise aussi la réplication et la différenciation cellulaire en plus d'être impliquée dans le maintien de la longueur des télomères (d'Adda di Fagagna *et al.*, 1999). La PARP-1 est aussi impliquée durant le processus de la mort cellulaire programmée, l'apoptose (Yu *et al.*, 2002) ainsi que dans la carcinogenèse (Nakagawa *et al.*, 1988). Bien que la PARP-1 soit principalement impliquée dans la réparation du génome, elle exerce également un rôle via le contrôle de la transcription. En effet, la PARP-1 peut agir comme activateur lorsqu'elle fait parti de certains complexes. Plaza et collaborateurs ont d'ailleurs mis en évidence le fait que la PARP-1 fasse parti du complexe qui permet l'activation du gène de PAX-6 (Plaza *et al.*, 1999). La PARP-1 agit aussi en tant que co-activateur de NF-κB (Hassa *et al.*, 2002). Plus spécifiquement, suite à un stimuli inflammatoire, la PARP-1 va être acétylée par le complexe p300/CREB ce qui va permettre la participation de la PARP-1 dans l'activation de NF-κB (Hassa *et al.*, 2005).

2.4.3.1 Réaction de poly (ADP-ribosyl) ation

La réaction de poly (ADP-ribosyl) ation constitue l'une des premières réponses mises en place par les cellules eucaryotes, suite à une exposition à divers agents génotoxiques. Cette réaction est une modification post-traductionnelle importante qui régularise différentes fonctions nucléaires (de Murcia *et al.*, 1994). Ainsi, lorsque la cellule subit un dommage à l'ADN, la PARP-1 est fortement activée et se

lie au site de cassure double brin ou simple brin de l'ADN (Dantzer *et al.*, 1999). Ce sont les motifs à doigts de zinc qui sont responsables de la reconnaissance du site de coupure de l'ADN (Uchida *et al.*, 1987). Une fois la PARP-1 liée à l'ADN, elle catalyse le poly (ADP-ribose) à partir du NAD^+ (de Murcia *et al.*, 1994). Pour se faire, elle est aidée par d'autres facteurs, dont XRCC1, la DNA polymérase β ainsi que la DNA ligase III (Masson *et al.*, 1998). Ce processus de réparation de l'ADN est appelé réparation par excision de base. Cependant, lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants, la forte activation de la PARP-1 cause un manque en NAD^+ dans la cellule ce qui entraîne la mort de la cellule par nécrose (Ha *et al.*, 2000). De plus, le manque en NAD^+ entraîne une perte en ATP puisque cette molécule est nécessaire pour la synthèse du NAD^+ (Ha *et al.*, 1999).

2.4.3.2 Mort cellulaire par apoptose

Le processus d'apoptose fait intervenir plusieurs cascades de molécules et différentes enzymes protéolytiques sont aussi activées durant ce processus. Durant les dernières années, l'attention a été portée sur une famille de protéases, les caspases (Sanghavi *et al.*, 1998). Poirier et collaborateurs ont été les premiers en 1993 à mettre en évidence le clivage de la PARP-1 par une caspase. Ce clivage génère un fragment de 89 kDa et un autre de 24 kDa et mène à l'inactivation de la PARP-1. La coupure a lieu après un résidu aspartate dans le domaine de liaison à l'ADN (Kaufmann *et al.*, 1993). Le clivage de la PARP-1 est l'un des premiers substrats à être clivé par les protéases et ce clivage est essentiel pour la progression de l'apoptose (Ha *et al.*, 2000).

2.4.3.3 Nécrose versus apoptose

Il existe une différence majeure entre la nécrose et l'apoptose. En effet, la mort cellulaire programmée permet l'élimination de la cellule rapidement par les macrophages. La mort par nécrose quant à elle, cause des dommages au niveau des tissus puisque la membrane plasmique se désintègre au lieu de former des corps apoptotiques (Bonfoco *et al.*, 1995; Nicotera *et al.*, 1999). L'apoptose est donc la mort cellulaire à privilégier par les cellules, puisque ce processus se fait rapidement, sans conséquence pour le tissu.

2.4.4 PARP-1, nouvelle cible thérapeutique

La surexpression de la PARP-1 est impliquée dans différentes pathologies, dont l'infarctus du myocarde, le diabète, l'accident cérébrovasculaire et dans plusieurs processus inflammatoires (Tentori *et al.*, 2002). De plus, étant donné que la PARP-1 est impliquée dans le processus de l'apoptose, elle représente une cible pharmaceutique de choix pour augmenter l'effet anti-tumoral des médicaments développés pour traiter les cancers. L'inhibition de la PARP-1 représente une voie pharmacologique à considérer dans plusieurs pathologies ainsi que dans la carcinogenèse.

2.4.4.1 Inhibiteurs de la PARP-1 et la carcinogenèse

Différents inhibiteurs de la PARP-1 ont été élaborés au cours des dernières années. Ces inhibiteurs agissent comme compétiteur au NAD^+ , et bloquent le domaine catalytique de la PARP-1 (Nguewa *et al.*, 2005). Les premiers inhibiteurs à avoir été synthétisés sont le nicotinamide et le 3-AB. Les inhibiteurs de la PARP-1 semblent efficaces dans différentes pathologies, dont les blessures au cerveau chez certains modèles animaux (Zhang *et al.*, 1994). L'avantage d'utiliser les inhibiteurs de la PARP-1 contre certains cancers réside dans le fait que l'inactivation de la PARP-1 active la voie de l'apoptose, ce qui permet d'éliminer les cellules tumorales de façon plus efficace (Ha *et al.*, 2000). Mieux encore, les inhibiteurs de la PARP-1 semblent plus efficaces contre les cellules tumorales que les cellules normales (Nguewa *et al.*, 2005). Le fait d'utiliser un inhibiteur de la PARP-1 en combinaison avec les médicaments de chimiothérapie augmente le taux de réussite du traitement puisque les cellules résistantes meurent par apoptose, provoquée par l'inactivation de la PARP-1 (Ha *et al.*, 2000).

La PARP-1 est donc une molécule qui est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Étant donné son implication dans la voie de l'apoptose et le développement de différents inhibiteurs dans le but de traiter certains cancers et pathologie, l'étude de cette protéine dans les cas d'ostéosarcomes semble très importante. En effet, l'intérêt d'étudier l'expression de la PARP-1 dans les cas d'ostéosarcome réside dans le fait que cette protéine pourrait être une cible de choix dans le but de mieux traiter les patients atteints de cette tumeur osseuse. De plus, à ce

jour il y a déjà plusieurs inhibiteurs de la PARP-1 de développé, ce qui faciliterait les recherches dans ce domaine (Marina *et al.*, 2004).

2.5 L'EZRINE

2.5.1 Généralités

L'ezrine, aussi connu sous le nom de cytovillin, p81, 80k et Villin 2, est un membre de la famille ERM (ezrine/radixine/moesine) (Sato *et al.*, 1992). La famille ERM appartient à la superfamille des protéines dont les prototypes EPB41 (erythrocyte membrane protein band 4.1) et taline ont un rôle important dans les interactions du cytosquelette et de la membrane (Crepaldi *et al.*, 1997). L'ezrine et les autres protéines de la famille ERM agissent comme pont entre les protéines de la membrane et l'actine du cytosquelette (Sato *et al.*, 1992). L'ezrine, la première protéine de la famille ERM à avoir été caractérisée, a été mise en évidence en 1981 par Bretscher et collaborateurs (Bretscher, 1983). Cette protéine est retrouvée dans plusieurs types cellulaires, mais à différent niveau d'expression. Ainsi, on retrouve une forte expression de cette protéine dans le petit intestin, l'estomac, les poumons, le pancréas et les reins, une expression intermédiaire dans le thymus, la rate et la moelle osseuse. Finalement, l'ezrine est exprimée à de très faible niveau dans le cœur, le cerveau et les muscles. De façon plus précise, l'ezrine est située au domaine apical de la cellule polarisée, région de la cellule qui est caractérisée par la présence de microvillosités (Berryman *et al.*, 1993).

2.5.2 Structure

Les trois protéines composant la famille ERM ont une forte homologie entre elles, puisque leur séquence est identique à 70%. L'ezrine est constituée de trois domaines, dont son domaine N-terminal qui est identique à 85% avec les deux autres membres de la famille ERM. Ce domaine, hautement conservé, contient un site de liaison à la membrane cellulaire (Tsukita *et al.*, 1994). Le domaine central contient une hélice α et le domaine C-terminal, chargé positivement, contient un site de liaison pour l'actine (Tsukita *et al.*, 1997; Turunen *et al.*, 1994). Chez l'humain,

l'eitrine est composée de 585 acides aminés et a un poids moléculaire de 80 kDa (Bretscher, 1983; Gould *et al.*, 1989).

L'eitrine est une protéine qui se retrouve dans le cytoplasme de la cellule ou attachée à la membrane cellulaire (Bretscher *et al.*, 1997). Dépendamment de sa localisation dans la cellule, elle adopte deux conformations différentes: active ou dormante. La différence entre ces deux états résulte de la conformation de l'eitrine. La conformation dormante (dans le cytoplasme) consiste au repliement de la molécule sur elle-même. Cette interaction intramoléculaire permet l'auto-inhibition de l'eitrine. En effet, le domaine N-terminal (296 aa) de l'eitrine est capable de lier son domaine C-terminal (107 aa), ce qui inactive la protéine puisqu'aucun site de liaison n'est exposé, donc aucune molécule ne peut lier l'eitrine (Bretscher *et al.*, 1997). Quant à la conformation active, elle correspond à l'eitrine qui est liée au filament d'actine et à la membrane cellulaire, via certains récepteurs membranaires, comme la protéine CD44 qui est impliquée dans le processus d'adhérence cellulaire (Bretscher *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001).

2.5.3 Fonctions de l'eitrine

L'eitrine joue un rôle très important dans diverses fonctions cellulaires, incluant la motilité cellulaire (Lamb *et al.*, 1997), la survie cellulaire (Bretscher *et al.*, 2002) ainsi que pour l'adhérence cellulaire (Takeuchi *et al.*, 1994). Cette protéine est aussi cruciale pour le maintien de la forme de la cellule (Lamb *et al.*, 1997) et pour la formation de certaines structures de la membrane dont les microvillosités (Takeuchi *et al.*, 1994). Plus récemment diverses études ont démontré que dans sa forme active, l'eitrine est non seulement impliquée dans l'organisation du cytosquelette, mais peut aussi activer différentes voies de signalisation (Louvet-Vallee, 2000). En effet, cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation, tel que la voie de la MAPK (MEK/ERK), Akt et Rho kinase (Bretscher *et al.*, 2002; Crepaldi *et al.*, 1997; Gautreau *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003).

2.5.4 Activation/inactivation de l'eitrine

L'activation des protéines de la famille ERM se fait via différents mécanismes. Au départ, l'eitrine apparaissait comme bon substrat pour le récepteur à tyrosine kinase

EGF (epidermal growth factor). En effet, l'activation de l'eitrine peut se faire via la phosphorylation de sites spécifiques. Plus précisément, l'activation de l'eitrine se fait via la phosphorylation de deux résidus tyrosines (Tyr 145 et Tyr 353), situés dans le domaine carboxy-terminal (Bretscher *et al.*, 2002). Ces deux résidus sont phosphorylés *in vitro* et *in vivo* par le récepteur EGF (Krieg *et al.*, 1992). Lorsque l'eitrine est phosphorylée, elle se retrouve sous sa forme active, ce qui permet son attachement à la membrane cellulaire (Bretscher *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001). Un autre moyen d'activer l'eitrine est par le phosphoinositol. Ainsi, PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) se lie au domaine N-terminal de l'eitrine, ce qui entraînera la suppression de l'interaction intramoléculaire entre le domaine amino-terminal et carboxy-terminal de l'eitrine. Une fois PIP₂ lié à l'eitrine, cette dernière est phosphorylée au niveau d'une thréonine (Thr 567) et peut ainsi lier le domaine CD44 qui est attaché à la membrane cellulaire via son domaine N-terminal, et lier l'actine via son domaine C-terminal (Matsui *et al.*, 1999; Niggli *et al.*, 1995). L'inactivation de l'eitrine est beaucoup moins étudiée que son activation. Cette protéine serait inactivée par une déphosphorylation de certains résidus lors du processus d'apoptose. Une fois déphosphorylée, l'eitrine est transloquée dans le cytoplasme, ce qui entraîne un effondrement des microvillosités (Kondo *et al.*, 1997). Certaines études ont aussi démontré que l'eitrine est très sensible à une protéase qui est régulée par le calcium intracellulaire, la calpaïne. Cette sensibilité résulte en une dégradation de l'eitrine, donc à son inactivation (Shuster *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1993).

2.5.4.1 Activation de la voie de signalisation Rho

En plus de participer à diverses fonctions cellulaires, l'eitrine est une protéine qui peut transmettre divers signaux. Il a déjà été démontré que PIP₂ permet l'activation de l'eitrine (Matsui *et al.*, 1999; Niggli *et al.*, 1995). En fait, c'est la GTPase RhoA qui est responsable de cette activation puisqu'elle stimule PI₄P₅K ce qui mène à une augmentation de PIP₂ (Matsui *et al.*, 1999). Une fois l'eitrine liée à la membrane cellulaire, elle peut transmettre un signal et activer à son tour la GTPase RhoA. L'activation de la GTPase RhoA par l'eitrine se fait via une interaction entre la protéine Dbl et le domaine amino-terminal de l'eitrine. Dbl est une protéine qui catalyse l'échange de nucléotide (GDP/GTP) de la GTPase RhoA, donc qui permet

l'activation de RhoA. L'eitrine et les autres membres de la famille ERM jouent également un rôle important dans l'activation des membres de la famille Rho en recrutant leurs régulateurs positifs et négatifs (Takahashi *et al.*, 1998).

2.5.5 L'eitrine et le cancer

La perte d'adhérence entre les cellules tumorales semble être essentielle au développement des métastases à distance. Étant donné que l'eitrine joue un rôle crucial dans l'adhérence des cellules, son implication dans la carcinogenèse, plus particulièrement lors du développement des métastases, a fait l'objet de plusieurs recherches. Deux récentes études démontrent d'ailleurs que des niveaux d'expression élevés d'eitrine sont liés à l'apparition de métastases dans différents cancers (Khanna *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Des recherches ont été menées spécifiquement sur l'ostéosarcome où des niveaux d'expression élevés de l'eitrine ont été retrouvés chez de jeunes patients ayant développé des métastases (Khanna *et al.*, 2004). De plus, étant donné que l'eitrine est une protéine qui est impliquée dans la voie de signalisation de MAPK, voie importante lors de la dissémination des cellules cancéreuses, cela renforce le lien entre son expression élevée et l'apparition de métastases (Reddy *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2001).

D'autres études doivent investiguer davantage ce lien afin de mieux pouvoir comprendre le rôle que pourrait jouer l'eitrine dans la pathologie de l'ostéosarcome.

2.6 HYPOTHÈSE

L'ostéosarcome évolue de manière imprévisible et sa progression est généralement très rapide. Il y a un manque important de marqueurs biologiques pour ce type de tumeur de l'os. Jusqu'à présent, l'examen pathologique de la nécrose induite par la chimiothérapie néoadjuvante est la seule indication qui permet de formuler un pronostic au patient. Nous avons postulé que différentes molécules, intervenant dans le phénomène de transformation maligne, tel que l'ET-1 et ces récepteurs (ET_A et ET_B), l'ostéocrine, la PARP-1 ainsi que l'eitrine pourraient être des biomarqueurs du caractère invasif et de la progression de l'ostéosarcome humain.

2.7 OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet de maîtrise a été de mettre en évidence des marqueurs biologiques potentiels de l'ostéosarcome humain. Plus précisément cet objectif se divise en deux parties :

1. Déterminer le profil d'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1 et de l'ezrine dans des tissus d'ostéosarcome humain et dans les cellules dérivées de ces tumeurs. Plus précisément, notre but a été de comparer ces niveaux d'expression selon le grade histologique de la tumeur.
2. Démontrer le rôle du récepteur ET_A *in vivo* dans le développement d'une tumeur osseuse et des métastases chez la souris *nude*.

CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cette étude a été réalisée avec des lignées cellulaires disponibles dans le commerce, avec des tissus d'ostéosarcomes ainsi qu'avec des cellules dérivées à partir de ces tissus. De plus, des expériences *in vivo* ont été réalisées chez la souris *nude* afin de déterminer le rôle du récepteur ET_A de l'endothéline dans le développement de la tumeur et des métastases de l'ostéosarcome.

3.1 Lignée cellulaire

Cette étude a été réalisée avec des lignées cellulaires disponibles dans le commerce. Plus précisément, la lignée cellulaire MNNG/HOS (American Type Culture Collection) est une lignée commerciale dérivée d'un ostéosarcome d'une femme caucasienne de 13 ans. Ces cellules sont tumorigéniques lorsqu'elles sont injectées chez la souris *nude*. En effet, une tumeur se développe dans les 21 jours suivant l'injection en sous-cutanée de 1×10^7 cellules à la fréquence de 100% (5/5) (Rhim *et al.*, 1977). La lignée cellulaire MG-63 (American Type Culture Collection) est aussi dérivée d'un ostéosarcome humain d'un homme de 14 ans. La morphologie de ces cellules ressemble aux fibroblastes, mais celles-ci ne sont pas tumorigéniques lorsqu'elles sont implantées chez les souris *nude*.

3.2 Tissus humains

Après avoir obtenu le consentement libre et éclairé des patients, les tissus humains provenant de chirurgies orthopédiques ont été collectés au CHU Sainte-Justine. L'étude et l'utilisation de ces tissus ont été approuvées par le Comité d'Éthique de la Recherche du CHU Sainte-Justine. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Dr Marc Isler, le Dr Josée Doyon et le Dr Robert Turcotte. Afin de déterminer les caractéristiques histologiques et le grade des tumeurs osseuses selon la classification de Broders, tous les spécimens ont été évalués par un pathologiste (Dr Josée Doyon). Les tissus humains recueillis proviennent tous de biopsies de patients n'ayant pas reçu de traitements adjuvants. Parmi ces huit échantillons (une tumeur de grade 1/4, trois tumeurs de grade 3/4, quatre tumeurs de grade 4/4) un ratio garçon : fille de 5 : 3 existe.

Tableau III : Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines utilisées lors de l'étude.

Numéro	Sexe	Diagnostic	Site primaire	Grade histologique
1	M	Ostéosarcome	Tibia droit (proximal)	1/4
2	F	Ostéosarcome	Os iliaque gauche	3/4
3	F	Ostéosarcome	Tibia droit (proximal)	3/4
4	M	Ostéosarcome	Tibia droit (distal)	3/4
5	F	Ostéosarcome	Tibia Proximal	4/4
6	M	Ostéosarcome	Masse poignet droit	4/4
7	M	Ostéosarcome	Fémur distal gauche	4/4
8	M	Ostéosarcome	Fémur droit	4/4

3.3 Isolation des cellules à partir des tumeurs osseuses

Suite à l'excision de la tumeur osseuse, les tissus recueillis dans des conditions stériles ont été rincés dans du PBS pH 7,4 (phosphate buffer saline : 0,137 M NaCl, $8,1 \times 10^{-3}$ M Na_2HPO_4 , $2,7 \times 10^{-3}$ M KCl, $1,5 \times 10^{-3}$ M KH_2PO_4) contenant 100 unités/mL de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Les tumeurs osseuses ont par la suite été coupées mécaniquement en petits morceaux de moins de 5 mm et mises dans des boîtes de culture de 25 cm^2 dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1x; Wisent, Inc, St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Origine Australie ; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), de 100 unités/mL de pénicilline et de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Ces boîtes ont ensuite été placées à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO_2 et 95% d'air. Le milieu de culture a été changé à tous les 2 à 3 jours jusqu'à confluence, soit durant environ un mois.

3.4 Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1x; Wisent, Inc, St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Origine Australie ; Gibco BRL,

Burlington, Ontario, Canada), de 100 unités/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) dans des boîtes de culture de 75 cm². Ces boîtes de culture ont été placées à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Lorsque les cellules arrivaient à confluence, elles étaient trypsinées (0,25% trypsine-EDTA, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) pour ensuite être divisées dans d'autres boîtes de culture de 75 cm². Le milieu de culture a été changé à tous les 2 à 3 jours. Les cellules ont été utilisées au passage deux ou trois, dépendamment des cas.

3.5 Test de la phosphatase alcaline

Un marquage de la phosphatase alcaline est réalisé chez les cellules dérivées des tumeurs osseuses pour vérifier le phénotype de ces cellules. Les cellules sont d'abord mises en culture dans des Labtek à 8 puits (Nalge Nunc International, États-Unis) dans du DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1x; Wisent, Inc, St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Origine Australie; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), de 100 unités/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Après 4 jours d'incubation à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'air, les cellules ont été fixées à l'aide de la formaldéhyde 3,7% (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Québec, Canada) durant 5 minutes. Après 3 rinçages rapides dans du PBS, les cellules ont été incubées durant 60 minutes dans le tampon de coloration (0,5 µM Naphtol AS-MX Phosphate Disodium Salt (Sigma, Ontario, Canada), 1 µM Fast Red Violet LB salt (Sigma, Ontario, Canada), 62,5 µL 2-methoxyéthanol (Sigma, Ontario, Canada), 6 mL TBS (tris buffer saline : 0,1 M Tris pH 9,5, 0,15 M NaCl). Suite à cette incubation, les cellules ont été rincées 3 fois dans du PBS et la présence de la phosphatase alcaline (coloration rouge) a été observée au microscope (Leica DMR, Allemagne).

3.6 Extraction et dosage de l'ARN

Pour l'extraction de l'ARN, les cellules ont été mises en culture dans des pétris de 100 mm x 20 mm dans du DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1x; Wisent, Inc, St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau

foetal (Origine Australie ; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), de 100 unités/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) jusqu'à confluence. Les cellules ont ensuite été privées dans du DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Medium 1x; Wisent, Inc, St-Bruno, Québec, Canada) additionné de 0,0% (v/v) de sérum de veau foetal, de 100 unités/mL de pénicilline et de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) pour une période de 16 heures. Le milieu de culture a été récupéré et conservé à -20°C. Les cellules ont été rincées avec du PBS stérile et l'ARN a été récupéré dans 2 mL de réactif Trizol (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Par la suite, 200µL de chloroforme (ACP Chemicals Inc, Montréal, Québec) a été ajouté par mL de Trizol et agité vigoureusement pendant 1 minute. Suite à une centrifugation à 12 000 g x 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse a été récupérée et l'ARN a été précipité en ajoutant 500 µL d'isopropanol (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis) par tube. Après avoir attendu 10 minutes et réalisé la centrifugation à 12 000 g x 10 minutes à 4°C, le surnageant a été jeté et le culot a été rincé avec 1 mL d'éthanol 70% (Les alcools du commerce Inc., Brampton, Ontario) froid (-20°C). Suite à une dernière centrifugation à 7 500 g x 5 minutes à 4°C, le culot a été séché et resuspendu dans de l'eau stérile puis conservé à -20°C. L'ARN a été dilué dans le tampon TE 1X (200 mM Tris-HCL, 0,20 mM EDTA, pH 7,5) et dosé à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japon). Finalement, l'intégrité de l'ARN a été vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) de 1,2% et les bandes ont été visualisées aux ultraviolets grâce au bromure d'éthidium (0,5 g/mL) contenu dans le gel.

3.7 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

La réaction de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a été réalisée avec 1 µg d'ARN à l'aide de la M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco, BRL, Burlington, Ontario, Canada). Ces réactions ont été effectuées à l'aide de l'appareil Progene (Techne, Cambridge, Angleterre). Un cycle à 25⁰C x 10 minutes, 42⁰C x 15 minutes et 99⁰C x 5 minutes a été réalisé, selon les indications du fabricant. Cette réaction de transcription inverse se fait à l'aide de 6 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl + MgCl₂, 1,2 mM dNTP (Amersham Biosciences

Corp., QC, Canada), 3 μ M d'hexamère, 3 x 10⁻³ M DTT, 20 unités de RNaseOut (Gibco, BRL, Burlington, Ontario, Canada) et 60 unités de M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco, BRL, Burlington, Ontario, Canada). Une fois l'ARN converti

Tableau IV : Amorces et conditions pour la réaction de PCR

Gène	Séquence (5' → 3')	Nb paire de bases	T° hybridation (°C)	Nb de cycle
ET-1	Sens: 5'- GTC AAC ACT CCC GAG CAC -3' Anti-sens: 5'- CTG GTT TGT CTT AGG TGT T -3'	314	60	35
ETA	Sens: 5'- GCT GAT AGC CAG TCT TGC -3' Anti-sens: 5'- GAT GTG GCA TTG AGC ATA -3'	384	60	35
ETB	Sens: 5'- GCA GAG ATA ATG ACG CCA -3' Anti-sens: 5'- ATA GAC TCA GCA CAG TGA T -3'	451	60	35
Ezrin	Sens: 5'- ATC AAT GTC CGA GTT ACC ACC -3' Anti-sens: 5'- TCC AAG GGC ATC AAC TCC AA -3'	660	65	35
GAPDH	Sens: 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC A -3' Anti-sens: 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG T -3'	452	60	35
Ostéocrine	Sens: 5'- AGA TGC TGG ACT GGA GAT TGG -3' Anti-sens: 5'- TTC TAC CAA TCC GAT CCA TGG -3'	378	56	35
PARP-1	Sens: 5'- TGGCGGAGTCTTCGGATA -3' Anti-sens: 5'- GGTGGGTGTCTGTGTCTTG -3'	987	52	35
PTHrP	Sens: 5'- CAGTGGAGCGTCGCGGTGT -3' Anti-sens: 5'- GCGGCTGCTCTTTGTACGTCT -3'	334	60	30

en ADNc, 2 μ L de cette réaction a été utilisé pour l'amplification par PCR. La réaction de PCR se fait à l'aide de 1,25 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl + MgCl₂, 0,25 mM d'amorce sens et 0,25 mM d'amorce antisens (Medicorp, Montréal, QC, Canada), 2,5 unité de TaQ DNA Polymerase (Gibco, BRL, Burlington, Ontario, Canada). Les amorces spécifiques ainsi que les conditions pour chaque gène sont décrites au tableau IV. Chaque cycle de PCR est composé de trois étapes : 95°C x 1 minute (dénaturation), X°C x 1 minute (hybridation, voir tableau IV) et 72°C x 1 minute (polymérisation). À la fin des cycles de PCR, une élongation de 10 minutes à 72°C est effectuée. Finalement, les produits de cette réaction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) de 1,2% et les bandes ont été visualisées aux ultraviolets grâce au bromure d'éthidium (0,5 g/mL) contenu dans le gel.

3.8 Extraction et dosage des protéines totales

Les cellules ont été rincées à trois reprises avec du PBS pH 7,4 puis 500 μL de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA) contenant les inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptine, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinine, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatine) sont ajoutés dans le pétri. Les pétris ont été incubés durant 10 minutes à -80°C , puis les cellules ont été grattées et récupérées dans un eppendorf. Suite à une centrifugation de 15 minutes à 12 000 g à 4°C le surnageant a été récupéré et conservé à -20°C . Pour doser les protéines totales extraites, la méthode à l'aide d'une solution d'acide bicinchonique (Sigma, Ontario, Canada) et d'une solution de sulfate de cuivre (Sigma, Ontario, Canada) a été utilisée. La BSA (albumine de sérum bovin) a été utilisée pour réaliser la gamme étalon (1 mg à 60 mg). La densité optique est mesurée à 550 nm (Expert Microplate Reader 96UV, Asys Hitech, Australie). En se référant à la gamme étalon, la concentration des protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) peut être calculée.

3.9 Précipitation à l'acide trichloroacétique

Les protéines du milieu de culture conservé à -20°C ont été concentrés par précipitation à l'aide de l'acide trichloroacétique (Sigma, Ontario, Canada). Premièrement, 10% d'acide trichloroacétique (v/v) a été ajouté au milieu de culture, inversé à quelques reprises et incubé sur glace durant 1 heure. Une centrifugation à 12 000 g x 20 minutes à 4°C a été réalisée et le culot a ensuite été rincé avec de l'acétone (Fisher Scientific, Hampton, NH, États-Unis) froid. Une deuxième centrifugation à 12 000 g x 5 minutes à 4°C a été réalisée et le culot a une fois de plus été rincé dans de l'acétone froid. Après 3 rinçages, le culot a été séché et repris dans du tampon laemmli 2X, puis conservé à -20°C . Cette précipitation à l'acide trichloroacétique a permis de concentrer les protéines de 100 fois.

3.10 Buvardage de type Western

Les échantillons utilisés proviennent des milieux de culture concentrés à l'aide de l'acide trichloroacétique (20 μL) ou des lysats cellulaires totaux (15 μg). Les

échantillons ont été bouillis durant cinq minutes puis ils ont été déposés dans un gel SDS-PAGE d'acrylamide (Bio-Rad, Hercules, Californie). Le gel de concentration est constitué de 4% d'acrylamide (v/v) et de tampon Tris 0,5 M pH 6,8. Quant au gel de résolution, il est composé de 16% d'acrylamide (v/v) et de tampon Tris 1,5 M pH 8,8. La séparation des protéines a été réalisée suite à une électrophorèse à l'aide de l'appareil Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, Californie). La migration a été effectuée à température pièce sous 80 volts. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Bio-Rad, Hercules, Californie). Ce transfert a été effectué durant une heure, sous 120 volts, à 4°C. Une fois le transfert terminé, la membrane a été incubée durant la nuit dans une solution de T-TBS 1X (0,2 M tris, 0,15 M NaCl, 0,1 Tween-20) à 5% de lait en poudre. La membrane a été rincée six fois à l'aide du T-TTBS 1X puis incubée une heure à température pièce avec l'anticorps primaire (tableau V). Suite à six rinçages dans le T-TBS 1X, la membrane a été incubée durant 1 heure à température pièce avec l'anticorps secondaire correspondant qui est couplé à la peroxydase (tableau V). Les anticorps secondaires proviennent de la compagnie Pierce et ont été utilisés selon la dilution du fabricant, soit de 1/40 000. La présence de protéines a été révélée à l'aide du substrat SuperSignal (Pierce, Rockford, Illinois) et les membranes ont finalement été exposées sur un film autoradiographique (Amersham Biosciences Corp., Qc, Canada).

Tableau V : Anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages de type Western.

Anticorps primaire	Concentration	Type d'anticorps primaire	Compagnie
Ezrin	0,5 µg/mL	Polyclonal Anti-Lapin	Upstate
Ostéocrine	1 µg/mL	Monoclonal Anti-Rat	R & D Systems
PARP-1	0,1 µg/mL	Polyclonal Anti-Chèvre	Santa Cruz, biotechnology

3.11 Densitométrie

La densité des bandes obtenue lors des immunobuvardages de type Western et lors des réactions de RT-PCR a été quantifiée à l'aide du logiciel fluorchem 8800 (Alpha Innotech Corporation).

3.12 Coloration éosine/hématoxyline

Les tissus humains obtenus suite aux chirurgies ainsi que les tissus provenant des souris *nude* (expérience *in vivo*), ont été rincés avec du PBS pH 7,4 et les tissus adjacents (gras, tissus conjonctifs) ont été enlevés afin de conserver uniquement la tumeur osseuse. Ces tissus ont été fixés à l'aide de la paraformaldéhyde 4% (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Québec, Canada), enrobés dans la paraffine, puis coupés à l'aide d'un microtome (Leica RM2145, Richmond Hill, Ontario, Canada). Des sections de 5 µm ont été montées sur des lames SuperFrost Plus (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis). Les tissus ont été déparaffinés dans le toluène (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Québec, Canada) et réhydratés dans des bains d'éthanol (Les alcools du commerce Inc., Brampton, Ontario) à concentration décroissante. Les lames ont ensuite été incubées quatre minutes avec l'hématoxyline Harris (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis) puis plongées dans l'eau pour enlever l'excès de colorant. Suite à trois rinçages dans une solution d'alcool-acide (95% éthanol, 5% HCl) et trois autres rinçages dans une solution de 1% de carbonate de lithium (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Québec, Canada), les lames ont été incubées durant une minute avec l'éosine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les lames ont ensuite été déshydratées dans des bains d'alcool à concentration croissante, puis incubées cinq minutes dans le toluène avant d'être montées à l'aide du Permout (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis).

3.13 Immunohistochimie

Les coupes de tissus de 5 µm, montées sur des lames SuperFrost (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis), ont été déparaffinées dans le toluène (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Québec, Canada) et réhydratées dans des bains d'éthanol (Les alcools du commerce Inc., Brampton, Ontario) à concentration décroissante. Les antigènes ont par la suite été démasqués à l'aide du tampon citrate (0,01 M) à 65°C durant 20 minutes. L'activité de la peroxydase endogène a été bloquée à l'aide d'une solution à 2% de H₂O₂ (Scientific, Hampton, NH, États-Unis) dans du méthanol (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis). Pour bloquer les liaisons non-spécifiques, une incubation de 60 minutes avec le sérum normal de cheval (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) a été réalisée à 25°C. Les coupes de tissus

ont été incubées durant 16 heures à 4°C avec l'anticorps primaire (tableau VI). Suite à cette incubation, l'anticorps secondaire, couplé à la biotine (tableau VI), a été ajouté et incubé à 25°C durant 40 minutes selon la dilution du fabricant (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Après l'incubation avec le complexe avidine-biotine (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA), le marquage a été développé avec le système diaminobenzidine (DAB) (Dako Diagnostics Canada Inc; Mississauga, ON, Canada) donnant une coloration brunâtre là où la protéine est exprimée. Les lames ont été contre-colorées avec l'hématoxyline Harris (Fisher Scientific, Hampton, NH, États-Unis), coloration qui marque les noyaux des cellules. La spécificité du marquage a été évaluée grâce au contrôle négatif réalisé en même temps que les autres lames suite à l'omission de l'anticorps primaire. Les lames ont été observées au microscope (Leica DMR, Allemagne) à des grossissements de 100X, 200X et de 400X. Par la suite, le pourcentage de cellules marquées pour chaque anticorps a été déterminé et ce, en double aveugle. En moyenne, 30 cellules étaient comptées dans trois zones représentatives de la lame, pour un total approximatif de 100 cellules/lame. Le comptage des cellules a été effectué à trois reprises.

Tableau VI: **Anticorps primaires utilisés pour la technique d'immunohistochimie.**

Anticorps primaire	Concentration	Type d'anticorps primaire	Compagnie
ET-1	5 µg/mL	Polyclonal Anti-Lapin	Anticorps maison (Florina Moldovan)
Ezrin	10 µg/mL	Polyclonal Anti-Lapin	Upstate
Ostéocrine	10 µg/mL	Monoclonal Anti-Rat	R & D Systems
PARP-1	4 µg/mL	Polyclonal Anti-Chèvre	Santa Cruz, biotechnology

Par la suite, le pourcentage moyen de cellules marquées était calculé ainsi que son écart-type. La différence d'expression de la protéine selon le grade histologique a ensuite été validée statistiquement.

3.14 Expériences *in vivo*

Les expériences réalisées chez la souris *nude* ont été approuvées par le Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine (# protocole ST05-05). L'expérience *in vivo* a été réalisée à l'aide de six souris *nude* (NU/NU) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) auxquelles 1×10^7 cellules MNNG/HOS ont été injectées. Les cellules ont été injectées (volume 100 μ L) dans le flanc droit en sous-cutané à l'aide d'une aiguille 25G 5/8. Une fois que la tumeur avait atteint une taille de 5 mm, soit en 32 jours, les souris ont été séparées de façon aléatoire en deux groupes : un groupe contrôle (n=2) et un groupe expérimental (n=2). Le groupe contrôle a reçu des injections quotidiennes de PBS stérile (volume de 100 μ L) en sous-cutanée durant quatre semaines (28 jours). L'autre groupe a reçu l'antagoniste du récepteur de l'ET-1, le BQ-123 (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego) à raison de dose sous-cutanée de 6 μ g/kg/jour (volume de 100 μ L) durant 28 jours. Toutes les injections ont été faites à l'aide d'une aiguille 25G 5/8. À tous les jours, le site d'injection était nettoyé avec un tampon d'alcool composé de 70% d'alcool isopropylique et les injections ont été réalisées à la même heure chaque jour. La taille de la tumeur ainsi que le poids des souris ont été pris chaque semaine. Après quatre semaines de traitement, des radiographies des poumons ont été prises pour vérifier l'apparition de métastases. Ces radiographies ont été prises en position postérieur/antérieur (PA) ainsi que sur le côté droit. Les souris ont ensuite été sacrifiées dans des chambres à CO₂ et les tumeurs, ainsi que les poumons ont été prélevés pour diverses analyses histologiques. Durant toute la durée de cette expérience, les souris *nude* étaient situées dans une salle transgénique à l'animalerie du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine.

3.15 Considérations éthiques

Le protocole de recherche pour l'étude avec des tissus humains a été approuvé par le Comité d'Éthique de la Recherche du CHU Sainte-Justine. De plus, les tissus ont été obtenus suite à l'obtention du consentement libre et éclairé des patients. En ce qui concerne les expériences *in vivo* réalisées à l'aide des souris *nude*, le protocole de recherche a été approuvé par le Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du CHU Sainte-Justine.

3.16 Analyses statistiques

Les différences entre les différents groupes de données ont été comparées avec le test de Mann-Whitney à l'aide du logiciel VisualStat. Les résultats ont été considérés significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

4.1 Expression de l'ET-1 et de ces récepteurs dans l'ostéosarcome humain

Dans le but de mettre en évidence le rôle important de l'ET-1 et de ces récepteurs dans l'ostéosarcome humain, nous avons étudié l'expression génique et protéique de ce peptide. Ainsi, par la technique de RT-PCR le niveau d'expression du gène de l'ET-1 et de ces récepteurs (ET_A et ET_B) a été évalué selon les conditions décrites au tableau IV. Selon cette expérience, réalisée sur des ostéoblastes provenant de lignées commerciales ainsi que sur des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains (n=8), l'expression de l'ET-1 et de son récepteur ET_A semble identique indépendamment du grade de la tumeur. Nous notons tout de même une légère augmentation de l'intensité des bandes du récepteur ET_A chez les tumeurs de grade 4/4 comparativement aux tumeurs de grade 1/4 et 3/4. Cependant, en ce qui concerne l'expression du gène du récepteur ET_B, nous observons une disparition de la bande à 451 paires de base dans les ostéosarcomes de grade 4/4 (figure 2). Le gène du peptide de la PTHrP a aussi été analysé par la technique de RT-PCR selon les conditions mentionnées au tableau IV. Sur la figure 2, nous constatons une perte de la bande à 334 paires de base chez les ostéosarcomes de grade 1/4 ainsi que pour deux tumeurs de grade 3/4. Une réaction de RT-PCR a également été réalisée avec chaque échantillon en utilisant les amorces permettant de détecter la GAPDH (452 pb). Ce contrôle nous assure que la quantité d'ARN utilisée pour réaliser les diverses réactions de RT-PCR est identique pour chaque échantillon.

L'expression protéique de l'ET-1 a également été vérifiée par la technique d'immunohistochimie sur des coupes de tissus d'ostéosarcomes de grade 1/4 (n=3) et de grade 4/4 (n=3). L'anticorps polyclonal anti-ET-1 reconnaît spécifiquement la région C-terminal de la protéine. Les images à 400X nous ont permis d'observer un marquage au niveau du cytoplasme des cellules (figure 3B, 3D). Pour déterminer s'il existe une différence d'expression entre les ostéosarcomes de bas grade (1/4) et de haut grade (4/4), l'expression protéique de l'ET-1 a été quantifiée. Ainsi, le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-ET-1 est de 43,33% ± 15,27% pour les ostéosarcomes de grade 1/4 et de 90,35% ± 4,14% pour les grades 4/4 (tableau VII). La différence d'expression de l'ET-1 entre les OS de grades 1/4 et 4/4

est statistiquement significative selon le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). L'ET-1 a aussi été détecté dans une coupe de tissu de tumeur à cellules géantes ($n=1$) (figure 4). Le pourcentage de cellules marquées est moindre que dans les tissus d'ostéosarcomes, soit de $23,71\% \pm 4,23\%$ (tableau VII). De plus, l'intensité du marquage dans le cytoplasme des cellules est beaucoup plus faible dans les cellules de la tumeur à cellules géantes (figure 4) comparativement aux cellules d'ostéosarcomes (figure 3).

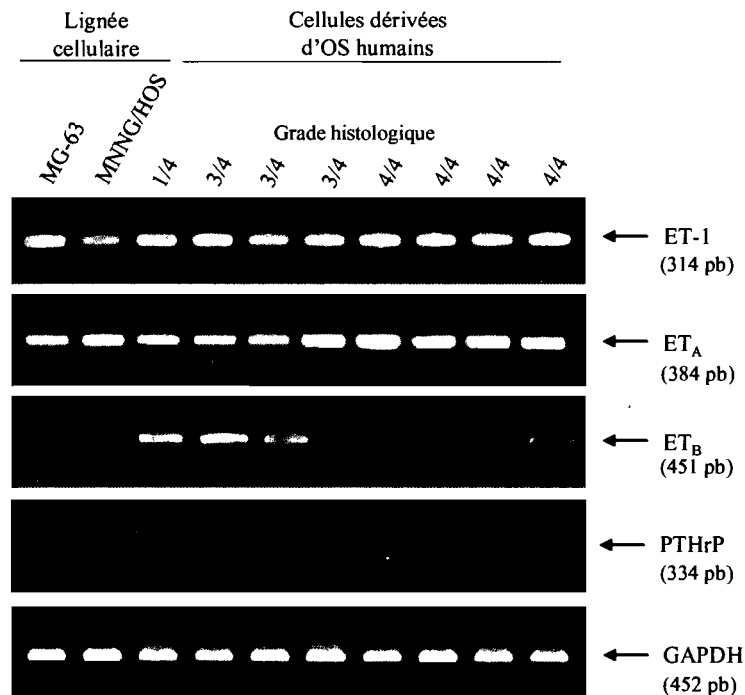


Figure 2 : Expression du gène de l'endothéline-1 (ET-1), de ces récepteurs (ET_A et ET_B) et de la PTHrP dans des ostéoblastes humains. Les ostéoblastes proviennent de lignées commerciales d'ostéosarcomes (MG-63 et MNNG/HOS) et des ostéoblastes dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains ($n=8$). L'ARN a été extrait des cellules qui ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal jusqu'à confluence et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. Les produits de la réaction de RT-PCR pour l'ET-1 (314 pb), ET_A (384 pb), ET_B (451 pb), PTHrP (334 pb) et la GAPDH (452 pb) ont été visualisés aux ultraviolets à l'aide du bromure d'éthidium contenu dans le gel d'agarose 1,2%. ET-1: Endothéline-1, ET_A: Récepteur A de l'endothéline, ET_B: Récepteur B de l'endothéline, PTHrP: Parathyroid-hormone-related peptide, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

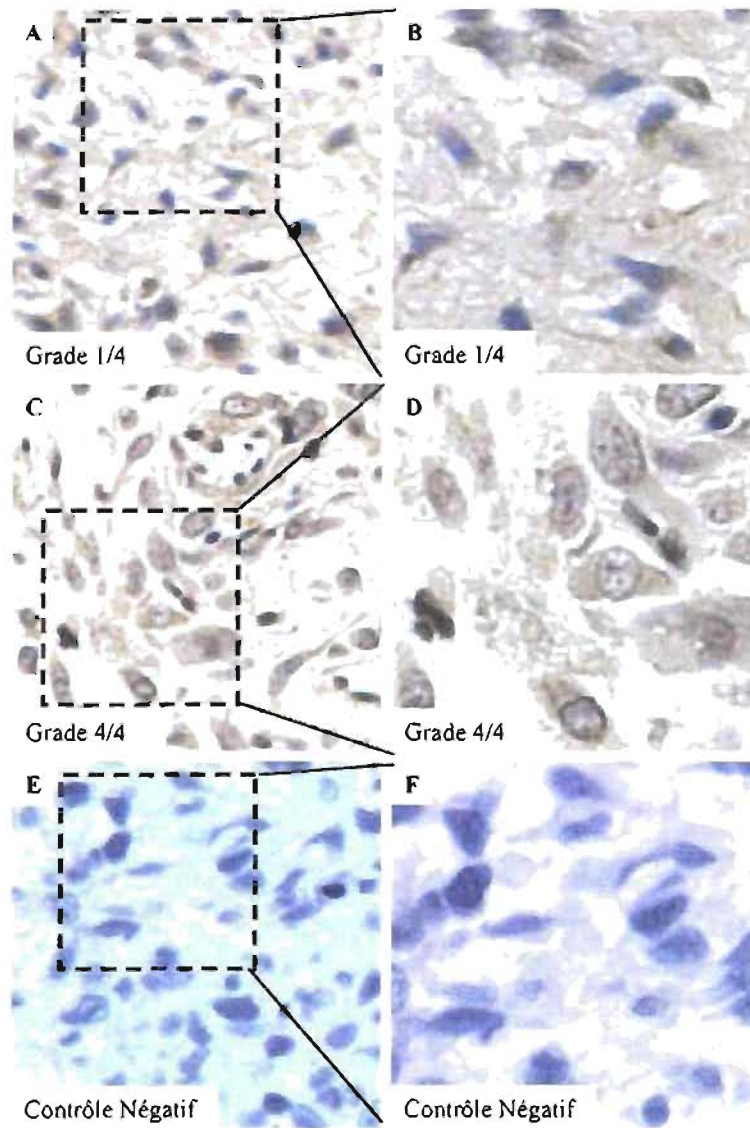


Figure 3 : **Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans des tissus d'ostéosarcomes humains.** Coupes représentatives de tissus d'ostéosarcomes humains marquées avec un anticorps polyclonal anti-endothéline-1 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'endothéline-1 (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'endothéline-1 est détectée dans des tissus d'ostéosarcomes humains de grade 1/4 (A, B) ainsi que dans des tissus d'ostéosarcomes de grade 4/4 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

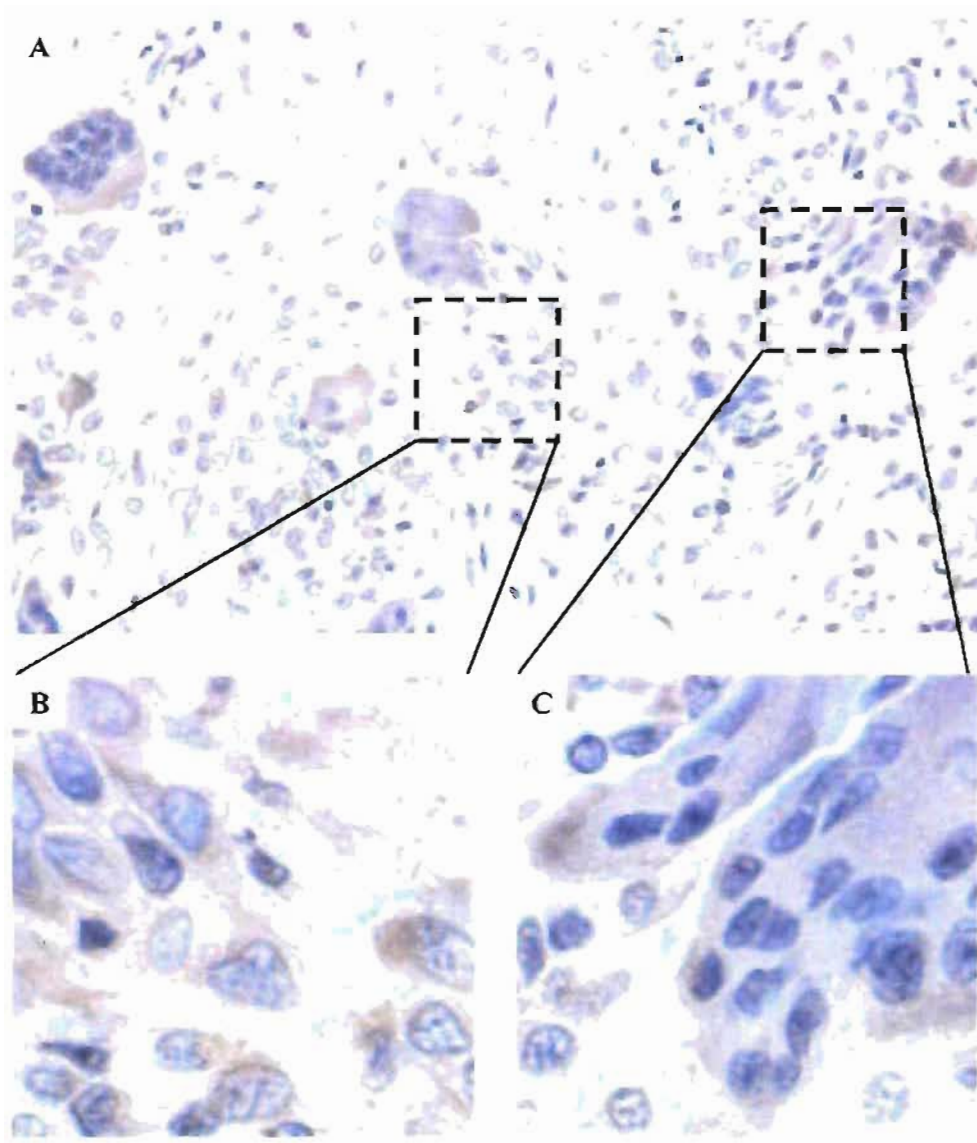


Figure 4 : Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans un tissu de tumeur à cellules géantes. Coupes représentatives d'un tissu de tumeur à cellules géantes marquées avec un anticorps polyclonal anti-endothéline-1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'endothéline-1 (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'endothéline-1 est détectée dans un tissu de tumeurs à cellules géantes. Grossissement 100X (A) et 400X (B, C).

4.2 Expression de l'ostéocrine (ostn) dans l'ostéosarcome humain

L'expression de l'ostéocrine a été mise en évidence tant au niveau du gène qu'au niveau protéique dans différents grades d'ostéosarcomes humains. Pour analyser l'expression du gène de l'ostéocrine, une réaction de RT-PCR a été réalisée sur l'ARN de huit ostéosarcomes humains (figure 5). Nous observons une bande à 378 paires de bases ayant une forte intensité pour l'ostéosarcome de grade 1/4. Par contre, l'intensité de la bande est fortement diminuée dans les grades 3/4, comparativement au grade 1/4. Les ostéosarcomes de grade 4/4 démontrent une expression encore plus faible du gène de l'ostéocrine (figure 5A). Dans le but de quantifier l'expression génique de l'ostéocrine, la densitométrie des bandes a été réalisée à partir des bandes obtenues suite aux réactions de RT-PCR avec les amorces spécifiques du gène de l'ostéocrine et de la GAPDH (tableau IV). Le test de Mann-Whitney confirme la différence d'expression entre les ostéosarcomes de grades 3/4 et ceux de grades 4/4 ($p < 0,04$) (figure 5B). La probabilité du test statistique de Mann-Whitney entre l'ostéosarcome de grade 1/4 ($n=1$) et ceux de hauts grades n'a pu être calculé vu le trop faible échantillonnage. Une réaction de RT-PCR a aussi été réalisée avec chaque échantillon en utilisant les amorces permettant de détecter la GAPDH (452 pb). Ce contrôle nous assure que la quantité d'ARN utilisée pour réaliser les diverses réactions de RT-PCR est identique pour chaque échantillon.

L'ostéocrine est une protéine qui est sécrétée en faible quantité par les ostéoblastes. Dans le but de mettre en évidence cette protéine, les ostéoblastes dérivés des ostéosarcomes humains ont été privés durant 16 heures dans du DMEM dépourvu de sérum de veau fœtal dans le but de synchroniser les cellules. Les lysats cellulaires totaux ainsi que les milieux de culture ont été récupérés et les protéines contenues dans le milieu de culture ont été concentrées de 100x par une précipitation à l'acide trichloroacétique. Des immunobuvardages de type Western ont été réalisés à partir des lysats cellulaires totaux (15 μ g) et des milieux de cultures concentrés. Nous avons détecté une très faible bande à 11,4 kDa qui correspond à la protéine de l'ostéocrine lors de l'immunobuvardage de type Western réalisé avec les milieux de cultures concentrées (figure 6A) tandis que nous ne détectons aucune bande dans les lysats cellulaires totaux (figure 6B). Des expériences d'immunohistochimie ont

également été réalisées avec des coupes de tissus d'ostéosarcomes de différents grades. Ainsi, nous avons détecté la présence de l'ostéocrine dans les ostéosarcomes de bas grade ainsi que dans ceux de haut grade (figure 7). Plus précisément, cette protéine démontre un patron d'expression cytoplasmique, malgré le fait que la protéine soit aussi exprimée dans la matrice osseuse (figure 7). Nous remarquons une différence d'expression, autant dans le nombre de cellules marquées que dans l'intensité du marquage, entre les grades 1/4 (figure 7A, 7B) et les grades 4/4 (figure 7C, 7D). En effet, le pourcentage de cellules marquées est supérieur pour les tumeurs de grade 1/4 ($99,77\% \pm 3,84\%$) comparativement aux tumeurs de grades 4/4 ($9,74\% \pm 0,94\%$). Cette différence d'expression entre les ostéosarcomes de grade 1/4 ($n=3$) et ceux de grade 4/4 ($n=3$) est validé par le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (tableau VII). L'expression de l'ostéocrine a également été détectée dans un tissu de tumeur à cellules géantes. Le nombre de cellules exprimant l'ostéocrine est de $89,27\% \pm 2,64\%$ (tableau VII). Une fois de plus, le marquage de ces cellules est majoritairement cytoplasmique (figure 8).

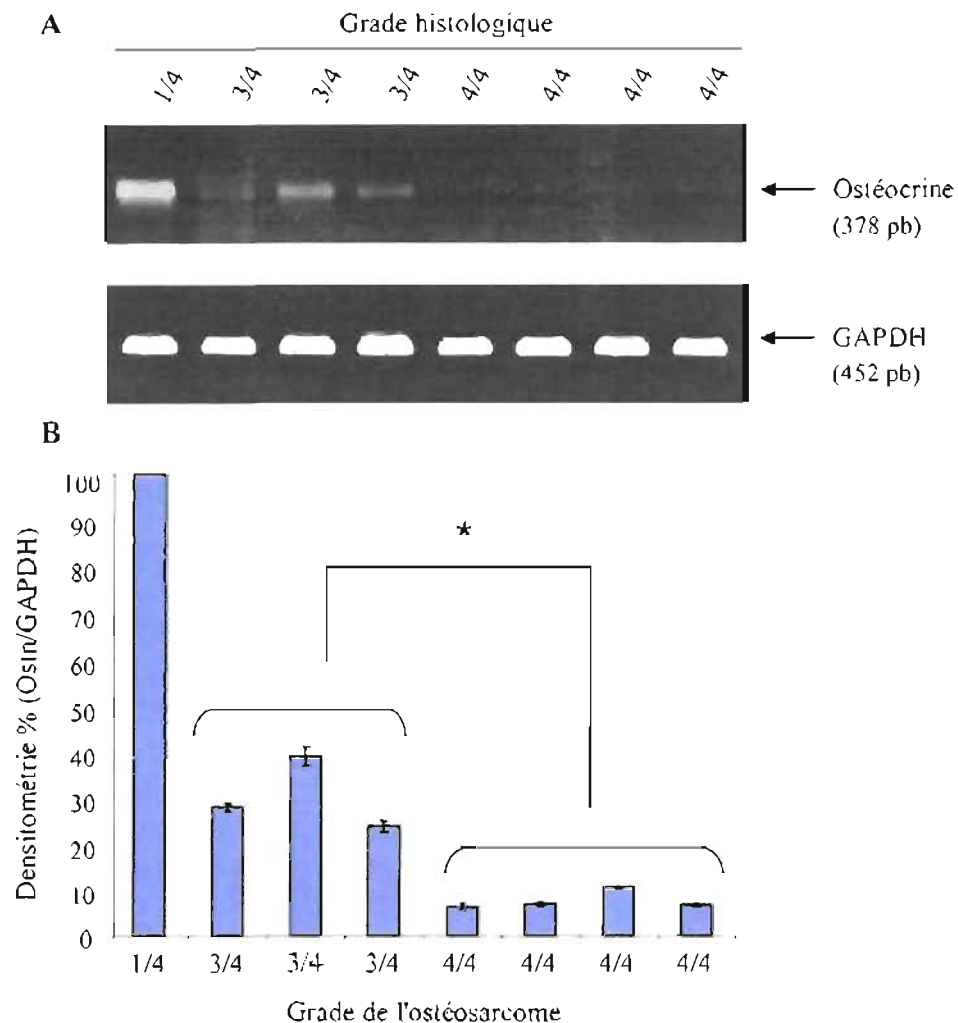


Figure 5 : Expression du gène de l'ostéocrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains. Les ostéoblastes ont été dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains (n=8). L'ARN a été extrait des cellules qui ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. A) Les produits de la réaction de RT-PCR pour l'ostéocrine (378 pb) et la GAPDH (452 pb) ont été visualisés aux ultraviolets à l'aide du bromure d'éthidium contenu dans le gel d'agarose 1,2%. B) L'histogramme représente la quantification de la densité des bandes observées à 378 pb correspondant à l'ostéocrine, rapporté à la densité des bandes à 452 pb correspondant à la GAPDH (Ostn/GAPDH). *Test de Mann-Whitney réalisé sur les valeurs moyennes des ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) par rapport aux ostéosarcomes de grade 4/4 (n=4) ($p < 0,04$). Ostn: Ostéocrine, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate d'hydrogenase.

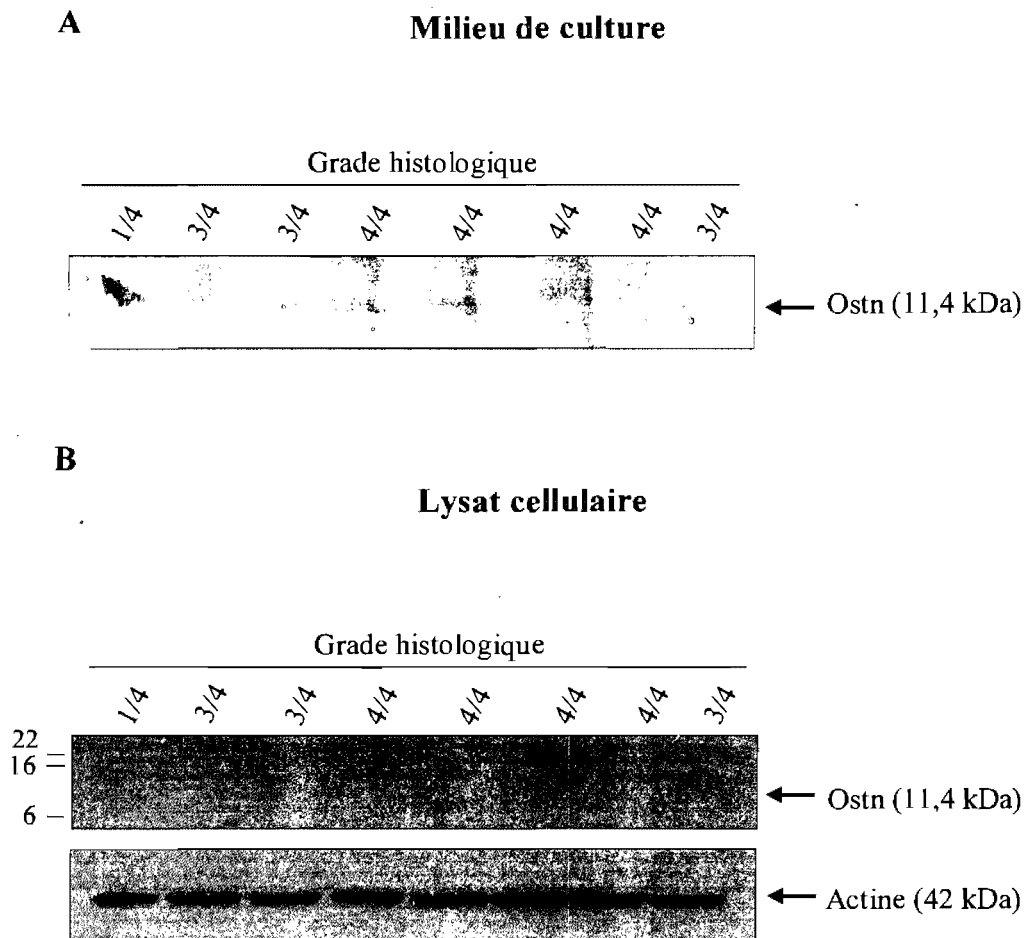


Figure 6 : Expression protéique de l'ostéocrine (Ostn) dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains. L'immunobuvardage de type Western a été réalisé à partir d'extraits protéiques totaux (15 μg / puit) provenant des ostéoblastes dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains ($n=8$). Les ostéoblastes ont été cultivés dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. La détection des protéines spécifiques a été réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-ostéocrine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et d'un anticorps polyclonal anti-actine (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A) La majorité de l'ostéocrine est détecté dans le milieu de culture, suite à une concentration de 100x à l'acide trichloroacétique. B) L'ostéocrine n'est pas détecté dans les lysats cellulaires totaux. L'actine représente le contrôle pour la quantité protéique. Ostn: Ostéocrine.

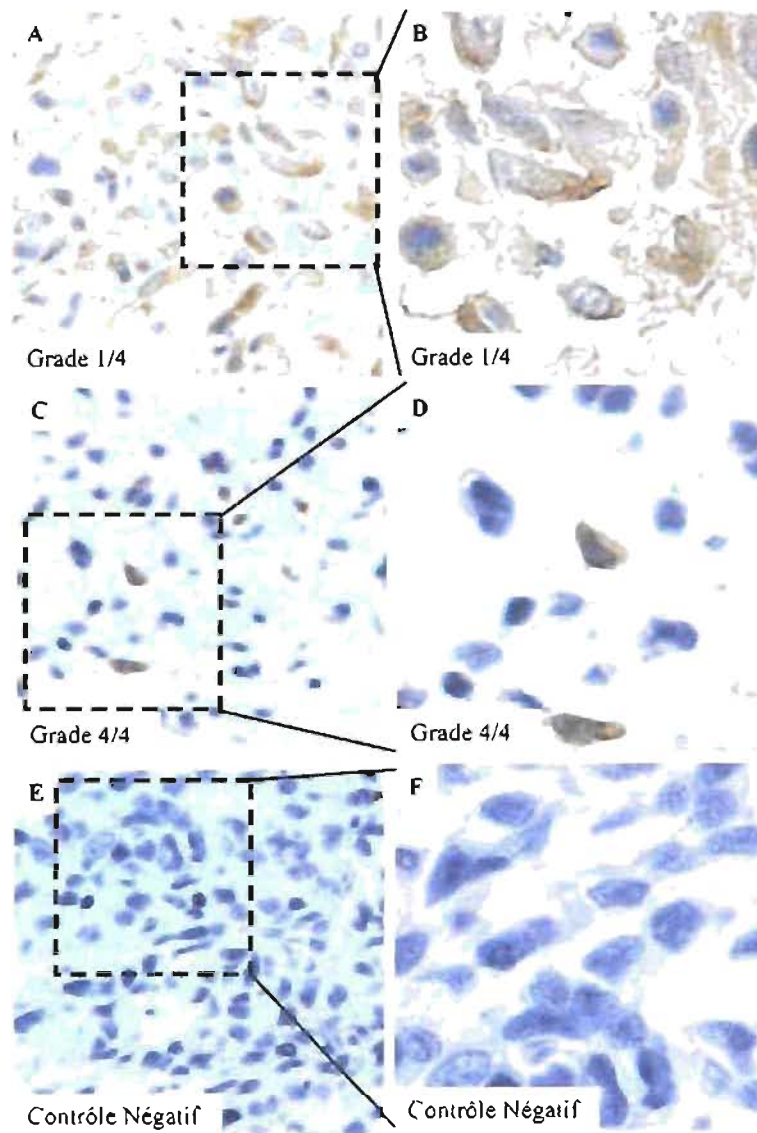


Figure 7 : Expression protéique de l'ostéocrine dans des tissus d'ostéosarcomes humains. Coupes représentatives de tissus d'ostéosarcomes humains marquées avec un anticorps monoclonal anti-ostéocrine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ostéocrine (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'ostéocrine est détecté dans des tissus d'ostéosarcomes humains de grade 1/4 (A, B) ainsi que des tissus d'ostéosarcomes de grade 4/4 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

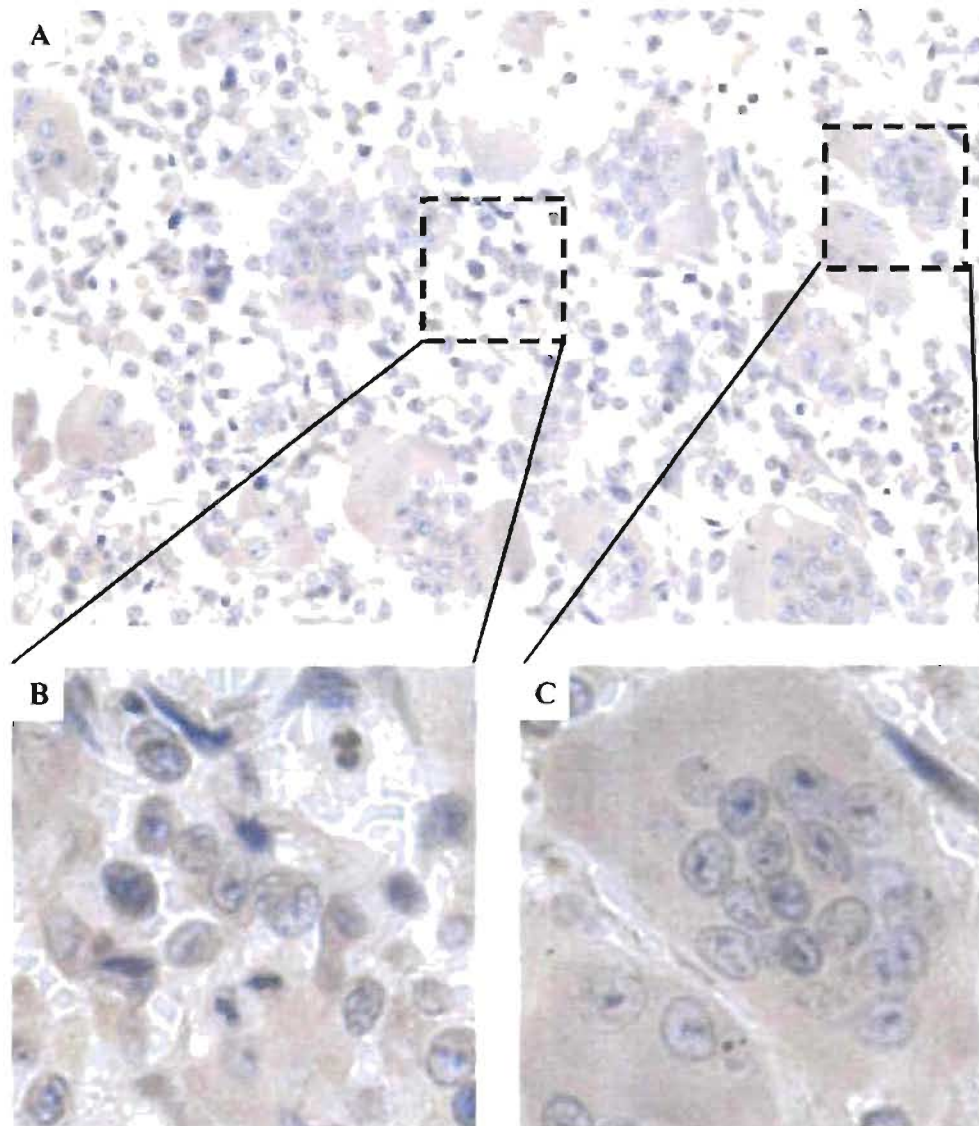


Figure 8 : Expression protéique de l'ostéocrine dans un tissu de tumeur à cellules géantes. Coupes représentatives d'un tissu de tumeur à cellules géantes marquées avec un anticorps monoclonal anti-ostéocrine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ostéocrine (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'ostéocrine est détecté dans un tissu de tumeur à cellules géantes. Grossissement 100X (A) et 400X (B, C).

4.3 Expression de la PARP-1 dans l'ostéosarcome humain

Dans le but de mettre en évidence l'importance de la PARP-1 dans l'ostéosarcome, son expression génique et protéique a été étudiée dans des tumeurs osseuses de différent grade. Tout d'abord, des réactions de RT-PCR, à partir d'ARN extrait d'ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains, ont été réalisées sur huit ostéosarcomes selon les conditions mentionnées au tableau IV. La bande représentant l'amplification d'une partie spécifique du gène de la PARP-1 (987 pb) a été détectée dans tous les cas d'ostéosarcomes (figure 9A). Cependant, nous avons constaté que l'intensité de la bande était plus forte dans les hauts grades d'ostéosarcomes comparativement aux faibles grades. Pour quantifier cette expression, la densitométrie des bandes (figure 9B) a été réalisée à partir des bandes obtenues suite aux réactions de RT-PCR réalisées avec les amorces spécifiques du gène de la PARP-1 et de la GAPDH (tableau IV). Le test de Mann-Whitney confirme la différence d'expression du gène de la PARP-1 entre les ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) et ceux de grade 4/4 (n=4) ($p < 0,04$). La probabilité du test statistique de Mann-Whitney entre l'OS de grade 1/4 (n=1) et ceux de hauts grades n'a pu être calculé vu le trop faible échantillonnage. Une réaction de RT-PCR a également été réalisée avec chaque échantillon en utilisant les amorces permettant de détecter la GAPDH (452 pb). Ce contrôle nous assure que la quantité d'ARN utilisée pour réaliser les diverses réactions de RT-PCR est identique pour chaque échantillon.

Les immunobuvardages de type Western réalisés à partir des extraits protéiques totaux (15 μ g) ont démontré le même patron d'expression que celui mis en évidence au niveau génique. Ainsi, les ostéosarcomes de grade 4/4 expriment davantage la protéine PARP-1 comparativement au grade 3/4 (figure 10A). Cette différence d'expression de la PARP-1 selon le grade est validée statistiquement par le test de Mann-Whitney suite à la densitométrie des bandes obtenues à 113 kDa (PARP-1) par rapport aux bandes obtenues à 42 kDa (actine) ($p < 0,04$) (figure 10B). Étant donné que nous ne pouvions pas démontrer une différence d'expression significative de la PARP-1 entre les bas grades et les hauts grades, nous avons analysé l'expression de cette protéine par la technique d'immunohistochimie. Ainsi, le pourcentage de cellules marquées suite à une immunohistochimie réalisée avec un anticorps polyclonal anti-PARP-1 est de $28,56\% \pm 1,65\%$ pour les grades 1/4 et de $77,30\% \pm$

10,06% pour les grades 4/4 (figure 11). Selon le test de Mann-Whitney, la différence d'expression entre les ostéosarcomes de grade 1/4 (n=3) et 4/4 (n=3) est statistiquement différente ($p < 0,05$) (tableau VII).

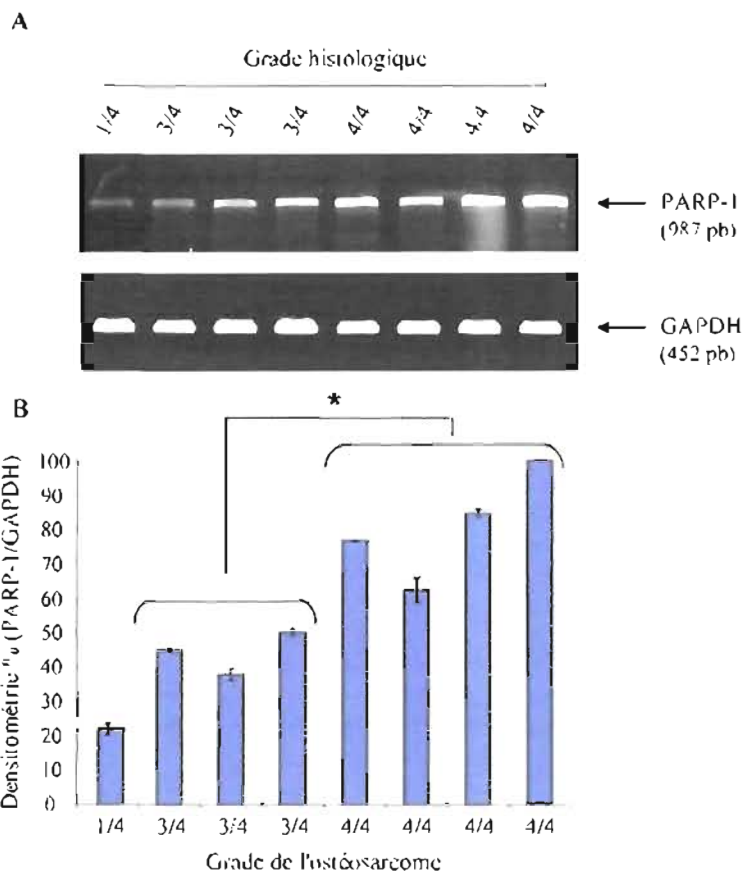


Figure 9: Expression du gène de la PARP-1 dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains. Les ostéoblastes ont été dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains (n=8). L'ARN a été extrait des cellules qui ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. A) Les produits de la réaction de RT-PCR pour la PARP-1 (987 pb) et la GAPDH (452 pb) ont été visualisés aux ultraviolets à l'aide du bromure d'éthidium contenu dans le gel d'agarose 1,2%. B) L'histogramme représente la quantification de la densité des bandes observées à 987 pb correspondant à la PARP-1, rapporté à la densité des bandes à 452 pb correspondant à la GAPDH (PARP-1/GAPDH). *Test de Mann-Whitney réalisé sur les valeurs moyennes des ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) par rapport aux ostéosarcomes de grade 4/4 (n=4) ($p < 0,04$). PARP-1: poly (ADP-ribose) polymérase, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

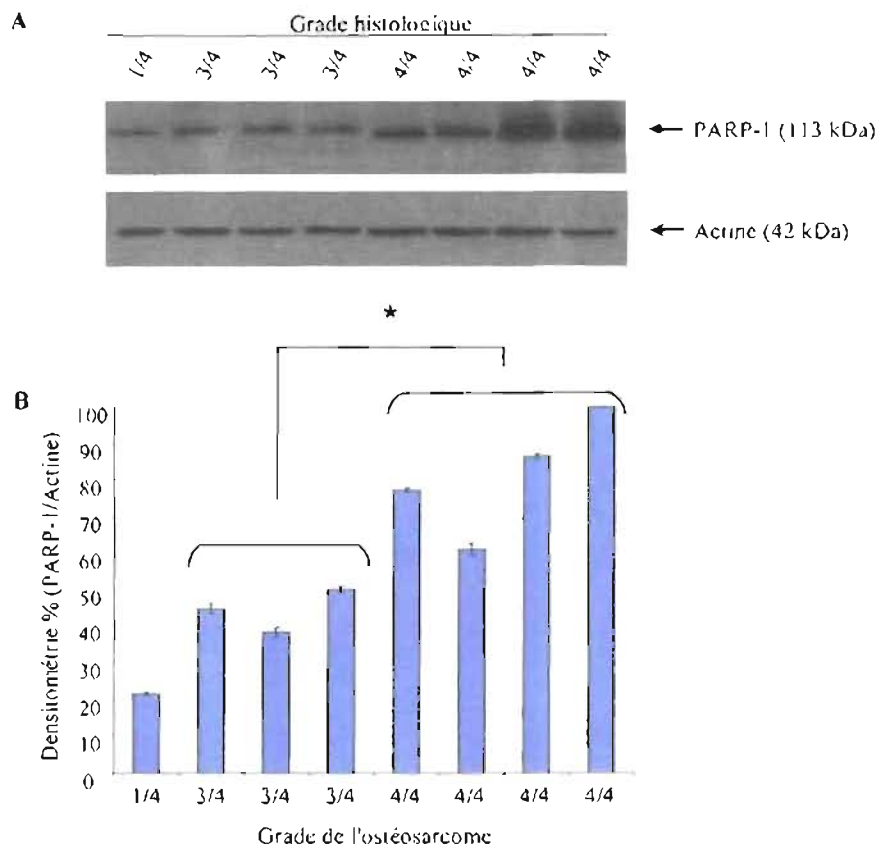


Figure 10 : Expression protéique de la PARP-1 dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains. L'immunobuvardage de type Western a été réalisé à partir d'extraits protéiques totaux (15 µg / puit) provenant des ostéoblastes dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains (n=8). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0,0% (v/v) de sérum de veau foetal. A) La détection des protéines spécifiques a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-PARP-1 (0,1 µg/mL) et d'un anticorps polyclonal anti-actine (0,05 µg/mL). L'actine représente le contrôle pour la quantité protéique. B) L'histogramme représente la quantification de la densité des bandes observées à 113 kDa correspondant à la PARP-1, rapporté à la densité des bandes à 42 kDa correspondant à l'actine (PARP-1/Actine). *Test de Mann-Whitney réalisé sur les valeurs moyennes des ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) par rapport au grade 4/4 (n=4) (p < 0,04). PARP-1: poly (ADP-ribose) polymérase.

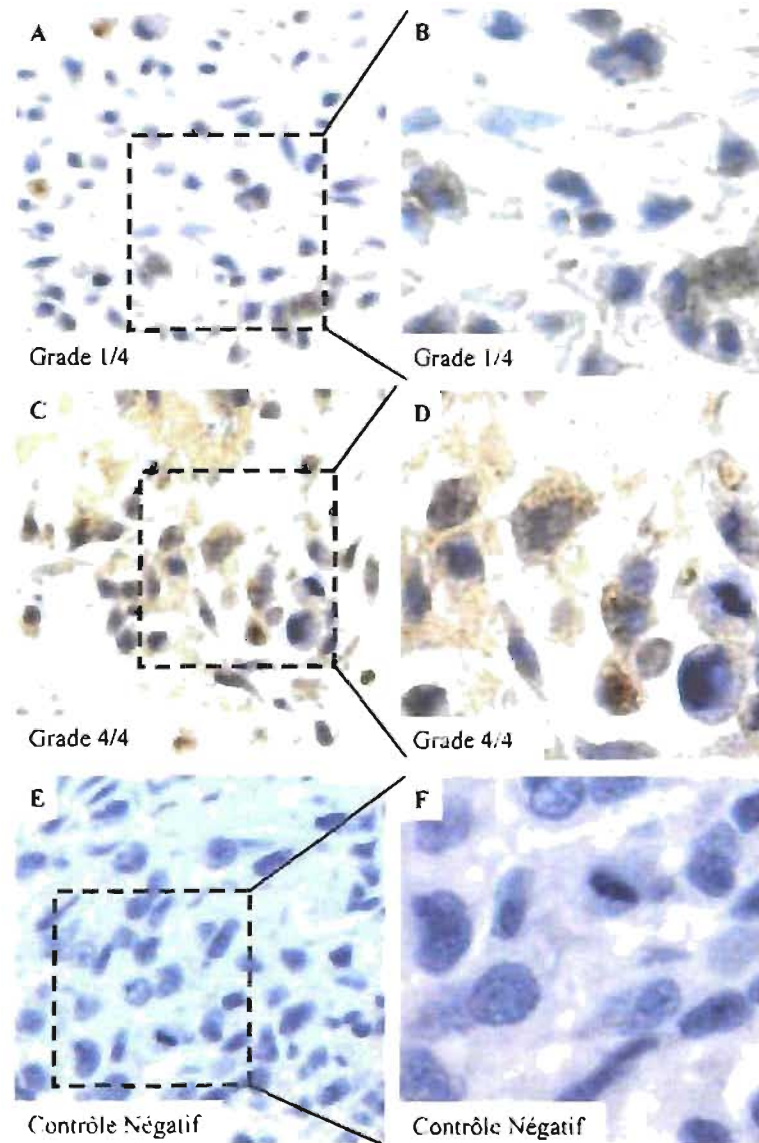


Figure 11: Expression protéique de la PARP-1 dans des tissus d'ostéosarcomes humains. Coupes représentatives de tissus d'ostéosarcomes humains marquées avec un anticorps polyclonal anti-PARP-1 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique et nucléaire de la PARP-1 (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. La PARP-1 est détectée dans des tissus d'ostéosarcomes humains de grade 1/4 (A, B) ainsi que dans des tissus d'ostéosarcomes de grade 4/4 (C, D). Contrôle Négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

4.4 Expression de l'eZRINE dans l'ostéosarcome humain

L'eZRINE est une protéine qui semble corrélérer avec l'apparition des métastases dans différents cancers. Dans le but de mettre en évidence l'expression de l'eZRINE dans l'ostéosarcome humain, nous avons étudié cette nouvelle molécule au niveau du gène et de la protéine. Tout d'abord, nous avons réalisé des expériences de RT-PCR à partir d'ARN extrait des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains (n=8). Nous avons détecté le gène de l'eZRINE dans tous les cas d'ostéosarcomes (figure 12). Cependant, nous observons une différence d'intensité de la bande à 660 paires de base (figure 12A). En effet, cette bande semble plus intense pour les ostéosarcomes de haut grade, comparativement au bas grade. Dans le but de mettre en évidence cette différence d'intensité, nous avons quantifié, par densitométrie, les bandes obtenues à 660 paires de base par rapport à celles obtenues à 452 paires de base qui représente la GAPDH (figure 12B). Il existe une différence d'expression du gène de l'eZRINE selon le test de Mann-Whitney, entre les tumeurs de grade 3/4 et celles de grade 4/4 ($p < 0,04$) (figure 12B).

L'expression protéique de l'eZRINE a aussi été déterminée et quantifiée suite à des immunobuvardages de type Western (figure 13). La densitométrie des bandes a été réalisée à partir des bandes obtenues suite aux immunobuvardages de types Western réalisés avec les anticorps spécifiques, anti-eZRINE et anti-actine. Le test de Mann-Whitney confirme la différence d'expression entre les ostéosarcomes de grade 3/4 et ceux de grade 4/4 selon une probabilité de $p < 0,05$ (figure 13B). Toujours dans le but d'établir une corrélation entre le grade histologique et l'expression de l'eZRINE, des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur des coupes de tissus d'ostéosarcomes humains (figure 14). Le marquage cytoplasmique, mis en évidence surtout dans les ostéosarcomes de grade 4/4, a été quantifié et analysé statistiquement à l'aide du test de Mann-Whitney. Ainsi, $20,51\% \pm 8,89\%$ des cellules sont marquées dans les grades 1/4 (n=3) comparativement à $81,88\% \pm 10,61\%$ pour les tumeurs de grade 4/4 (n=3) (tableau VII). Suite au test de Mann-Whitney, nous avons constaté qu'il existe une différence d'expression significative entre les ostéosarcomes de bas grade et ceux de haut grade ($p < 0,05$) (tableau VII).

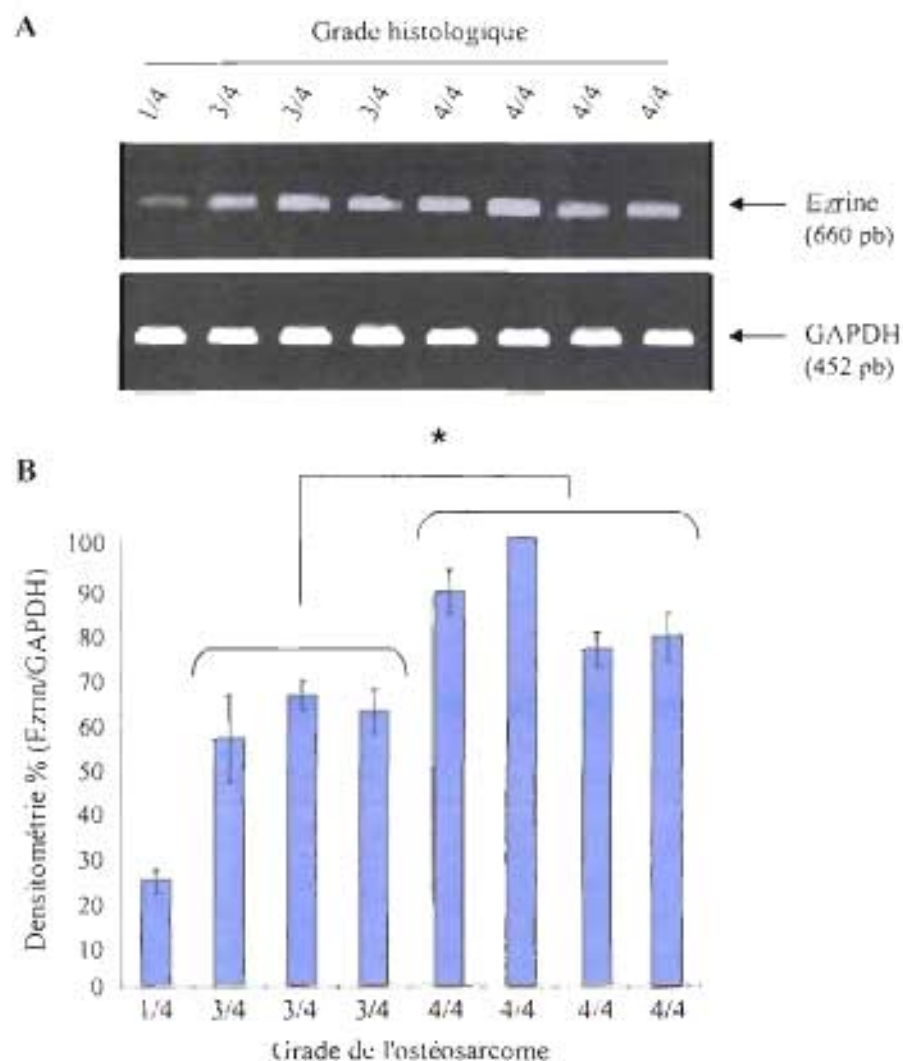


Figure 12 : Expression du gène de l'eitrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains. Les ostéoblastes ont été dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains (n=8). L'ARN a été extrait des cellules qui ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. A) Les produits de la réaction de RT-PCR pour l'eitrine (660 pb) et la GAPDH (452 pb) ont été visualisés aux ultraviolets à l'aide du bromure d'éthidium contenu dans le gel d'agarose 1,2%. B) L'histogramme représente la quantification de la densité des bandes observées à 660 pb correspondant à l'eitrine, rapporté à la densité des bandes à 452 pb correspondant à la GAPDH (Ezrine/GAPDH). *Test de Mann-Whitney réalisé sur les valeurs moyennes des ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) par rapport au grade 4/4 (n=4) ($p < 0,04$). GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

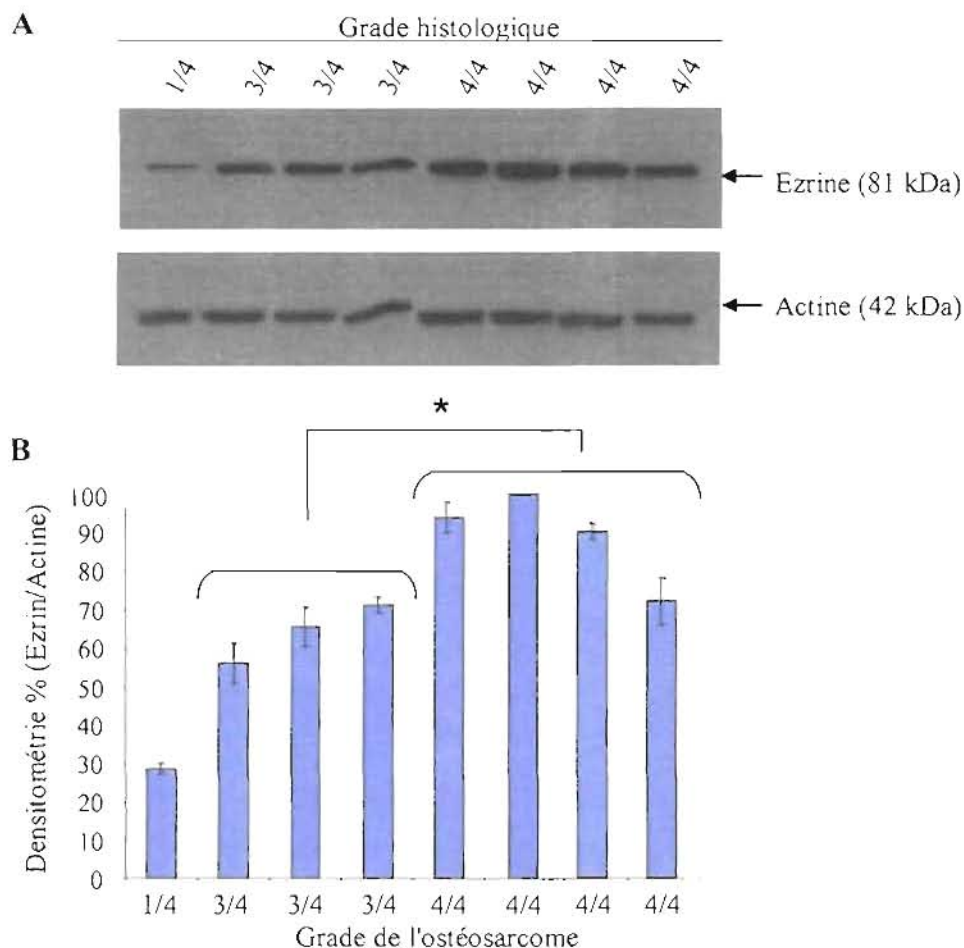


Figure 13 : **Expression protéique de l'ezrine dans des ostéoblastes dérivés d'ostéosarcomes humains.** L'immunobuvardage de type Western a été réalisé à partir d'extraits protéiques totaux (15 µg / puit) provenant des ostéoblastes dérivés de biopsies d'ostéosarcomes humains (n=8). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM additionné de 10% (v/v) de sérum de veau foetal et privées durant la nuit dans du DMEM additionné de 0% (v/v) de sérum de veau foetal. La détection des protéines spécifiques a été réalisée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ezrine (0,5 µg/mL) et d'un anticorps polyclonal anti-actine (0,05 µg/mL). L'actine représente le contrôle pour la quantité protéique. B) L'histogramme représente la quantification de la densité des bandes observées à 81 kDa correspondant à l'ezrine, rapporté à la densité des bandes à 42 kDa correspondant à l'actine (Ezrine/Actine). *Test de Mann-Whitney réalisé sur les valeurs moyennes des ostéosarcomes de grade 3/4 (n=3) par rapport au grade 4/4 (n=4) ($p < 0,05$).

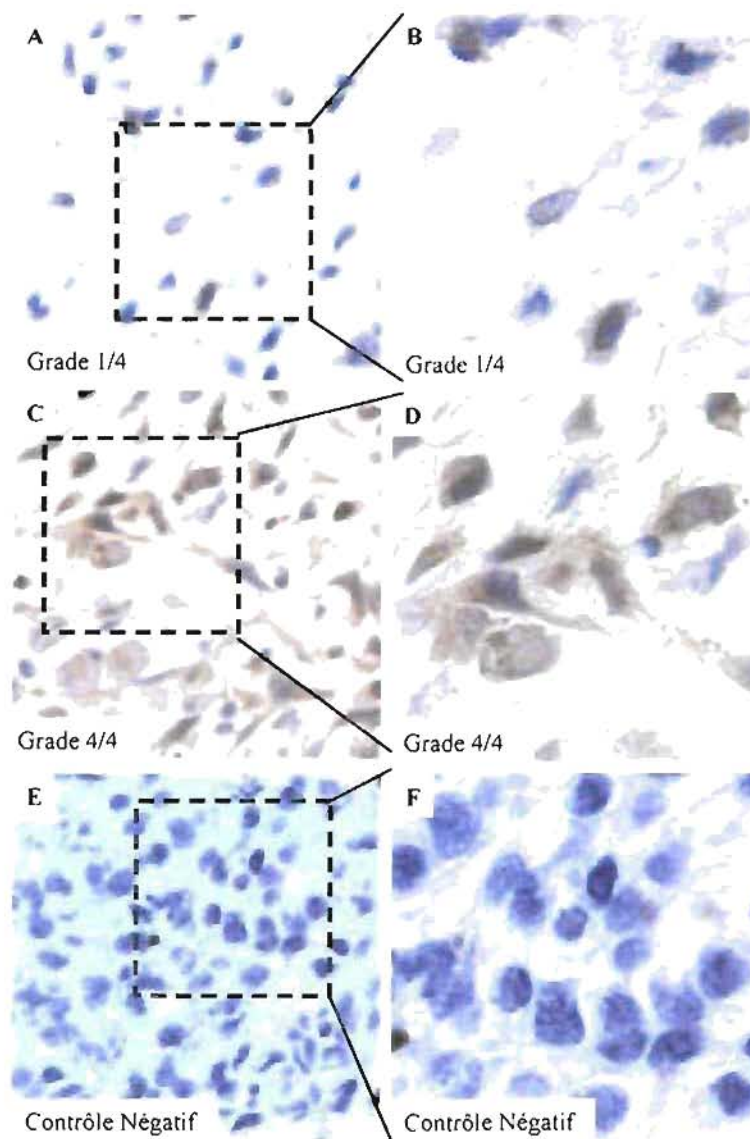


Figure 14 : **Expression protéique de l'ezrine dans des tissus d'ostéosarcomes humains.** Coupes représentatives de tissus d'ostéosarcomes humains marquées avec un anticorps polyclonal anti-ezrine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) est utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ezrine (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. La PARP-1 est détectée dans des tissus d'ostéosarcomes humains de grade 1/4 (A, B) ainsi que dans des tissus d'ostéosarcomes de grade 4/4 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

Tableau VII : Analyses statistiques de l'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1 et de l'ezrine, suite à des immunohistochimies réalisées sur des coupes de tissus d'ostéosarcomes humains. Le test de Mann-Whitney a été réalisé sur les valeurs moyennes du pourcentage des cellules marquées dans les ostéosarcomes de grade 1/4 (n=3) par rapport aux ostéosarcomes de grade 4/4 (n=4). ET-1 : Endothéline-1, Ostn : Ostéocrine, PARP-1 : poly (ADP-ribose) polymérase, TCG : Tumeur à cellules géantes, N/D : non déterminé.

Protéine	Grade	% cellules marquées	P
		± écart-type	(test Mann-Whitney)
ET-1	TCG	23,71 ± 4,23	---
	1/4	43,33 ± 15,27	< 0,05
	4/4	90,35 ± 4,14	
Ostn	TCG	89,27 ± 2,64	---
	1/4	99,77 ± 3,84	< 0,05
	4/4	9,74 ± 0,94	
PARP-1	1/4	28,56 ± 1,65	< 0,05
	4/4	77,30 ± 10,06	
Ezrine	1/4	20,51 ± 8,89	< 0,05
	4/4	81,88 ± 10,61	

4.5 Effet de l'antagoniste du récepteur ET_A sur la taille des tumeurs induites *in vivo*

L'invasion cellulaire est un phénomène complexe qui intervient dans le développement et la propagation des cellules tumorales. L'ET-1 est connu pour avoir un rôle important dans la progression et dans l'invasion cellulaire. Dans le but de mettre en évidence le rôle du système endothéline, plus précisément le rôle du récepteur ET_A dans l'invasion de l'ostéosarcome, nous avons réalisé une étude *in vivo* à l'aide de six souris *nude*. Ainsi, suite à une injection de 1×10^7 cellules MNNG/HOS dans le flanc droit des souris *nude*, quatre d'entre elles ont développé une tumeur d'une taille de 5 mm en 32 jours. Les deux autres souris ont été

éliminées de l'étude puisqu'aucune tumeur ne s'est développée et ce, même après 60 jours. Les quatre souris ont été séparées en deux groupes : un groupe a reçu des injections de PBS et l'autre des injections de BQ-123 (6 µg/kg/jour). Suite à quatre semaines d'injection quotidienne, nous avons constaté que l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ-123, a eu un effet sur la taille des tumeurs que les souris *nude* ont développé. En effet, les tumeurs sont plus petites chez les souris ayant reçu les injections BQ-123 par rapport à celles ayant reçu les injections de PBS (tableau VIII). L'effet de l'antagoniste sur la taille des tumeurs est aussi visible sur les radiographies qui ont été prises lors du sacrifice des souris, soit après quatre semaines d'injections de PBS (contrôle) ou de BQ-123 (figure 15). L'effet de l'antagoniste sur la taille de la tumeur est encore plus marquant sur la figure représentant l'aspect macroscopique des tumeurs (figure 16).

Tableau VIII : Effet de l'antagoniste du récepteur ET_A (BQ-123) sur la taille d'une tumeur induite *in vivo* chez la souris *nude*. Une injection en sous-cutanée sur le flanc droit de 1×10^7 cellules MNNG/HOS a été réalisée chez quatre souris *nude*. Les quatre souris ont développé une tumeur solide d'une taille de 5 mm en 32 jours. Après 32 jours, les quatre souris ont reçu quotidiennement des injections en sous-cutanée durant 28 jours de PBS ou de BQ-123 (6µg/kg). Les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été récupérées et mesurées. Le poids correspond à la dernière pesée avant le sacrifice des souris. La dimension des tumeurs correspond à la mesure prise dans la zone la plus large.

<i>Souris nude</i>	Injections	Poids de la souris (g)	Dimension de la tumeur (mm)
1	PBS	33,8	16,5 mm x 7,5 mm
2	PBS	32,6	17,0 mm x 11,0 mm
3	BQ-123	37,6	8,5 mm x 6,5 mm
4	BQ-123	35,2	7,0 mm x 7,5 mm

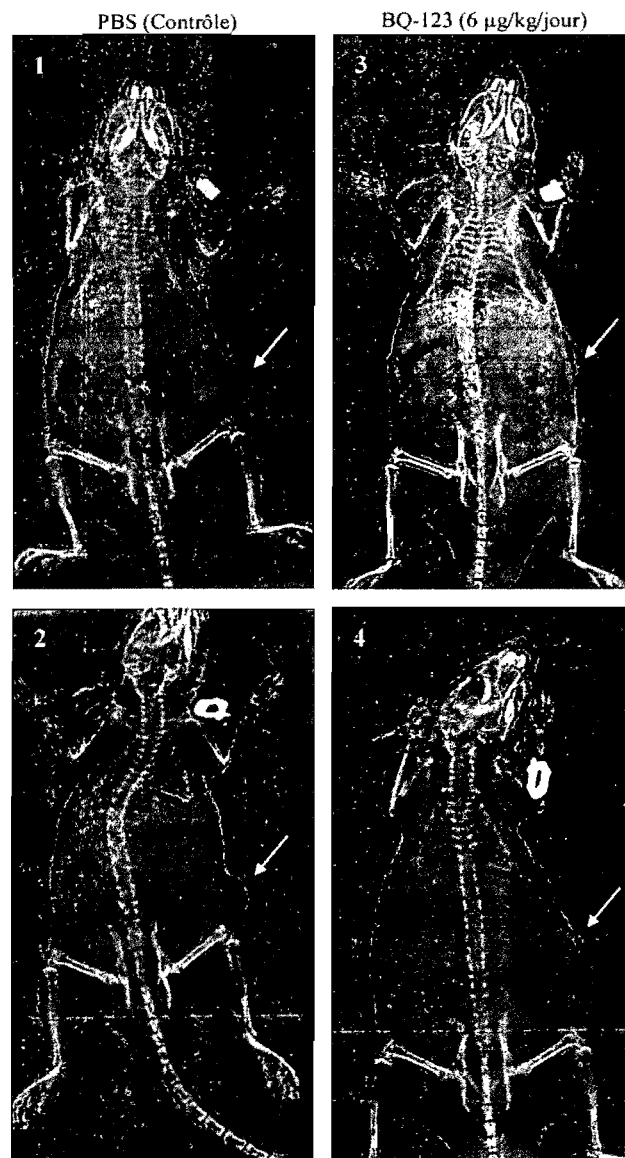


Figure 15 : Radiographies démontrant l'effet de l'antagoniste du récepteur ET_A (BQ-123) sur la taille d'une tumeur induite *in vivo* chez la souris *nude*. Une injection en sous-cutanée sur le flanc droit de 1×10^7 cellules MNNG/HOS a été réalisée chez quatre souris *nude*. Les quatre souris ont développé une tumeur solide d'une taille de 5 mm en 32 jours. Après 32 jours, les quatre souris ont reçu quotidiennement des injections en sous-cutanée durant 28 jours de PBS (1,2) ou de BQ-123 selon une dose quotidienne de $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (3, 4). Les radiographies ont été prises en position postérieure/antérieure. Les flèches pointent vers la tumeur développée au niveau du flanc droit. Le numéro de la souris correspond aux données du tableau VII.

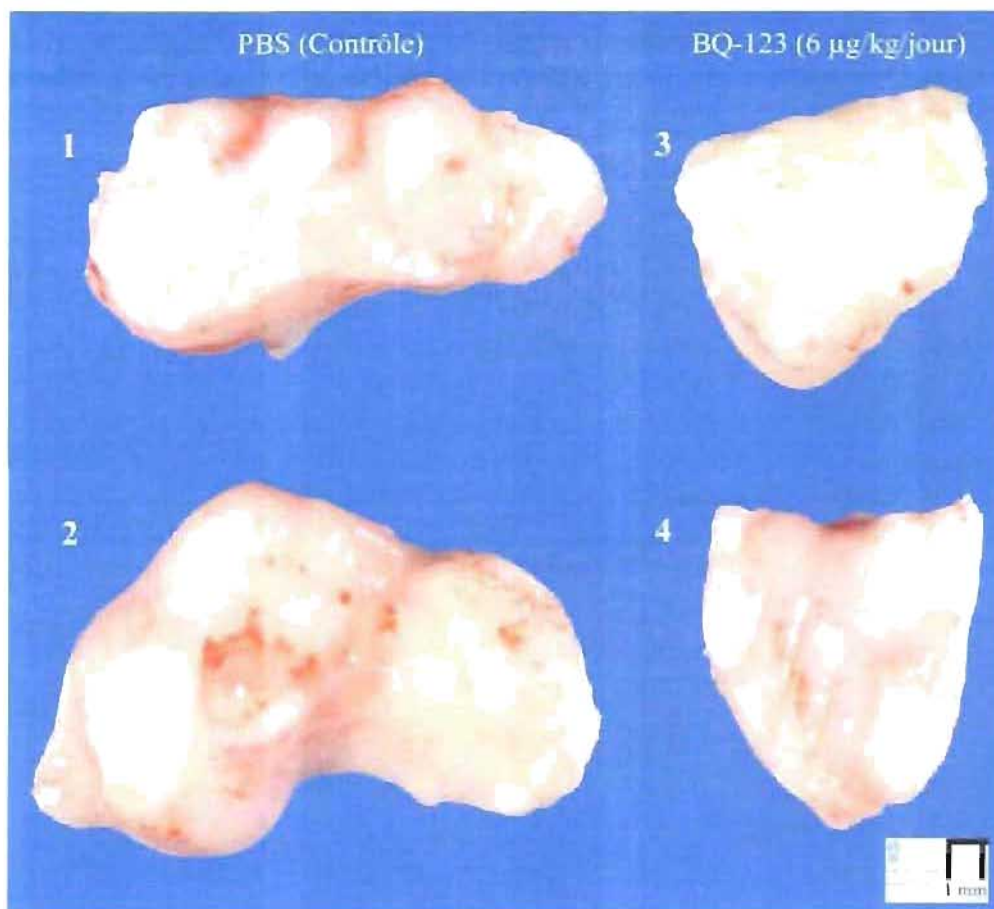


Figure 16 : Apparence macroscopique des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*. Une injection en sous-cutanée sur le flanc droit de 1×10^7 cellules MNNG/HOS a été réalisée chez quatre souris *nude*. Les quatre souris ont développé une tumeur solide d'une taille de 5 mm en 32 jours. Après 32 jours, les quatre souris ont reçu quotidiennement des injections en sous-cutanée durant 28 jours de PBS ou de BQ-123 (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Les souris ont été sacrifiées dans une chambre à CO_2 , les tumeurs ont été récupérées, évaluées macroscopiquement puis incluses en paraffine. La taille des tumeurs développées chez les souris ayant reçu des injections de PBS (1, 2) est plus grande que la taille des tumeurs développées chez les souris ayant reçu des injections de BQ-123 (3, 4). Le numéro de la tumeur correspond aux données du tableau VII.

4.6 Évaluation histologique des poumons et des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*

Dans le but de déterminer si l'antagoniste du récepteur ET_A, le BQ-123, a eu un effet sur l'invasion des cellules tumorales chez les souris *nude*, les poumons, principal site des métastases de l'ostéosarcome, ainsi que la tumeur en elle-même ont été prélevés et inclus en paraffine, suite aux injections de PBS ou de BQ-123 durant quatre semaines. Des colorations à l'éosine/hématoxyline nous ont permis de visualiser les différentes structures qui composent ces tissus. Ainsi, l'hématoxyline Harris permet de visualiser les noyaux des cellules (coloration bleue), tandis que l'éosine permet de visualiser le cytoplasme des cellules (coloration rose). Suite à l'analyse histologique par un pathologiste de l'Hôpital Sainte-Justine des colorations des coupes de poumons, aucun tissu était composé de cellules tumorales (figures 17, 18). En effet, les coupes histologiques des poumons révèlent la présence de cellules normales seulement.

Quant à l'analyse histologique des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*, nous constatons la présence de plusieurs zones de cellules tumorales (figures 19B, 20B) ainsi que des zones de nécrose (figure 19C, 20C). Ces zones de nécrose semblent être plus présentes dans les tumeurs des souris ayant reçu des injections de BQ-123 (figure 20C), comparativement aux tumeurs des souris ayant reçu des injections de PBS (figure 19C).

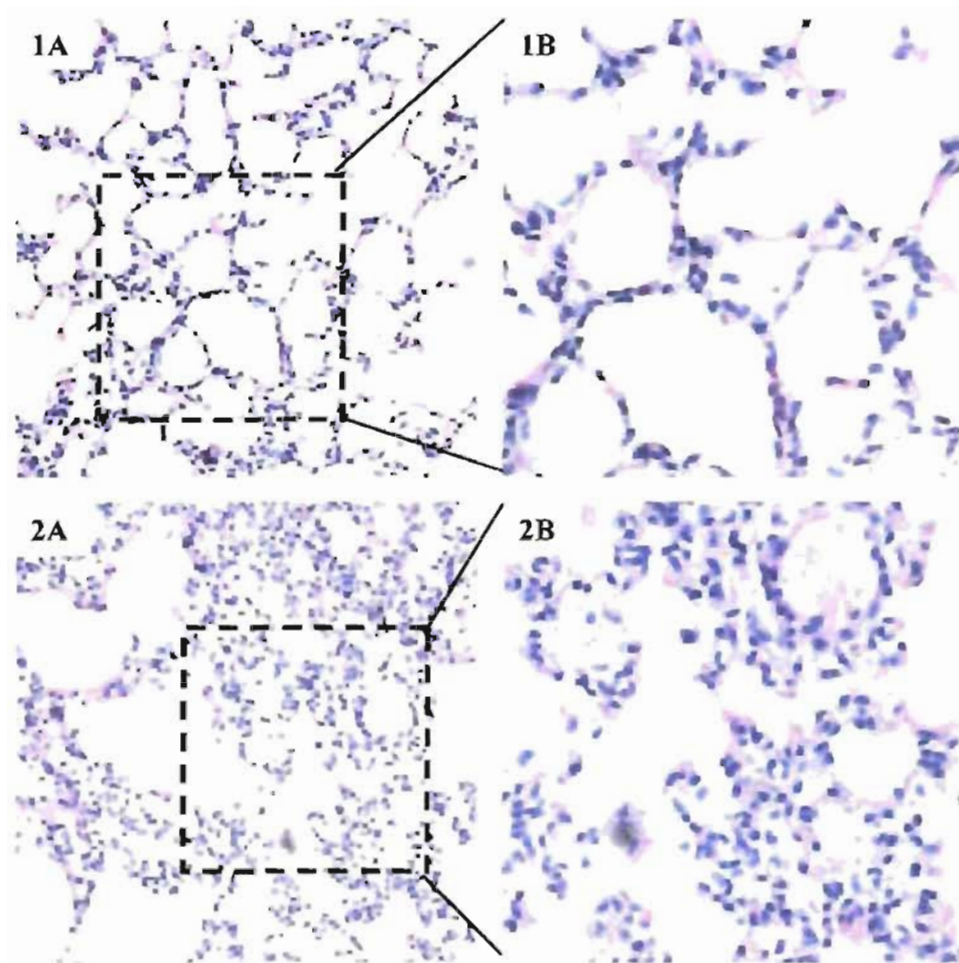


Figure 17 : Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des coupes de poumons de souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (contrôle). Les poumons des souris *nude* ont été récupérés suite à l'expérience *in vivo* (tableau VIII). Ces tissus ont été fixés, enrobés dans la paraffine et des coupes de 5 μ m ont été réalisées. Suite aux injections de PBS, aucune métastase pulmonaire n'est détectée dans les coupes de poumons. Grossissement de 100X (1A, 2A) et de 400X (1B, 2B).

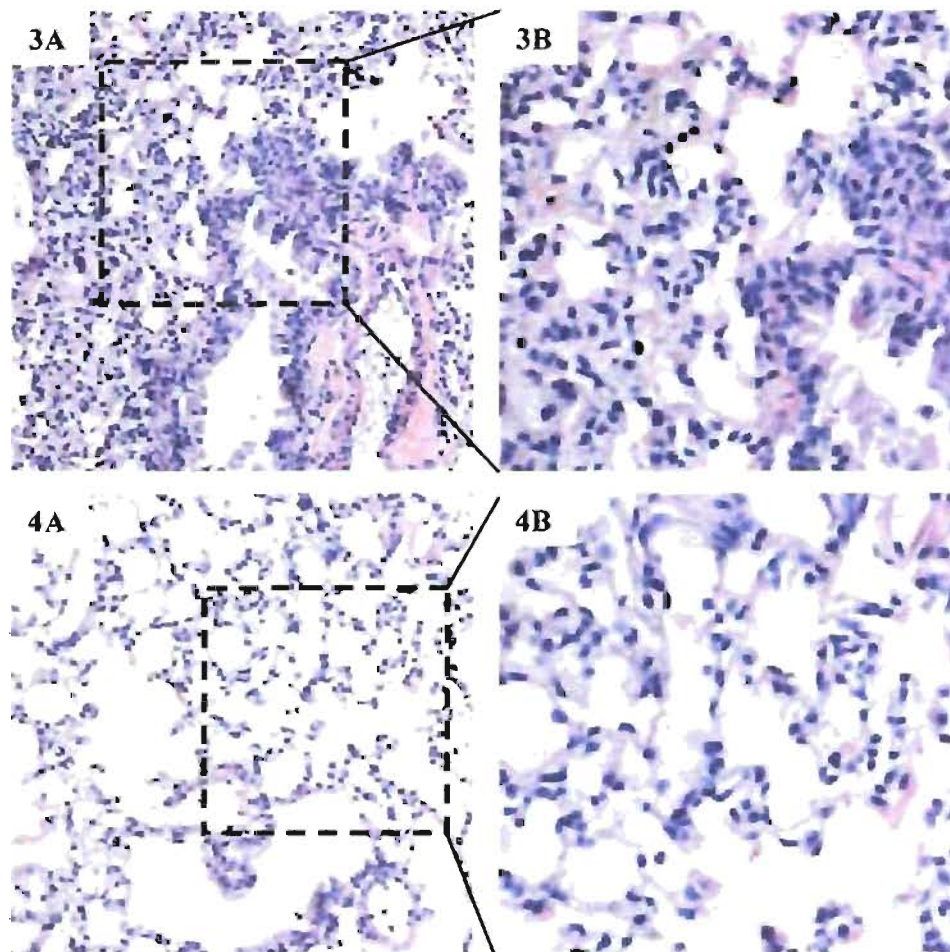


Figure 18 : Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des coupes de poumons de souris *nude* ayant reçu des injections de BQ-123. Les poumons des souris *nude* ont été récupérés suite à l'expérience *in vivo* (tableau VIII). Ces tissus ont été fixés, enrobés dans la paraffine et des coupes de 5 μm ont été réalisées. Suite aux injections de BQ-123, aucune métastase pulmonaire n'est détectée dans les coupes de poumons. Grossissement de 100X (3A, 4A) et de 400X (3B, 4B).

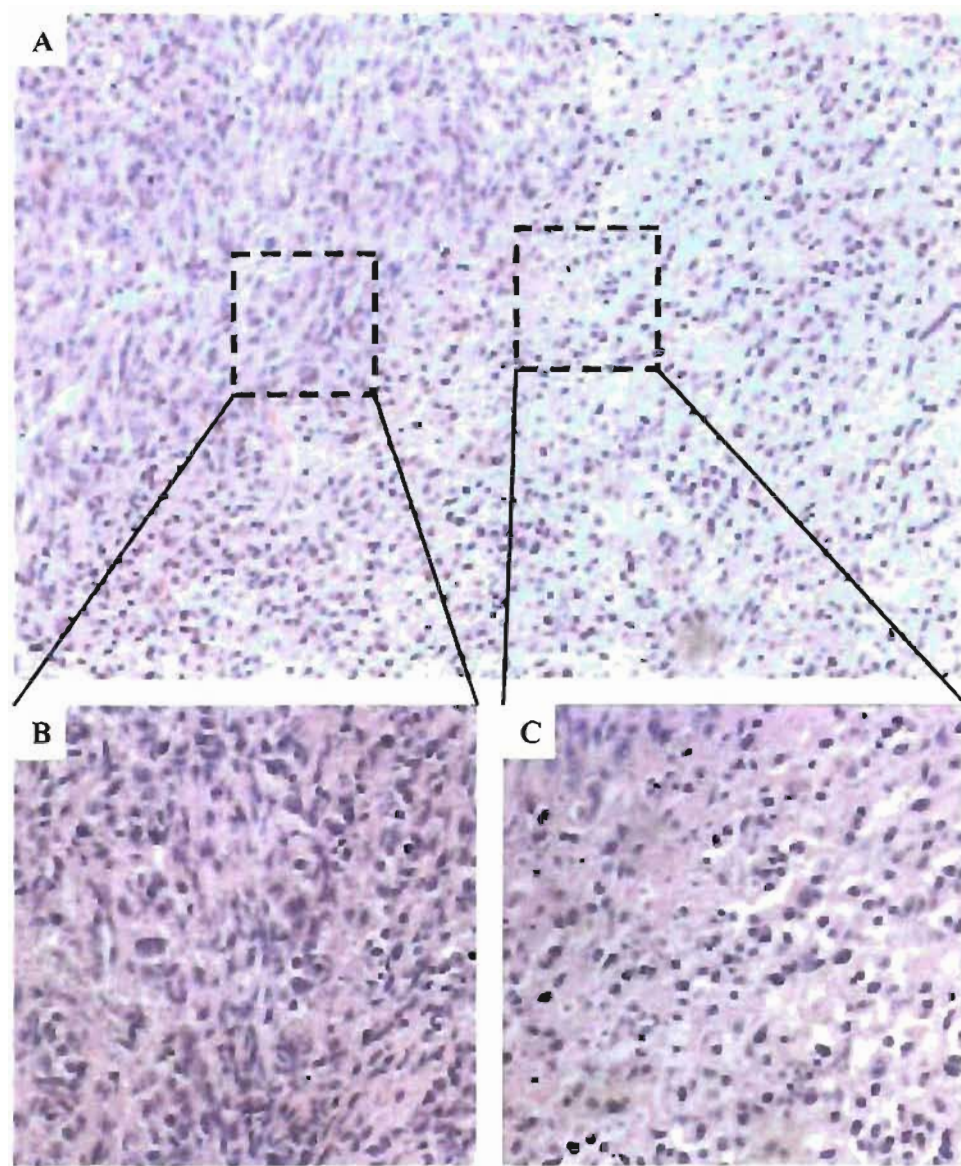


Figure 19 : Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (contrôle). Les poumons des souris *nude* ont été récupérés suite à l'expérience *in vivo* (tableau VII). Ces tissus ont été fixés, enrobés dans la paraffine et des coupes de 5 μ m ont été réalisées. B) Zone principalement constituée de cellules tumorales. C) Zone de nécrose. Grossissement de 100X (A) et de 200X (B et C).

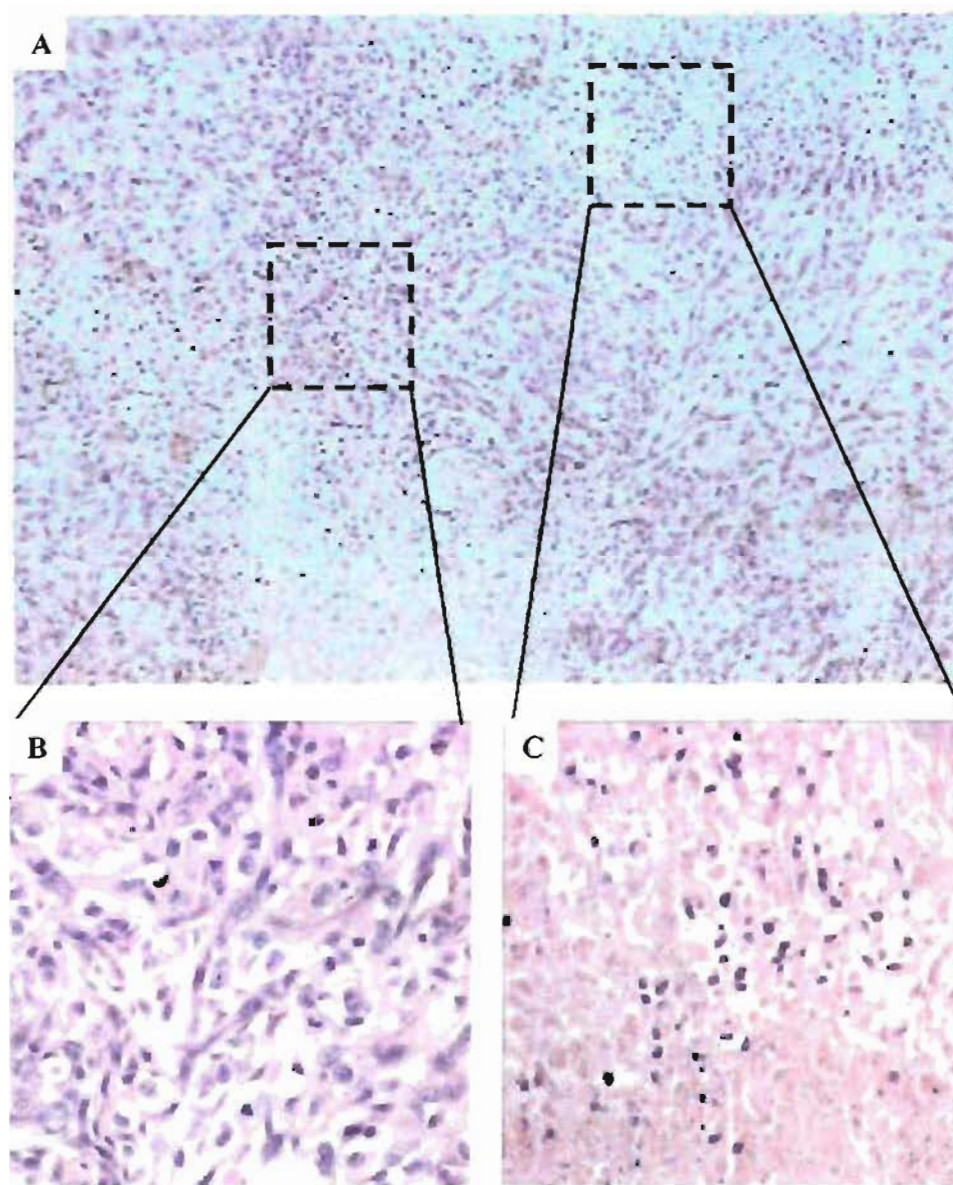


Figure 20 : Évaluation histologique (coloration éosine/hématoxyline) des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de BQ-123. Les poumons des souris *nude* ont été récupérés suite à l'expérience *in vivo* (tableau VII). Ces tissus ont été fixés, enrobés dans la paraffine et des coupes de 5 μ m ont été réalisées. B) Zone principalement constituée de cellules tumorales. C) Zone de nécrose. Grossissement de 100X (A) et de 200X (B et C).

4.7 Expression des protéines candidates : l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 et l'eitrine dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*

Étant donné que l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 et l'eitrine sont des protéines candidates en tant que marqueurs biologiques de l'ostéosarcome humain, l'expression de ces protéines a été évaluée dans les tumeurs induites *in vivo* chez les souris *nude*. Suite au sacrifice des souris, les tumeurs ont été prélevées et incluses en paraffine. Des coupes de tissus de 5 µm ont été montées sur des lames et des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur ces tissus.

L'expression de l'ET-1 a été détectée grâce à un anticorps polyclonal anti-ET-1. Les cellules exprimant cette protéine démontrent une expression cytoplasmique (figure 21). De façon plus précise, nous avons constaté que le pourcentage de cellules marquées est plus élevé dans les tumeurs développées chez les souris ayant reçu des injections de PBS (figure 21A, 21B), comparativement aux tumeurs des souris ayant reçu des injections de BQ-123 (figure 21C, 21D). En effet, la différence d'expression est de $88,27\% \pm 1,19\%$ (n=2) et de $52,33\% \pm 3,52\%$ (n=2) respectivement (tableau IX). Cette différence d'expression est également validée selon le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Des expériences d'immunohistochimie ont aussi été réalisées dans le but de mettre en évidence l'expression de l'ostéocrine. Cependant, aucune cellule semble exprimer cette protéine dans les tumeurs induites *in vivo* chez les souris *nude*, suite à l'injection de 1×10^7 cellules MNNG/HOS (figure 22).

L'expression de la PARP-1 a été détectée dans les tumeurs induites *in vivo*, toujours par la technique d'immunohistochimie. Grâce à un anticorps polyclonal anti-PARP-1, nous pouvons observer une différence dans le nombre de cellules exprimant cette protéine (figure 23). Ainsi, $43,93\% \pm 5,24\%$ (n=2) des cellules sont marquées dans les tumeurs de souris ayant reçu des injections de PBS, comparativement à $31,80\% \pm 3,21\%$ (n=2) de cellules marquées dans les tumeurs de souris ayant reçu des injections de BQ-123 (tableau IX). Le test de Mann-Whitney démontre que la différence d'expression de la PARP-1 selon le type d'injection est significatif ($p < 0,05$) (tableau IX).

L'expression de la dernière protéine candidate, l'eitrine a également été quantifiée suite à des expériences d'immunohistochimie (figure 24). Selon le test de Mann-

Whitney, la différence d'expression de cette protéine n'est pas significative, puisque $92,36\% \pm 8,42\%$ ($n=2$) des cellules sont marquées dans les tumeurs des souris ayant reçu des injections de PBS, comparativement à $91,04\% \pm 8,11\%$ ($n=2$) dans les tumeurs des souris ayant reçu des injections de BQ-123 (tableau IX)

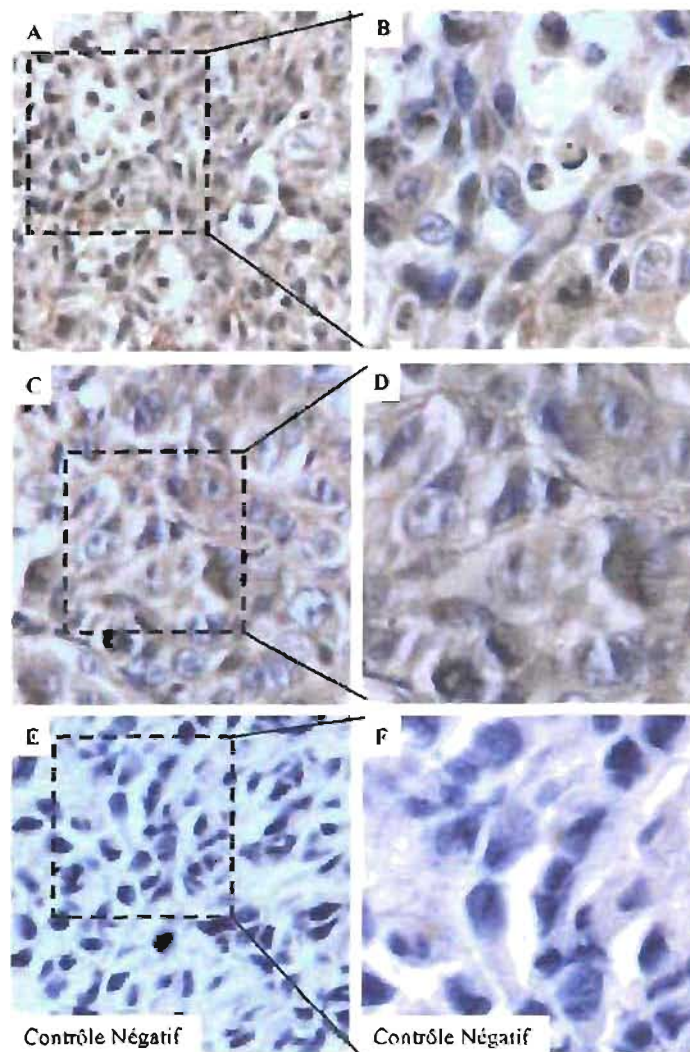


Figure 21 : Expression protéique de l'endothéline-1 (ET-1) dans des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*. Coupes représentatives de tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* marquées avec un anticorps polyclonal anti-endothéline-1 ($5 \mu\text{g/mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) a été utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ET-1 (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'expression de l'ET-1 est plus marquée dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (A, B) comparativement aux tumeurs des souris *nude* ayant reçu des injections de BQ-123 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

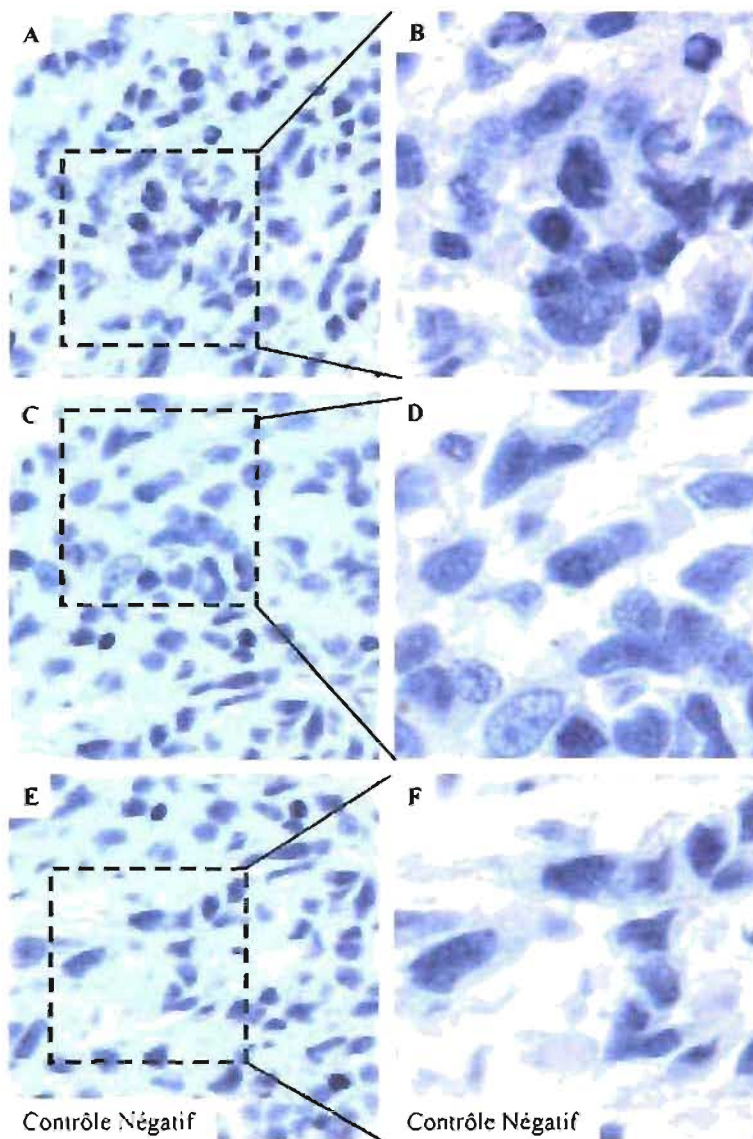


Figure 22: Expression protéique de l'ostéocrine dans des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*. Coupes représentatives de tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* marquées avec un anticorps monoclonal anti-ostéocrine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) a été utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ostéocrine (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'ostéocrine n'est pas détecté dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (A, B) ou des injections de BQ-123 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

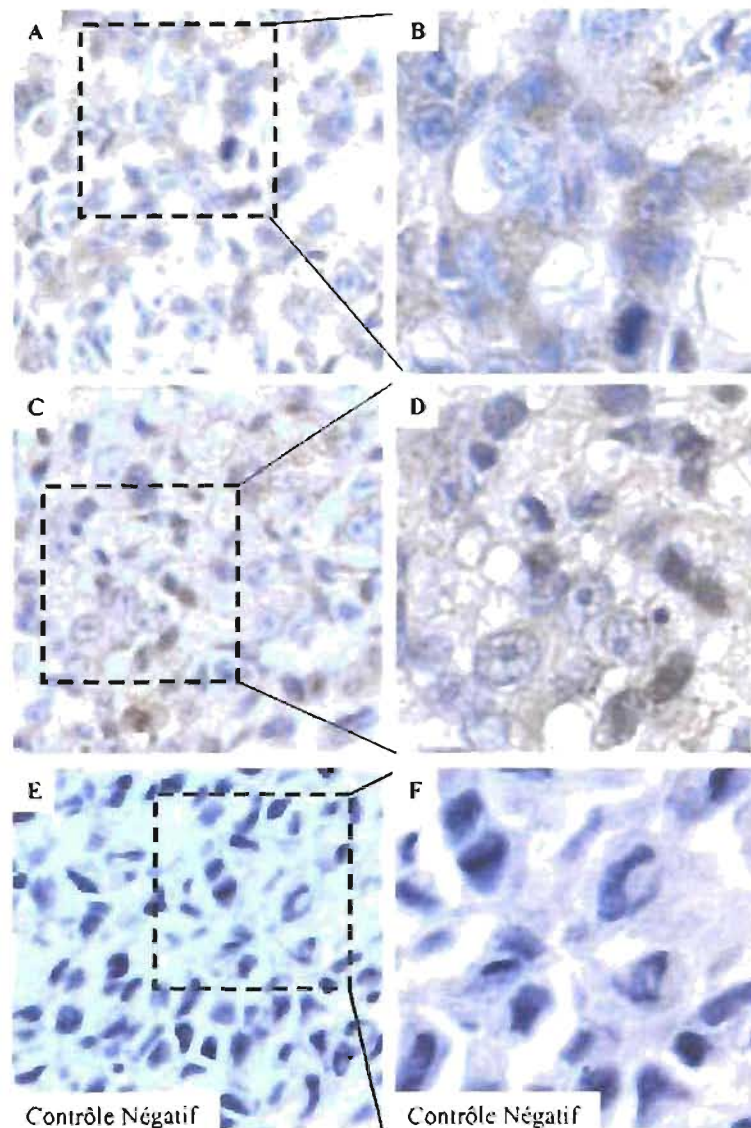


Figure 23 : Expression protéique de la PARP-1 dans des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*. Coupes représentatives de tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* marquées avec un anticorps polyclonal anti-PARP-1 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) a été utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de la PARP-1 (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'expression de la PARP-1 est plus marquée dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (A, B) comparativement aux tumeurs des souris *nude* ayant reçu des injections de BQ-123 (C, D). Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

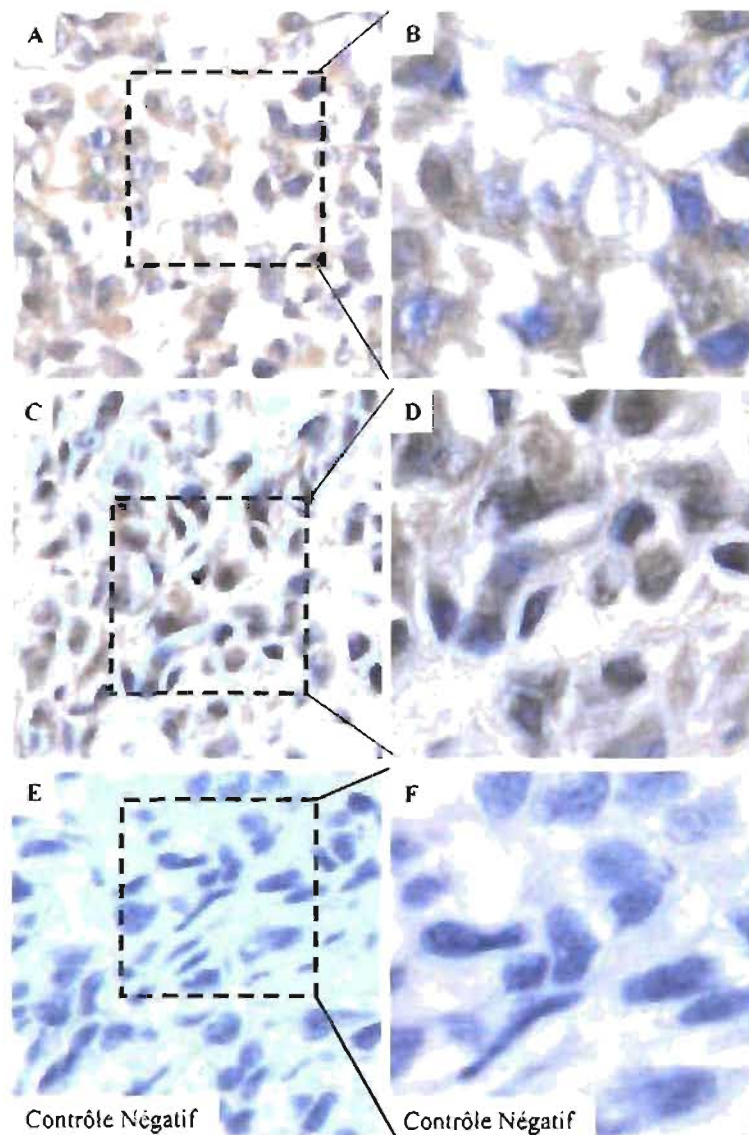


Figure 24 : Expression protéique de l'ezrine dans des tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude*. Coupes représentatives de tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* marquées avec un anticorps polyclonal anti-ezrine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le substrat DAB (diamino-3,3'benzidine) a été utilisé pour révéler le marquage cytoplasmique de l'ezrine (coloration brunâtre). Les lames ont été contre colorées avec l'hématoxyline Harris. L'ezrine est détectée dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* ayant reçu des injections de PBS (A, B) et des injections de BQ-123 (C, D). Il n'a pas de différence d'expression significative de l'ezrine entre ces tumeurs. Contrôle négatif (E, F). Grossissement 200X (A, C, E) et 400X (B, D, F).

Tableau IX : **Analyses statistiques de l'expression de l'ET-1, de l'ostéocrine, de la PARP-1 et de l'eitrine, suite a des immunohistochimies réalisées sur des coupes de tissus des tumeurs induites *in vivo* chez quatre souris *nude*.** Le test de Mann-Whitney a été réalisé sur les valeurs moyennes du pourcentage de cellules marquées dans les tumeurs de souris induites *in vivo* ayant reçu des injections de PBS (n=2) par rapport à ceux ayant reçu des injections de BQ-123 (n=2). ET-1 : Endothéline-1, Ostn : Ostéocrine, PARP-1 : poly (ADP-ribose) polymérase, N/D : non déterminé, N.S. : non significatif.

Protéine	Injections	% cellules marquées	P
		± écart-type	(test Mann-Whitney)
ET-1	PBS	88,27 ± 1,19	< 0,05
	BQ-123	52,33 ± 3,52	
Ostn	PBS	0,00 ± 0,00	---
	BQ-123	0,00 ± 0,00	
PARP-1	PBS	43,93 ± 5,24	< 0,05
	BQ-123	31,80 ± 3,21	
Ezrine	PBS	92,36 ± 8,42	> 0,05
	BQ-123	91,04 ± 8,11	

4.8 Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines

Tout au long de ce travail, nous avons collecté des biopsies ou des résections de tumeurs provenant de patients atteints d'une tumeur osseuse. Ces tumeurs ont été mises en culture pour en dériver les cellules et/ou incluses en paraffine à des fins histologiques. Les cellules mises en culture ont été dérivées dans le but de poursuivre la banque de cellules déjà mise en place dans le laboratoire du Dr Moldovan. Un marquage à la phosphatase alcaline a été réalisé sur les cellules dérivées dans le but de spécifier le phénotype des cellules. Une fois le phénotype confirmé, l'ARN ainsi que les protéines ont été extraites de ces cellules dans le but de faire différentes expériences ultérieurement. En ce qui concerne les tissus inclus en paraffine, plusieurs coupes de 5 µM ont été réalisées. Des colorations

histologiques à l'hématoxyline/éosine ont été réalisées pour chaque tumeur dans le but de déterminer les caractéristique histologique. Ci-joint un tableau décrivant les caractéristiques des tumeurs humaines (tableau X).

Tableau X : **Caractéristiques des tumeurs osseuses humaines.** N/A : non applicable, N/D : non disponible.

Numéro	Sexe	Diagnostic	Site primaire	Grade histologique
1	F	Ostéosarcome	Omoplate, scapulaire gauche	1/4
2	M	Ostéosarcome	Tibia droit (proximal)	1/4
3	M	Ostéosarcome	Fémur droit	1/4
4	F	Ostéosarcome	Os iliaque gauche	3/4
5	F	Ostéosarcome	Tibia droit (proximal)	3/4
6	M	Ostéosarcome	Tibia droit (distal)	3/4
7	F	Ostéosarcome	Tibia Proximal	4/4
8	M	Ostéosarcome	Masse poignet droit	4/4
9	M	Ostéosarcome	Fémur distal gauche	4/4
10	M	Ostéosarcome	Fémur droit	4/4
11	M	Ostéosarcome	Lésion tibia proximal gauche	N/D
12	F	Chondrosarcome	Humérus gauche	1/3
13	F	Chondrosarcome	Humérus proximal gauche	1/3
14	F	Chondrosarcome	Fémur gauche	1/3
15	F	Chondrosarcome	Lésion humérale gauche	1/3
16	M	Chondrosarcome	Vertèbre L1 gauche	1/3 à 2/3
17	F	Chondrosarcome	Vertèbre D9	1/3 à 2/3
18	M	Chondrosarcome	Fémur proximal droit	2/3
19	M	Chondrosarcome	7-8-9 côtes	2/3
20	F	Ostéochondrome	Fémur droit (distal antérieur)	N/A
21	F	Ostéochondrome	Fémur gauche (distal latéral)	N/A
22	M	Ostéochondrome	Humérus proximal droit	N/A
23	F	Ostéochondrome	Humérus droit (proximal)	N/A
24	M	Ostéochondrome	Fémur droit (distal)	N/A
25	M	Ostéochondrome	Fémur droit (distal)	N/A
26	M	Ostéochondrome	Fémur droit (distal)	N/A
27	M	Ostéochondrome	Fémur droit (distal)	N/A
28	M	Ostéochondrome	Humérus droit (proximal)	N/A

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

L'importance de ce projet de recherche réside dans le fait que nous avons mis en évidence l'expression de quatre molécules, soient l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 et l'ezrine dans l'ostéosarcome humain. Leurs profils d'expression pourraient éventuellement, et suite à d'autres études sur un nombre plus important de cas, être utilisés en tant que marqueurs biologiques corrélatifs avec le grade de la tumeur et en conséquence, avec la progression de l'ostéosarcome humain.

Le profil d'expression de ces marqueurs biologiques potentiels est en lien avec les différents grades de l'ostéosarcome, donc avec la progression de l'ostéosarcome humain. De plus, nous avons démontré *in vivo* le rôle important du récepteur ET_A de l'endothéline dans la progression tumorale chez la souris *nude*. Ce projet d'étude a été réalisé *in vitro* et *in vivo* avec des cellules dérivées d'ostéosarcomes humains ainsi qu'avec des lignées cellulaires commerciales.

5.1 Profil d'expression des protéines candidates dans l'ostéosarcome humain

5.1.1 L'endothéline-1 et ces récepteurs

L'endothéline-1 est un puissant vasoconstricteur, connue pour avoir un rôle important à jouer dans plusieurs étapes de la carcinogenèse. Étant donné son implication, tant au niveau de la prolifération cellulaire (Bagnato *et al.*, 2004), de la progression cellulaire (Chiao *et al.*, 2000), que lors de l'apoptose (Filippatos *et al.*, 2001) et de l'angiogenèse tumorale (Salani *et al.*, 2000a), nous avons étudié dans ce travail son profil d'expression selon le grade de l'ostéosarcome.

Nos résultats démontrent l'expression génique de l'ET-1 dans les deux lignées commerciales étudiées (MG-63, MNNG/HOS), en plus d'être exprimée dans toutes les cellules dérivées des ostéosarcomes humains (figure 2). Cependant, l'expression de l'ET-1 semble plus élevée dans les cellules MG-63 comparativement aux cellules MNNG/HOS, qui sont tumorigéniques. Ce résultat est en désaccord avec l'article de Wulfing et collaborateurs où l'on indique que l'ET-1 est plus exprimé dans les tumeurs de hauts grades du cancer du sein (Wulfing *et al.*, 2004). Cependant, cela

peut s'expliquer par le fait que l'analyse a été réalisée avec des lignées commerciales et non avec des cellules provenant d'un ostéosarcome. Au niveau des tissus tumoraux, l'ET-1 est également mise en évidence avec un nombre de cellules marquées plus élevé dans les tumeurs de grade 4/4, comparativement aux tumeurs de grade 1/4 (tableau VII). En ce qui concerne l'expression des récepteurs de ce peptide, nous observons une diminution de l'intensité de la bande, voire une disparition de la bande correspondant au récepteur ET_B dans les ostéosarcomes de grade 4/4 (figure 2).

Ces résultats abondent dans le même sens que plusieurs papiers, dont celui de Nambi et collaborateurs, qui a mis en évidence l'expression du gène de l'ET-1 dans une lignée cellulaire dérivée d'un ostéosarcome de rat (Nambi *et al.*, 1995). Ces résultats confirment aussi les données obtenues par l'équipe de Wulfing, qui a mis en évidence une surexpression de l'ET-1 ainsi qu'une diminution du récepteur ET_B dans des tumeurs de haut grade histologique de cancer du sein (Wulfing *et al.*, 2004). La perte du récepteur ET_B a également été documentée dans plusieurs types de cancer, dont le cancer de la prostate (Nelson *et al.*, 1997), le cancer de l'ovaire (Bagnato *et al.*, 1999) ainsi que dans une lignée cellulaire dérivée d'un mélanome humain (Kikuchi *et al.*, 1996). À ce jour, le mécanisme relié à la perte de ce récepteur dans les tumeurs de haut grade histologique n'est pas tout à fait élucidé. Étant donné que nous avons constaté une perte du récepteur ET_B dans les cellules dérivées des ostéosarcomes humains de haut grade, nous supposons que cette perte engendre des signaux inappropriés à la cellule. Ces signaux pourraient influencer la différenciation/dédifférenciation cellulaire, ce qui contribuerait au développement de cellules tumorales.

5.1.2 La PTHrP

La PTHrP (parathyroid-hormone-related peptide) est une hormone qui a également été étudiée lors de ce projet de recherche puisque de récentes études indiquent que ce peptide, ayant une homologie semblable à l'ET-1, peut lier le récepteur ET_A de l'ET-1 (Schluter *et al.*, 2001). L'expression du gène de la PTHrP a été mise en évidence dans les cellules dérivées des ostéosarcomes de grades 4/4 ainsi que dans les cellules dérivées d'un ostéosarcome de grade 3/4 (figure 2).

Étant donné que ce peptide peut se lier au récepteur ET_A de l'ET-1 et activer les mêmes voies de signalisation que l'ET-1, son expression élevée dans les hauts grades pourrait être due à la surexpression du récepteur ET_A dans l'ostéosarcome humain (Grant *et al.*, 2003). Ainsi, une augmentation du nombre de récepteurs ET_A corrèlerait avec une augmentation de son ligand naturel, l'endothéline, en plus d'un autre peptide pouvant se lier à ce récepteur, la PTHrP. De plus, certains vasoconstricteurs dont l'ET-1 et l'angiotensine II, induisent l'expression du gène de la PTHrP (Casey *et al.*, 1993; Largo *et al.*, 1999). Ceci indique qu'il pourrait exister une certaine boucle de régulation entre l'ET-1 et la PTHrP et que cette boucle de régulation pourrait avoir un rôle important dans le développement des métastases.

La forte expression de la PTHrP dans les ostéosarcomes de hauts grades pourrait être en relation avec la participation importante de cette hormone dans le développement des métastases osseuses (Hastings, 2004; Kakonen *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 2004). En effet, plusieurs études ont mis en évidence une expression élevée de ce peptide dans les métastases osseuses, suite à un cancer du sein (Kakonen *et al.*, 2003) ou du poumon (Hastings, 2004; Miki *et al.*, 2004). Très récemment, une étude établissant une corrélation entre l'expression de la PTHrP et de l'ezrine dans la carcinogénèse a été observée dans le cancer du poumon chez un modèle murin (Deng *et al.*, 2007).

5.1.3 L'ezrine

L'ezrine est impliquée dans la carcinogénèse, plus précisément dans la progression de l'ostéosarcome (Khanna *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Nos résultats ont permis de confirmer un lien entre son niveau d'expression et le grade de l'ostéosarcome. En fait, nos études sont en accord avec ceux obtenus par l'étude de Khanna et collaborateurs. En effet, ce groupe de recherche a démontré une relation entre l'expression élevée de l'ezrine et l'apparition de métastases chez des patients ayant le cancer, plus précisément chez une cohorte de patients pédiatriques ayant développé un ostéosarcome (Khanna *et al.*, 2004). Nous avons observé, tant au niveau du gène qu'au niveau de la protéine, une différence d'expression de l'ezrine selon le grade histologique de la tumeur (figures 12, 13, 14). Ainsi, il en résulte que plus le grade de la tumeur est élevé, plus l'expression de l'ezrine est forte. Bien que notre étude a été réalisée avec un petit nombre d'échantillons, les résultats obtenus appuient

l'étude de Khanna et collaborateurs et ce, dans une cohorte pédiatrique différente. Cette relation entre l'expression de l'eitrine et l'apparition des métastases peut être expliquée par plusieurs faits. Tout d'abord, l'eitrine est une protéine impliquée dans l'adhérence cellulaire ainsi que dans la survie cellulaire, deux processus très importants dans la progression de la tumeur ainsi que dans le développement des métastases (Bretscher et al., 2002; Takeuchi et al., 1994). Étant donné l'action biologique de cette protéine, il semble évident qu'un problème au niveau de la fonctionnalité ou encore au niveau de la signalisation de l'eitrine ait des répercussions très importantes pour la cellule. Ces répercussions peuvent être de nature mineure ou majeure et ainsi contribuer à la progression de la tumeur.

La position de l'eitrine dans la cellule, soit à l'interface entre le cytosquelette et la membrane, peut représenter un atout dans la progression de la tumeur (Bretscher, 1999). En effet, lorsque l'eitrine est activée, elle représente un lien physique entre le cytosquelette de la cellule et la membrane cellulaire, élément requis pour que les cellules métastatiques puissent s'engager dans leur microenvironnement et former des métastases (Khanna *et al.*, 2004). En fait, le mécanisme permettant aux cellules tumorales de métastaser vers un autre site implique plusieurs étapes séquentielles (Fidler, 2003). Tout d'abord, la cellule doit se détacher du site primaire du cancer et passer dans la circulation. Cette cellule doit survivre dans la circulation puis s'arrêter dans un nouvel organe. Une fois ces premières étapes réalisées, la cellule doit entrer dans le tissu par extravasation, déclencher son mécanisme de croissance, se multiplier et enclencher le processus d'angiogenèse pour permettre aux cellules tumorales de survivre. Ce mécanisme implique plusieurs signaux qui doivent être bien coordonnés pour assurer la survie et la prolifération des cellules tumorales (Fidler, 2003).

L'eitrine est d'ailleurs impliquée dans plusieurs voies de signalisation importante dont les voies de MAPK (MEK/ERK), Akt, Rho kinase (Bretscher *et al.*, 2002; Crepaldi *et al.*, 1997; Gautreau *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003). Ces voies de signalisation sont cruciales, entre autre, pour la dissémination des cellules tumorales. Plus particulièrement, la voie de MAPK est bien documentée à ce sujet (Reddy *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2001). En fait, cette importante voie de signalisation est impliquée dans la régulation du processus de dissémination des cellules tumorales

puisque la voie MAPK régularise les enzymes protéolytiques pouvant dégrader la membrane basale (Adeyinka *et al.*, 2002; Coutts *et al.*, 1998; Krueger *et al.*, 2001; McCawley *et al.*, 1999; Sivaraman *et al.*, 1997). La voie MAPK contribue au processus tumoral vu son implication dans la migration cellulaire (Hartmann *et al.*, 1994; Klemke *et al.*, 1997), en plus de protéger les cellules cancéreuses contre l'apoptose (Sarker *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 1995).

Étant donné son implication importante au niveau des voies de signalisation, un défaut dans une de ces nombreuses voies peut certainement engendrer des défauts au niveau de la cellule et ainsi contribuer à l'apparition des métastases.

5.1.4 L'ostéocrine

Notre étude est la première à démontrer un lien entre le grade de l'ostéosarcome humain et l'expression de l'ostéocrine. En effet, nous notons une expression très élevée de l'ostéocrine dans les ostéosarcomes de bas grade, tant au niveau génique qu'au niveau protéique (figure 5, 7). De plus, nous constatons que le tissu de la tumeur à cellules géantes est composé majoritairement de cellules qui expriment l'ostéocrine (figure 8). Ce résultat est surprenant puisqu'une étude indique que les ostéoclastes d'un tissu sain n'exprime pas ou très peu l'ostéocrine (Bord *et al.*, 2005). Ce résultat peut cependant être expliqué par le fait que les ostéoclastes constituant la tumeur à cellules géantes ont un phénotype modifié puisqu'on parle ici d'une tumeur.

Bien que le nombre de cas d'ostéosarcome étudiés soit petit, nous observons une nette différence au niveau du nombre de cellules exprimant l'ostéocrine entre les bas grades et les hauts grades d'ostéosarcomes. Ce résultat s'explique par le fait que l'ostéocrine est exprimé par les ostéoblastes et non par les cellules dédifférenciées (Bord *et al.*, 2005), cellules qui composent principalement les ostéosarcomes de hauts grades (Unni *et al.*, 1984).

Selon la littérature, l'ostéocrine est faiblement exprimé dans les ostéoblastes normaux différenciés (Bord *et al.*, 2005). Les résultats de notre laboratoire sont quelques peu différents, puisque le pourcentage de cellules marquées pour les

tumeurs de grade 1/4 est très élevé (tableau VII). Cette différence peut-être expliquée par le fait que les ostéoblastes différenciés qui composent la tumeur sont nouvellement différenciés et incorporés à la matrice osseuse. En effet, un ostéosarcome est une tumeur caractérisée par la présence de substance ostéoïde ainsi qu'une prolifération excessive d'ostéoblastes (Dahlin *et al.*, 1967; Longhi *et al.*, 2006). Ainsi, les ostéoblastes sont nouvellement différenciés, ce qui peut expliquer en partie la raison pour laquelle nous retrouvons autant de cellules exprimant l'ostéocrine dans les ostéosarcomes de grade 1/4 comparativement au contrôle.

En ce qui concerne le processus de différenciation et l'expression de l'ostéocrine par les ostéoblastes, nos travaux abondent dans le même sens que ceux de Bord et collaborateurs. Leur étude fait état d'un lien existant entre le niveau d'expression de l'ostéocrine et la différenciation cellulaire (Bord *et al.*, 2005). Dans ce sens, notre étude établit le même parallèle puisque l'expression de l'ostéocrine est diminuée dans les ostéosarcomes de haut grade, qui sont composés de peu de cellules différenciées, soient de moins de 25% (Unni *et al.*, 1984).

5.1.5 La PARP-1

La poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) est une autre protéine candidate qui peut prédire la progression de l'ostéosarcome humain. Bien que le nombre de tissu étudié soit limité, nous constatons que son expression varie selon le grade de l'ostéosarcome, tant au niveau génique qu'au niveau protéique (figure 9, 10, 11). De ce fait, une plus forte expression de la PARP-1 est détectée dans les tumeurs osseuses de haut grade (tableau VII).

Le profil d'expression de la PARP-1 mis en évidence dans cette présente étude est en accord avec la littérature. En fait, l'activité élevée de la PARP-1 a été étudiée dans d'autres cancers, dont le cancer colorectal, le lymphome malin ainsi que dans les tumeurs de l'épithélium (Kleczkowska *et al.*, 2002). De plus, il est bien documenté que l'évolution tumorale ainsi que la prolifération rapide des cellules cancéreuses sont liées avec des niveaux élevés de la PARP-1 (Alderson, 1990; Tomoda *et al.*, 1991). L'expression de la PARP-1 dans notre cohorte de patients pédiatriques est donc en accord avec diverses études de la littérature. De plus, il est important de

mentionner que lors de cette étude, il semble y avoir une différence dans la localisation de la PARP-1 et le grade de l'ostéosarcome humain. Et effet, le marquage de la PARP-1 suite aux expériences d'immunohistochimie semble nucléaire dans les ostéosarcomes de grade 1/4, comparativement à un marquage plutôt cytoplasmique pour les ostéosarcomes de grade 4/4. Cette différence de localisation pourrait être dû au fait que le PARP-1 exerce une activité génomique différente selon le grade de la tumeur (D'Amours *et al.*, 1999; Smith, 2001).

Shiobara et collaborateurs ont noté qu'il existe une corrélation négative entre l'activité de la PARP-1 et le degré de différenciation des cellules, c'est-à-dire que les tumeurs de hauts grades présentent une activité de la PARP-1 plus élevée que les tumeurs de faibles grades qui sont principalement composées de cellules différenciées (Shiobara *et al.*, 2001). Cette étude a été réalisée chez des patients ayant un carcinome hépatocellulaire.

Il est bien de noter que la réaction de poly(ADP-ribosyl)ation participe dans l'induction de la transcription du proto-oncogène *c-fos* (Cerutti *et al.*, 1991). Ce proto-oncogène est d'ailleurs surexprimé dans différentes tumeurs malignes, dont l'ostéosarcome (Ladanyi *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1990). Ainsi, la forte expression de la PARP-1 mise en évidence dans notre étude de patients pédiatriques atteints d'un ostéosarcome de haut grade peut expliquer la surexpression de *c-fos* dans l'ostéosarcome. Par contre, ceci nécessite d'autres études pour confirmer cette hypothèse. Ces résultats indiquent donc que les différents inhibiteurs de la PARP-1 pourraient être utiles chez les patients atteints par ce type de tumeur puisque souvent, les patients ayant développé ce type de tumeur osseuse très agressive, développent une résistance face aux traitements de chimiothérapies conventionnels (Marina *et al.*, 2004).

5.2 Effet du BQ-123, sur une tumeur induite *in vivo* chez la souris *nude*

5.2.1 Effet du BQ-123 sur le développement d'une tumeur induite *in vivo*

Lors des études réalisées au niveau du gène du système de l'endothéline, nous avons constaté que le récepteur ET_A était exprimé dans tous les échantillons d'ostéosarcome et qu'il y avait une perte du récepteur ET_B (figure 2). Ces résultats nous mènent à supposer que l'effet de l'ET-1 est contrôlé principalement via le récepteur ET_A. En effet, les résultats d'invasion cellulaire réalisée *in vitro* dans notre laboratoire abondent dans le même sens (Felx *et al.*, 2006). De plus, le système de l'endothéline est fortement impliqué dans le processus de la carcinogenèse (Bagnato *et al.*, 1999; Filippatos *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 1995), plus particulièrement au niveau de l'invasion cellulaire (Chiao *et al.*, 2000; Rosano *et al.*, 2001; Salani *et al.*, 2000a). Dans ce sens, nos résultats nous indiquent que l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur ET_A serait une voie importante en tant que stratégie thérapeutique dans le contrôle de l'invasion tumorale de l'ostéosarcome. Selon de récentes études, une nouvelle approche pour le traitement de certains cancers, plus spécifiquement le cancer de la prostate, se baserait sur ce constat (Morris *et al.*, 2005; Petrylak, 2007; Thakkar *et al.*, 2006).

Asham et collaborateurs ont d'ailleurs démontré en 2001 qu'une tumeur colorectale avait diminué de taille suite à l'injection d'un antagoniste du récepteur ET_A, le BQ-123 (Asham *et al.*, 2001). Les résultats de notre étude *in vivo* vont dans le même sens, puisque les souris *nude* ayant reçu des injections de BQ-123 ont développé une tumeur de plus petite taille, comparativement aux souris contrôle (tableau VIII). Bien que préliminaires, puisque seulement deux souris par groupe ont fait parti de cette étude, ces résultats supposent que le récepteur ET_A de l'endothéline jouerait un rôle essentiel dans la croissance cellulaire et l'invasion de l'ostéosarcome tout comme dans le cancer de la prostate (Asham *et al.*, 2001).

Nous avons également vérifié si la progression des métastases pulmonaires pouvait être diminué, voir enrayé par les injections de BQ-123. Les résultats obtenus lors de l'expérience *in vivo* ne nous permettent pas de conclure sur ce sujet. En effet, aucune

cellule tumorale n'a pu être détecté lors des colorations histologiques réalisées sur les coupes de poumons prélevés lors des sacrifices des souris *nude* (figure 17, 18). De plus, nous n'avons détecté aucune cellule tumorale chez les souris contrôle, ce qui suggère que le protocole devrait être modifié, principalement au niveau de la durée des injections de l'antagoniste du récepteur ET_A. En effet, les injections de BQ-123 ont été réalisées sur une période de quatre semaines, ce qui peut être insuffisant pour permettre aux cellules tumorales de métastaser jusqu'aux poumons. Une étude indique d'ailleurs que suite à une injection de cellules MNNG/HOS chez la souris *nude*, un minimum de huit semaines a dû être nécessaire pour détecter quelques rares métastases pulmonaires (Luu *et al.*, 2005).

5.2.2 Effet du BQ-123 sur l'expression des potentiels marqueurs de la progression tumorale

L'antagoniste du récepteur ET_A de l'ET-1, le BQ-123, semble avoir un effet sur l'expression de l'ET-1 et de la PARP-1 dans les tumeurs induite *in vivo* chez la souris *nude* (tableau IX). Le récepteur ET_A contribue à la progression de la tumeur en induisant la prolifération, la survie, l'invasion cellulaire ainsi que l'angiogenèse tumorale (Bagnato *et al.*, 1999). Étant donné que le BQ-123 bloque le récepteur ET_A de l'ET-1, son expression est par conséquent diminuée et la taille de la tumeur est également réduite. L'expression de la PARP-1 est elle aussi diminuée dans les tumeurs induites *in vivo*, suite aux injections de BQ-123 (tableau IX). En fait, l'endothéline est impliquée dans plusieurs processus de la carcinogenèse, processus qui cause des dommages à l'ADN (Bagnato *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2003; Rosano *et al.*, 2001; Salani *et al.*, 2000b). Étant donné que la PARP-1 est activée lorsqu'il y a des dommages à l'ADN (Dantzer *et al.*, 1999), il est normal de constater une diminution d'expression de la PARP-1 lorsque l'expression de l'ET-1 est également diminuée.

En ce qui concerne l'expression de l'ostéocrine, la protéine n'est nullement exprimée dans les tumeurs induites *in vivo* chez la souris *nude* (figure 22). Cela peut être expliqué par le fait que le type de cellule injectée, soit les MNNG/HOS, est une lignée cellulaire tumorigénique (Luu *et al.*, 2005; Rhim *et al.*, 1977). Ce type cellulaire est donc très agressif et il s'apparente à des ostéoblastes dérivés d'un

ostéosarcome de haut grade (Rhim *et al.*, 1977). Selon deux études, ce sont principalement les ostéoblastes normaux qui expriment l'ostéocrine (Bord *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2003), ce qui peut expliquer le fait que cette protéine ne soit pas détecté dans ces tissus (figure 22). De plus, les résultats obtenus suite à l'expérience *in vivo* concordent également avec ceux obtenus lors d'étude *ex vivo*, sur des tissus d'ostéosarcome humains de haut grade où l'ostéocrine a été détecté, mais à un niveau d'expression très bas (figure 7). Selon ces évidences, il semble logique que l'expression de l'ostéocrine soit nul dans les tumeurs induites *in vivo*, suite à l'injection de cellules humaine MNNG/HOS, cellules ayant un potentiel tumorigénique (Luu *et al.*, 2005; Rhim *et al.*, 1977).

L'expression de l'ezrine est autant élevée dans les tumeurs de souris ayant reçu ou non des injections de BQ-123 (figure 24). Bien que cette protéine a déjà été proposée comme étant un marqueur de la progression des métastases (Khanna *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004), les souris de notre étude n'ont pas développé de métastase. Une forte expression a d'ailleurs été mise en évidence dans une cohorte de jeunes patients atteints d'un ostéosarcome de haut grade histologique (Khanna *et al.*, 2004). Étant donné que la lignée cellulaire MNNG/HOS est tumorigénique, et que ce type de cellule est agressif (Luu *et al.*, 2005; Rhim *et al.*, 1977), il est normal de noter un niveau élevé de l'ezrine dans les tumeurs de souris ayant reçues des injections de BQ-123, puisqu'à la base, ce sont des cellules dérivées d'un ostéosarcome de haut grade.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons mis en évidence le profil d'expression de quatre molécules importantes dans la carcinogenèse, soient l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 ainsi que l'ezrine dans l'ostéosarcome humain. Bien que l'étude ait été réalisée avec un nombre limité d'échantillons, le profil d'expression de ces molécules pourrait être en relation avec le grade histologique de l'ostéosarcome, autant au niveau génique qu'au niveau protéique.

Ainsi, notre étude a démontré pour la première fois un lien entre l'expression de l'ostéocrine et le grade de l'ostéosarcome humain. Selon les résultats obtenus dans notre laboratoire, une expression élevée de l'ostéocrine pourrait être liée à un bon pronostic pour le patient atteint d'un ostéosarcome. En fait, l'expression de cette protéine fortement présente dans les os normaux (Bord *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2003) pourrait apporter un effet protecteur aux ostéoblastes composant la tumeur osseuse. Dans le but de valider cette hypothèse, nous pourrions surexprimer l'ostéocrine dans une lignée cellulaire, comme les MNNG/HOS et les implanter chez la souris *nude*. En comparant avec des souris contrôle nous pourrions évaluer si la surexpression de l'ostéocrine semble changer/ralentir le développement de la tumeur. La présente étude a également permis de confirmer le lien entre l'expression de l'ezrine et l'apparition des métastases dans les cas d'ostéosarcomes pédiatriques. En effet, l'expression élevée de l'ezrine a été mise en évidence chez les patients ayant développé un ostéosarcome de grade 4/4 et chez qui l'apparition des métastases est positive. Ce lien avait déjà été mis en évidence par le groupe de recherche de Khanna et collaborateurs (Khanna *et al.*, 2004). De plus, la forte expression du gène de la PTHrP dans les hauts grades d'ostéosarcome est également en lien avec les diverses données de la littérature (Brandt *et al.*, 1991; Southby *et al.*, 1990). Cette observation, soit une expression élevée reliée aux ostéosarcomes de haut grade a également été remarquée pour la PARP-1. Les expériences réalisées sur des tissus humains d'ostéosarcomes ont également permis d'établir un lien entre l'expression de l'ET-1 et le grade des tumeurs osseuses. En fait, l'ET-1 (Bagnato *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 1995) ainsi que son récepteur ET_A sont davantage exprimés dans les ostéosarcomes de haut grade. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus précédemment dans notre laboratoire (Felx *et al.*, 2006), nous ont conduit à valider notre hypothèse à l'aide d'un modèle *in vivo*.

Par ailleurs, l'expérience *in vivo* a permis de mettre en évidence l'importance du récepteur ET_A dans le développement d'une tumeur induite chez la souris *nude*. Cependant, cette étude n'a pas permis de valider le rôle de ce récepteur dans l'apparition des métastases, puisque aucune métastase n'a été détectée lors des analyses histologiques réalisées sur les coupes de poumons. Dans ce sens, l'expérience *in vivo* devrait être réalisée avec une lignée cellulaire plus tumorigénique que les MNNG/HOS. Luu et collaborateurs ont réalisé une étude *in vivo* permettant d'établir le pouvoir tumorigénique et métastatique de trois lignées cellulaires (Luu *et al.*, 2005). Dans cette étude, on retrouve la lignée cellulaire utilisée lors de notre étude *in vivo*, la lignée MNNG/HOS ainsi que la lignée TE85 et la 143B (Hensler *et al.*, 1994; Rhim *et al.*, 1977). Parmi ces lignées cellulaires, la lignée 143B a démontré le plus grand pouvoir de dissémination des cellules tumorales, chez la souris *nude*. Ainsi, pour obtenir des résultats plus concluants, l'étude *in vivo* devrait être réalisée à l'aide de cette lignée cellulaire, puisque l'apparition des métastases a été constatée dès la 4^e semaine, et de façon plus marquée à partir de la 6^e semaine (Luu *et al.*, 2005). Cette même étude pourrait être réalisée avec les cellules dérivées des ostéosarcomes humains de différents grades histologiques, recueillies lors de ce projet de maîtrise. De plus, durant ce projet d'étude, notre laboratoire a récupéré, en plus des biopsies d'ostéosarcomes, d'autres tumeurs osseuses. En effet, nous avons collecté des ostéochondromes ainsi que des chondrosarcomes. Étant donné que les cellules dérivées de ces tumeurs osseuses ont un pouvoir d'invasion différent des cellules dérivées des ostéosarcomes, il serait également intéressant d'étudier *in vivo* le rôle du récepteur ET_A de l'ET-1 dans ces cellules. Puisque l'angiogenèse est un mécanisme crucial dans le développement d'une tumeur, il serait également intéressant d'étudier cet aspect lors des expériences *in vivo* (Grant *et al.*, 2003). L'expérience *in vivo* contribuera aussi à valider le modèle animal établi par Luu et collaborateur (Luu *et al.*, 2005). Une fois validé, ce modèle contribuera à mieux comprendre les aspects de la carcinogenèse allant du développement du cancer, de sa progression jusqu'à l'apparition des métastases.

Pour terminer, la mise en évidence du profil d'expression de ces quatre molécules, soit l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 ainsi que l'ezrine, pourrait contribuer à fournir des informations plus précises en ce qui concerne l'évolution de la tumeur chez les patients atteints d'un ostéosarcome. Étant donné le faible échantillonnage de cette

étude, il serait également important de valider les résultats obtenus lors de cette étude chez un plus grand nombre de patients.

Cette étude ouvre également la porte à plusieurs autres questionnements sur le développement de l'ostéosarcome humain. Étant donné que ces quatre molécules sont impliquées dans le développement de l'ostéosarcome humain, il reste à déterminer à quelles étapes et selon quels mécanismes ces molécules participent à la carcinogenèse de l'ostéosarcome humain (Tentori *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004). En effet, étant donné le rôle important joué par la PARP-1 dans l'apoptose, des études *in vivo* testant l'effet d'un inhibiteur de cette molécule, comme le nicotinamide (Nguewa *et al.*, 2005), permettrait de combiner cet inhibiteur aux traitements de chimiothérapie actuels dans le but d'augmenter leurs effets (Ha *et al.*, 2000). Il serait également intéressant d'étudier le mécanisme de désactivation de l'ezrine, puisque la localisation de cette protéine joue sûrement un rôle clé dans la propagation des cellules tumorales vers un autre site (Bretscher, 1999). De plus, la calpaïne, connue pour dégrader donc inactiver l'ezrine pourrait être considérée dans le cas où l'inactivation de l'ezrine dans les cellules cancéreuses s'avère une cible potentielle dans les traitements de l'ostéosarcome (Shuster *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1993). Quant à l'ostéocrine, il serait également intéressant de surexprimer cette protéine et d'étudier son rôle dans l'invasion cellulaire.

Il serait également intéressant d'étudier les relations possibles entre différents paramètres cliniques et l'expression des quatre molécules, soit l'ET-1, l'ostéocrine, la PARP-1 ainsi que l'ezrine. En effet, des études sur la relation entre l'expression de l'ezrine et l'apparition des métastases, entre l'expression de l'ostéocrine et la survie globale du patient ainsi qu'entre l'expression de la PARP-1 et de l'ET-1 et la réponse à la chimiothérapie pourraient être réalisées. Ces possibles relations permettraient encore une fois de mieux comprendre la carcinogenèse de l'ostéosarcome.

Tous ces éléments réunis permettront d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme tumoral contrôlant l'apparition et le développement de l'ostéosarcome. Ainsi, il sera plus facile d'élaborer de nouveaux traitements ainsi que de nouveaux

médicaments dans le but d'augmenter le taux de survie des patients atteints d'une tumeur osseuse.

RÉFÉRENCES

- Aboulafia, AJ, Brooks, F, Piratzky, J, Weiss, S (1999). Osteosarcoma arising from heterotopic ossification after an electrical burn. A case report. *J Bone Joint Surg Am* **81**: 564-70.
- Adachi, M, Hashido, K, Trzeciak, A, Watanabe, T, Furuichi, Y, Miyamoto, C (1993). Functional domains of human endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 8**: S121-4.
- Alanen, K, Deng, DX, Chakrabarti, S (2000). Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology* **36**: 161-7.
- Ame, JC, Spenlehauer, C, de Murcia, G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-93.
- American Cancer Society (2007). Cancer Facts & Figures 2007. Society American Cancer p56.
- Arndt, CA, Crist, WM (1999). Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med* **341**: 342-52.
- Asham, E, 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 ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer* **85**: 1759-63.
- Avella, M, Bacci, G, McDonald, DJ, Di Scioscio, M, Picci, P, Campanacci, M (1988). Adjuvant chemotherapy with six drugs (adriamycin, methotrexate, cisplatin, bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin) for non-metastatic high grade osteosarcoma of the extremities. Results of 32 patients and comparison to 127 patients concomitantly treated with the same drugs in a neoadjuvant form. *Chemioterapia* **7**: 133-7.

Bacci, G, Ferrari, S, Bertoni, F, Ruggieri, P, Picci, P, Longhi, A, Casadei, R, Fabbri, N, Forni, C, Versari, M, Campanacci, M (2000). Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* **18**: 4016-27.

Bacci, G, Ferrari, S, Longhi, A, Picci, P, Mercuri, M, Alvegard, TA, Saeter, G, Donati, D, Manfrini, M, Lari, S, Briccoli, A, Forni, C (2002). High dose ifosfamide in combination with high dose methotrexate, adriamycin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of extremity osteosarcoma: preliminary results of an Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group pilot study. *J Chemother* **14**: 198-206.

Bacci, G, Ferrari, S, Mercuri, M, Bertoni, F, Picci, P, Manfrini, M, Gasbarrini, A, Forni, C, Cesari, M, Campanacci, M (1998). Predictive factors for local recurrence in osteosarcoma: 540 patients with extremity tumors followed for minimum 2.5 years after neoadjuvant chemotherapy. *Acta Orthop Scand* **69**: 230-6.

Bacci, G, Longhi, A, Bertoni, F, Bacchini, P, Ruggieri, P, Versari, M, Picci, P (2005). Primary high-grade osteosarcoma: comparison between preadolescent and older patients. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**: 129-34.

Bacci, G, Picci, P, Ruggieri, P, Mercuri, M, Avella, M, Capanna, R, Brach Del Prever, A, Mancini, A, Gherlinzoni, F, Padovani, G, et al. (1990). Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma of the extremities. The Istituto Rizzoli Experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intraarterial cisplatin. *Cancer* **65**: 2539-53.

Bagnato, A, Cirilli, A, Salani, D, Simeone, P, Muller, A, Nicotra, MR, Natali, PG, Venuti, A (2002). Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res* **62**: 6381-4.

Bagnato, A, Natali, PG (2004). Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* **2**: 16.

Bagnato, A, Rosano, L, Di Castro, V, Albini, A, Salani, D, Varmi, M, Nicotra, MR, Natali, PG (2001). Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol* **158**: 841-7.

Bagnato, A, Salani, D, Di Castro, V, 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 tumor growth. *Cancer Res* **59**: 720-7.

Barnes, DW, Carr, TE, Evans, EP, Loutit, JF (1970). ⁹⁰Sr-induced osteosarcomas in radiation chimaeras. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **18**: 531-7.

Battistini, B, D'Orleans-Juste, P, Sirois, P (1993). Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* **68**: 600-28.

Berlin, O, Samid, D, Donthineni-Rao, R, Akeson, W, Amiel, D, Woods, VL, Jr. (1993). Development of a novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma transplanted orthotopically into bone of athymic mice. *Cancer Res* **53**: 4890-5.

Berry, P, Burchill, S (2002). Endothelins may modulate invasion and proliferation of Ewing's sarcoma and neuroblastoma. *Clin Sci (Lond)* **103 Suppl 48**: 322S-326S.

Berryman, M, Franck, Z, Bretscher, A (1993). Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* **105 (Pt 4)**: 1025-43.

Bielack, SS, Kempf-Bielack, B, Delling, G, Exner, GU, Flege, S, Helmke, K, Kotz, R, Salzer-Kuntschik, M, Werner, M, Winkelmann, W, Zoubek, A, Jurgens, H, Winkler, K (2002). Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* **20**: 776-90.

Bieling, P, Rehan, N, Winkler, P, Helmke, K, Maas, R, Fuchs, N, Bielack, S, Heise, U, Jurgens, H, Treuner, J, Romanowski, R, Exner, U, Kotz, R, Winkler, K (1996). Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol* **14**: 848-58.

Blais, V, Fugere, M, Denault, JB, Klarskov, K, Day, R, Leduc, R (2002). Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett* **524**: 43-8.

Bonfoco, E, Krainc, D, Ankarcona, M, Nicotera, P, Lipton, SA (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7162-6.

Bord, S, Beavan, S, Ireland, D, Horner, A, Compston, JE (2001). Mechanisms by which high-dose estrogen therapy produces anabolic skeletal effects in postmenopausal women: role of locally produced growth factors. *Bone* **29**: 216-22.

Bord, S, Ireland, DC, Moffatt, P, Thomas, GP, Compston, JE (2005). Characterization of osteocrin expression in human bone. *J Histochem Cytochem* **53**: 1181-7.

Boulanger, CM, Tanner, FC, Bea, ML, Hahn, AW, Werner, A, Luscher, TF (1992). Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* **70**: 1191-7.

Bramwell, VH, Burgers, M, Sneath, R, Souhami, R, van Oosterom, AT, Voute, PA, Rouesse, J, Spooner, D, Craft, AW, Somers, R, et al. (1992). A comparison of two short intensive adjuvant chemotherapy regimens in operable osteosarcoma of limbs in children and young adults: the first study of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Clin Oncol* **10**: 1579-91.

Brandt, DW, Burton, DW, Gazdar, AF, Oie, HE, Deftos, LJ (1991). All major lung cancer cell types produce parathyroid hormone-like protein: heterogeneity assessed by high performance liquid chromatography. *Endocrinology* **129**: 2466-70.

Bretscher, A (1983). Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol* **97**: 425-32.

Bretscher, A (1999). Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 109-16.

Bretscher, A, Edwards, K, Fehon, RG (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 586-99.

Bretscher, A, Reczek, D, Berryman, M (1997). Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci* **110 (Pt 24)**: 3011-8.

Broders, AC, Hargrave, R, Meyerding, HW (1939). Pathological features of soft tissue fibrosarcoma with special reference to the grading of its malignancy. *Surg Gynecol Obstet* **69**: 267-280.

Burtis, WJ (1992). Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement. *Clin Chem* **38**: 2171-83.

Campanacci, M, Bacci, G, Bertoni, F, Picci, P, Minuttillo, A, Franceschi, C (1981). The treatment of osteosarcoma of the extremities: twenty year's experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *Cancer* **48**: 1569-81.

Canadian Cancer Society, SC, Provincial/Territorial Cancer Registries, Public Health Agency of Canada (2007). Canadian Cancer Statistic 2007. Statistique Canada. p 116.

Carducci, MA, Padley, RJ, Breul, J, Vogelzang, NJ, Zonnenberg, BA, Daliani, DD, Schulman, CC, Nabulsi, AA, Humerickhouse, RA, Weinberg, MA, Schmitt, JL, Nelson, JB (2003). Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* **21**: 679-89.

Casey, ML, Mibe, M, MacDonald, PC (1993). Regulation of parathyroid hormone-related protein gene expression in human endometrial stromal cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* **77**: 188-94.

Cazaubon, S, Deshayes, F, Couraud, PO, Nahmias, C (2006). [Endothelin-1, angiotensin II and cancer]. *Med Sci (Paris)* **22**: 416-22.

Cerutti, PA, Trump, BF (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* **3**: 1-7.

Chambon, P, Weill, JD, Mandel, P (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 39-43.

Chatterjee, S, Berger, SJ, Berger, NA (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. *Mol Cell Biochem* **193**: 23-30.

Chiao, JW, Moonga, BS, Yang, YM, Kancharla, R, Mittelman, A, Wu-Wong, JR, Ahmed, T (2000). Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer* **83**: 360-5.

Cobb, LM (1970). Radiation-induced osteosarcoma in the rat as a model for osteosarcoma in man. *Br J Cancer* **24**: 294-9.

Crepaldi, T, Gautreau, A, Comoglio, PM, Louvard, D, Arpin, M (1997). Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol* **138**: 423-34.

Cruz, A, Parnot, C, Ribatti, D, Corvol, P, Gasc, JM (2001). Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Vasc Res* **38**: 536-45.

d'Adda di Fagagna, F, Hande, MP, Tong, WM, Lansdorp, PM, Wang, ZQ, Jackson, SP (1999). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* **23**: 76-80.

D'Amours, D, Desnoyers, S, D'Silva, I, Poirier, GG (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342** (Pt 2): 249-68.

D'Orleans-Juste, P, Plante, M, Honore, JC, Carrier, E, Labonte, J (2003). Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* **81**: 503-10.

Dahlin, DC, Coventry, MB (1967). Osteogenic sarcoma. A study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* **49**: 101-10.

Dantzer, F, Schreiber, V, Niedergang, C, Trucco, C, Flatter, E, De La Rubia, G, Oliver, J, Rolli, V, Menissier-de Murcia, J, de Murcia, G (1999). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* **81**: 69-75.

Day, TF, Guo, X, Garrett-Beal, L, Yang, Y (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* **8**: 739-50.

de Murcia, G, Menissier de Murcia, J (1994). Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 172-6.

Deng, X, Tannehill-Gregg, SH, Nadella, MV, He, G, Levine, A, Cao, Y, Rosol, TJ (2007). Parathyroid hormone-related protein and ezrin are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* **24**: 107-19.

Doroshov, JH (1991). Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N Engl J Med* **324**: 843-5.

Dutra, FR, Largent, EJ (1950). Osteosarcoma induced by beryllium oxide. *Am J Pathol* **26**: 197-209.

Eckman, EA, Reed, DK, Eckman, CB (2001). Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* **276**: 24540-8.

Egidy, G, Juillerat-Jeanneret, L, Korth, P, Bosman, FT, Pinet, F (2000). The endothelin system in normal human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G211-22.

Eilber, F, Giuliano, A, Eckardt, J, Patterson, K, Moseley, S, Goodnight, J (1987). Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a randomized prospective trial. *J Clin Oncol* **5**: 21-6.

Enneking, WF (1979). Advances and treatment of primary bone tumors. *J Fla Med Assoc* **66**: 28-30.

Enneking, WF, Spanier, SS, Goodman, MA (1980). A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 106-20.

Fellenberg, J, Krauthoff, A, Pollandt, K, Delling, G, Parsch, D (2004). Evaluation of the predictive value of Her-2/neu gene expression on osteosarcoma therapy in laser-microdissected paraffin-embedded tissue. *Lab Invest* **84**: 113-21.

Felx, M, Guyot, MC, Isler, M, Turcotte, RE, Doyon, J, Khatib, AM, Leclerc, S, Moreau, A, Moldovan, F (2006). Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin Sci (Lond)* **110**: 645-54.

Fernandez-Patron, C, Radomski, MW, Davidge, ST (1999). Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* **85**: 906-11.

Ferrari, S, Bertoni, F, Mercuri, M, Picci, P, Giacomini, S, Longhi, A, Bacci, G (2001). Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann Oncol* **12**: 1145-50.

Ferrari, S, Palmerini, E (2007). Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. *Curr Opin Oncol* **19**: 341-6.

Fidler, IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-8.

Filippatos, GS, Gangopadhyay, N, Lalude, O, Parameswaran, N, Said, SI, Spielman, W, Uhal, BD (2001). Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L749-61.

Fitzgerald, RH, Jr., Dahlin, DC, Sim, FH (1973). Multiple metachronous osteogenic sarcoma. Report of twelve cases with two long-term survivors. *J Bone Joint Surg Am* **55**: 595-605.

Folkman, J (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* **3**: 65-71.

Folkman, J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**: 1182-6.

Forin, V, Arabi, A, Guignonis, V, Filipe, G, Bensman, A, Roux, C (2005). Benefits of pamidronate in children with osteogenesis imperfecta: an open prospective study. *Joint Bone Spine* **72**: 313-8.

Friedman, MA, Carter, SK (1972). The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future. *J Surg Oncol* **4**: 482-510.

Fuchs, B, Pritchard, DJ (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 40-52.

Gamberi, G, Serra, M, Ragazzini, P, Magagnoli, G, Pazzaglia, L, Ponticelli, F, Ferrari, C, Zanasi, M, Bertoni, F, Picci, P, Benassi, MS (2003). Identification of markers of possible prognostic value in 57 giant cell tumors of bone. *Oncol Rep* **10**: 351-6.

Gelaw, B, Ali, S, Becker, J (2004). Rothmund-Thomson syndrome, Klippel-Feil syndrome, and osteosarcoma. *Skeletal Radiol* **33**: 613-5.

German, J (1997). Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet* **93**: 100-6.

Goraca, A (2002). New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul* **36**: 161-7.

Grant, K, Loizidou, M, Taylor, I (2003). Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer* **88**: 163-6.

Gurney, JG, Severson, RK, Davis, S, Robison, LL (1995). Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* **75**: 2186-95.

Gurney, JG, Swensen, AR, Bulterys, M (1999). Malignant Bone Cancer: Incidence and Survival Among Children and Adolescents (1975-1995). *SEER Program*: 99-110.

Ha, HC, Snyder, SH (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol Dis* **7**: 225-39.

Ha, HC, Snyder, SH (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13978-82.

Handa, A, Tokunaga, T, Tsuchida, T, Lee, YH, Kijima, H, Yamazaki, H, Ueyama, Y, Fukuda, H, Nakamura, M (2000). Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol* **17**: 291-5.

Hansen, MF (2002). Genetic and molecular aspects of osteosarcoma. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**: 554-60.

Hassa, PO, Haenni, SS, Buerki, C, Meier, NI, Lane, WS, Owen, H, Gersbach, M, Imhof, R, Hottiger, MO (2005). Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem* **280**: 40450-64.

Hassa, PO, Hottiger, MO (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1534-53.

Hastings, RH (2004). Parathyroid hormone-related protein and lung biology. *Respir Physiol Neurobiol* **142**: 95-113.

Haug, C, Schmid-Kotsas, A, Zorn, U, Schuett, S, Gross, HJ, Gruenert, A, Bachem, MG (2001). Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins. *J Mol Cell Cardiol* **33**: 1701-12.

Henderson, IC, Frei, E, 3rd (1979). Testing for doxorubicin cardiotoxicity. *N Engl J Med* **300**: 1393-4.

Hill, TP, Spater, D, Taketo, MM, Birchmeier, W, Hartmann, C (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* **8**: 727-38.

Inoue, A, Yanagisawa, M, Kimura, S, Kasuya, Y, Miyauchi, T, Goto, K, Masaki, T (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2863-7.

Janik, P, Steel, GG (1972). Cell proliferation during immunological perturbation in three transplanted tumours. *Br J Cancer* **26**: 108-14.

Jeffrey, GM, Price, CH, Sissons, HA (1975). The metastatic patterns of osteosarcoma. *Br J Cancer* **32**: 87-107.

Juppner, H, Abou-Samra, AB, Freeman, M, Kong, XF, Schipani, E, Richards, J, Kolakowski, LF, Jr., Hock, J, Potts, JT, Jr., Kronenberg, HM, et al. (1991). A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* **254**: 1024-6.

Kakonen, SM, Mundy, GR (2003). Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer* **97**: 834-9.

Kameshita, I, Matsuda, Z, Taniguchi, T, Shizuta, Y (1984). Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *J Biol Chem* **259**: 4770-6.

Karaplis, AC, Luz, A, Glowacki, J, Bronson, RT, Tybulewicz, VL, Kronenberg, HM, Mulligan, RC (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* **8**: 277-89.

Kaste, SC, Pratt, CB, Cain, AM, Jones-Wallace, DJ, Rao, BN (1999). Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features. *Cancer* **86**: 1602-8.

Katwa, LC, Guarda, E, Weber, KT (1993). Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **27**: 2125-9.

Kaufmann, SH, Desnoyers, S, Ottaviano, Y, Davidson, NE, Poirier, GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **53**: 3976-85.

Kaya, M, Wada, T, Akatsuka, T, Kawaguchi, S, Nagoya, S, Shindoh, M, Higashino, F, Mezawa, F, Okada, F, Ishii, S (2000). Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* **6**: 572-7.

Khanna, C, Khan, J, Nguyen, P, Prehn, J, Caylor, J, Yeung, C, Trepel, J, Meltzer, P, Helman, L (2001). Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* **61**: 3750-9.

Khanna, C, Prehn, J, Yeung, C, Caylor, J, Tsokos, M, Helman, L (2000). An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* **18**: 261-71.

Khanna, C, Wan, X, Bose, S, Cassaday, R, Olomu, O, Mendoza, A, Yeung, C, Gorlick, R, Hewitt, SM, Helman, LJ (2004). The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* **10**: 182-6.

Kido, H, Nakano, A, Okishima, N, Wakabayashi, H, Kishi, F, Nakaya, Y, Yoshizumi, M, Tamaki, T (1998). Human chymase, an enzyme forming novel bioactive 31-amino acid length endothelins. *Biol Chem* **379**: 885-91.

Kikuchi, K, Nakagawa, H, Kadono, T, Etoh, T, Byers, HR, Mihm, MC, Tamaki, K (1996). Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 734-9.

Kirpensteijn, J, Timmermans-Sprang, EP, van Garderen, E, Rutteman, GR, Lantinga-van Leeuwen, IS, Mol, JA (2002). Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. *Mol Cell Endocrinol* **197**: 179-85.

Kishi, F, Minami, K, Okishima, N, Murakami, M, Mori, S, Yano, M, Niwa, Y, Nakaya, Y, Kido, H (1998). Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 387-90.

Kleczkowska, HE, Malanga, M, Szumiel, I, Althaus, FR (2002). Poly ADP-ribosylation in two L5178Y murine lymphoma sublines differentially sensitive to DNA-damaging agents. *Int J Radiat Biol* **78**: 527-34.

Kloog, Y, Sokolovsky, M (1989). Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 212-4.

Komori, T (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* **99**: 1233-9.

Komori, T, Yagi, H, Nomura, S, Yamaguchi, A, Sasaki, K, Deguchi, K, Shimizu, Y, Bronson, RT, Gao, YH, Inada, M, Sato, M, Okamoto, R, Kitamura, Y, Yoshiki, S, Kishimoto, T (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**: 755-64.

Krailo, M, Ertel, I, Makley, J, Fryer, CJ, Baum, E, Weetman, R, Yunis, E, Barnes, L, Bleyer, WA, Hammond, GD (1987). A randomized study comparing high-dose methotrexate with moderate-dose methotrexate as components of adjuvant chemotherapy in childhood nonmetastatic osteosarcoma: a report from the Childrens Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* **15**: 69-77.

Kraker, J, Voute, PA (1989). Experience with ifosfamide in paediatric tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* **24 Suppl 1**: S28-9.

Kurihara, Y, Kurihara, H, Oda, H, Maemura, K, Nagai, R, Ishikawa, T, Yazaki, Y (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* **96**: 293-300.

Ladanyi, M, Park, CK, Lewis, R, Jhanwar, SC, Healey, JH, Huvos, AG (1993). Sporadic amplification of the MYC gene in human osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol* **2**: 163-7.

Laghmani, K, Preisig, PA, Moe, OW, Yanagisawa, M, Alpern, RJ (2001). Endothelin-1/endothelin-B receptor-mediated increases in NHE3 activity in chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* **107**: 1563-9.

Lahav, R, Heffner, G, Patterson, PH (1999). An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11496-500.

Lamb, RF, Ozanne, BW, Roy, C, McGarry, L, Stipp, C, Mangeat, P, Jay, DG (1997). Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol* **7**: 682-8.

Lane, DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-6.

Largo, R, Gomez-Garre, D, Santos, S, Penaranda, C, Blanco, J, Esbrit, P, Egido, J (1999). Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* **55**: 82-90.

Lee, YH, Tokunaga, T, Oshika, Y, Suto, R, Yanagisawa, K, Tomisawa, M, Fukuda, H, Nakano, H, Abe, S, Tateishi, A, Kijima, H, Yamazaki, H, Tamaoki, N, Ueyama, Y, Nakamura, M (1999). Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer* **35**: 1089-93.

Lewis, VO, Wei, A, Mendoza, T, Primus, F, Peabody, T, Simon, MA (2007). Argon beam coagulation as an adjuvant for local control of giant cell tumor. *Clin Orthop Relat Res* **454**: 192-7.

Link, MP, Goorin, AM, Horowitz, M, Meyer, WH, Belasco, J, Baker, A, Ayala, A, Shuster, J (1991). Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop Relat Res*: 8-14.

Link, MP, Goorin, AM, Miser, AW, Green, AA, Pratt, CB, Belasco, JB, Pritchard, J, Malpas, JS, Baker, AR, Kirkpatrick, JA, et al. (1986). The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* **314**: 1600-6.

Longhi, A, Barbieri, E, Fabbri, N, Macchiagodena, M, Favale, L, Lippo, C, Salducca, N, Bacci, G (2003). Radiation-induced osteosarcoma arising 20 years after the treatment of Ewing's sarcoma. *Tumori* **89**: 569-72.

Longhi, A, Errani, C, De Paolis, M, Mercuri, M, Bacci, G (2006). Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat Rev* **32**: 423-36.

Mankin, HJ, Hornicek, FJ, Rosenberg, AE, Harmon, DC, Gebhardt, MC (2004). Survival data for 648 patients with osteosarcoma treated at one institution. *Clin Orthop Relat Res*: 286-91.

Mannstadt, M, Juppner, H, Gardella, TJ (1999). Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* **277**: F665-75.

Marina, N, Gebhardt, M, Teot, L, Gorlick, R (2004). Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* **9**: 422-41.

Marina, NM, Pratt, CB, Shema, SJ, Brooks, T, Rao, B, Meyer, WH (1993). Brain metastases in osteosarcoma. Report of a long-term survivor and review of the St. Jude Children's Research Hospital experience. *Cancer* **71**: 3656-60.

Martin-Nizard, F, Houssaini, HS, Lestavel-Delattre, S, Duriez, P, Fruchart, JC (1991). Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett* **293**: 127-30.

Martin, ER, Brenner, BM, Ballermann, BJ (1990). Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *J Biol Chem* **265**: 14044-9.

Masaki, T, Miwa, S, Sawamura, T, Ninomiya, H, Okamoto, Y (1999). Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* **375**: 133-8.

Masson, M, Niedergang, C, Schreiber, V, Muller, S, Menissier-de Murcia, J, de Murcia, G (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**: 3563-71.

Matsui, T, Yonemura, S, Tsukita, S, Tsukita, S (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* **9**: 1259-62.

Meyers, PA, Gorlick, R (1997). Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* **44**: 973-89.

Meyers, PA, Heller, G, Healey, J, Huvos, A, Lane, J, Marcove, R, Applewhite, A, Vlamis, V, Rosen, G (1992). Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* **10**: 5-15.

Miki, T, Yano, S, Hanibuchi, M, Kanematsu, T, Muguruma, H, Sone, S (2004). Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is responsible for production of bone metastasis, but not visceral metastasis, by human small cell lung cancer SBC-5 cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer* **108**: 511-5.

Miszczuk, L, Wydmanski, J, Spindel, J (2001). Efficacy of radiotherapy for giant cell tumor of bone: given either postoperatively or as sole treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**: 1239-42.

Mitelman, F (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* **462**: 247-53.

Miyauchi, T, Masaki, T (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* **61**: 391-415.

Morris, CD, Gorlick, R, Huvos, G, Heller, G, Meyers, PA, Healey, JH (2001). Human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic indicator in osteogenic sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 59-65.

Nakagawa, K, Utsunomiya, J, Ishikawa, T (1988). Inhibition of methylazoxymethanol acetate initiation of colon carcinogenesis in rats by treatment with the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Carcinogenesis* **9**: 1167-71.

Nakano, A, Kishi, F, Minami, K, Wakabayashi, H, Nakaya, Y, Kido, H (1997). Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* **159**: 1987-92.

Nakashima, K, Zhou, X, Kunkel, G, Zhang, Z, Deng, JM, Behringer, RR, de Crombrughe, B (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**: 17-29.

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**: 266-71.

Nelson, J, Bagnato, A, Battistini, B, Nisen, P (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 110-6.

Nelson, JB (2001). Endothelin receptor antagonists in the treatment of prostate cancer. *Prostate* **49**: 91-2.

Nelson, JB, Hedican, SP, George, DJ, Reddi, AH, Piantadosi, S, Eisenberger, MA, Simons, JW (1995). Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* **1**: 944-9.

Nelson, JB, Lee, WH, Nguyen, SH, Jarrard, DF, Brooks, JD, Magnuson, SR, Opgenorth, TJ, Nelson, WG, Bova, GS (1997). Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* **57**: 35-7.

Nelson, JB, Nguyen, SH, Wu-Wong, JR, Opgenorth, TJ, Dixon, DB, Chung, LW, Inoue, N (1999). New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* **53**: 1063-9.

Nguewa, PA, Fuertes, MA, Valladares, B, Alonso, C, Perez, JM (2005). Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* **88**: 143-72.

Nicotera, P, Leist, M, Ferrando-May, E (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* **66**: 69-73.

Nishizawa, H, Matsuda, M, Yamada, Y, Kawai, K, Suzuki, E, Makishima, M, Kitamura, T, Shimomura, I (2004). Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem* **279**: 19391-5.

Olson, HM, Capen, CC (1977). Virus-induced animal model of osteosarcoma in the rat: Morphologic and biochemical studies. *Am J Pathol* **86**: 437-58.

Olson, RD, Mushlin, PS (1990). Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J* **4**: 3076-86.

Onda, M, Matsuda, S, Higaki, S, Iijima, T, Fukushima, J, Yokokura, A, Kojima, T, Horiuchi, H, Kurokawa, T, Yamamoto, T (1996). ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* **77**: 71-8.

Oshika, Y, Nakamura, M, Tokunaga, T, Ozeki, Y, Fukushima, Y, Hatanaka, H, Abe, Y, Yamazaki, H, Kijima, H, Tamaoki, N, Ueyama, Y (1998). Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* **12**: 541-4.

Pagotto, U, Arzberger, T, Hopfner, U, Sauer, J, Renner, U, Newton, CJ, Lange, M, Uhl, E, Weindl, A, Stalla, GK (1995). Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth. *J Clin Invest* **96**: 2017-25.

Papachristou, DJ, Papavassiliou, AG (2007). Osteosarcoma and chondrosarcoma: new signaling pathways as targets for novel therapeutic interventions. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 857-62.

Pautke, C, Schieker, M, Tischer, T, Kolk, A, Neth, P, Mutschler, W, Milz, S (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* **24**: 3743-8.

Pedram, A, Razandi, M, Hu, RM, Levin, ER (1997). Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* **272**: 17097-103.

Pinet, F (2004). [What is the role of endothelin system?]. *Med Sci (Paris)* **20**: 339-45.

Plaza, S, Aumercier, M, Bailly, M, Dozier, C, Saule, S (1999). Involvement of poly (ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene* **18**: 1041-51.

Pochanugool, L, Subhadharaphandou, T, Dhanachai, M, Hathirat, P, Sangthawan, D, Pirabul, R, Onsanit, S, Pornpipatpong, N (1997). Prognostic factors among 130 patients with osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*: 206-14.

Pritchard, DJ, Finkel, MP, Reilly, CA, Jr. (1975). The etiology of osteosarcoma. A review of current considerations. *Clin Orthop Relat Res*: 14-22.

Quan, GM, Choong, PF (2006). Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 707-13.

Quesnel, S, Verselis, S, Portwine, C, Garber, J, White, M, Feunteun, J, Malkin, D, Li, FP (1999). p53 compound heterozygosity in a severely affected child with Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* **18**: 3970-8.

Reddy, KB, Nabha, SM, Atanaskova, N (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **22**: 395-403.

Renard, AJ, Veth, RP, Schreuder, HW, Pruszczynski, M, Bokkerink, JP, van Hoesel, QG, van Der Staak, FJ (1999). Osteosarcoma: oncologic and functional results. A single institutional report covering 22 years. *J Surg Oncol* **72**: 124-9.

Rhim, JS, Putman, DL, Arnstein, P, Huebner, RJ, McAllister, RM (1977). Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int J Cancer* **19**: 505-10.

Rosano, L, Spinella, F, Salani, D, Di Castro, V, Venuti, A, Nicotra, MR, Natali, PG, Bagnato, A (2003). Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63**: 2447-53.

Rosano, L, Varmi, M, Salani, D, Di Castro, V, Spinella, F, Natali, PG, Bagnato, A (2001). Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **61**: 8340-6.

Rosen, G, Caparros, B, Huvos, AG, Kosloff, C, Nirenberg, A, Cacavio, A, Marcove, RC, Lane, JM, Mehta, B, Urban, C (1982). Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* **49**: 1221-30.

Rubanyi, GM, Polokoff, MA (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* **46**: 325-415.

Ruf, A, Mennissier de Murcia, J, de Murcia, G, Schulz, GE (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7481-5.

Rytting, M, Pearson, P, Raymond, AK, Ayala, A, Murray, J, Yasko, AW, Johnson, M, Jaffe, N (2000). Osteosarcoma in preadolescent patients. *Clin Orthop Relat Res*: 39-50.

Saeter, G, Alvegard, TA, Elomaa, I, Stenwig, AE, Holmstrom, T, Solheim, OP (1991). Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: a Scandinavian Sarcoma Group study. *J Clin Oncol* **9**: 1766-75.

Sakurai, T, Yanagisawa, M, Takuwa, Y, Miyazaki, H, Kimura, S, Goto, K, Masaki, T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-5.

Salani, D, Di Castro, V, Nicotra, MR, Rosano, L, Tecce, R, Venuti, A, Natali, PG, Bagnato, A (2000a). Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **157**: 1537-47.

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 Pathol* **157**: 1703-11.

Sanghavi, DM, Thelen, M, Thornberry, NA, Casciola-Rosen, L, Rosen, A (1998). Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett* **422**: 179-84.

Sato, N, Funayama, N, Nagafuchi, A, Yonemura, S, Tsukita, S, Tsukita, S (1992). A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* **103** (Pt 1): 131-43.

Schajowicz, F, Sissons, HA, Sobin, LH (1995). The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* **75**: 1208-14.

Schluter, KD, Katzer, C, Piper, HM (2001). A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET(A) receptors. *Br J Pharmacol* **132**: 427-32.

Schmidt, J, Luz, A, Strauss, PG, Schon, A, Murray, AB, Melchiori, A, Aresu, O, Allavena, G, Erfle, V (1988). [Heterogeneity of clonal cell lines from a spontaneous osteosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **72**: 330-2.

Scholz, RB, Kabisch, H, Weber, B, Roser, K, Delling, G, Winkler, K (1992). Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas. *Pediatr Hematol Oncol* **9**: 125-37.

Schreiber, V, Hunting, D, Trucco, C, Gowans, B, Grunwald, D, De Murcia, G, De Murcia, JM (1995). A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4753-7.

Shichiri, M, Kato, H, Marumo, F, Hirata, Y (1997). Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* **30**: 1198-203.

Simonson, MS, Dunn, MJ (1990). Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* **4**: 2989-3000.

Slamon, DJ, Clark, GM, Wong, SG, Levin, WJ, Ullrich, A, McGuire, WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-82.

Smith, S (2001). The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* **26**: 174-9.

Southby, J, Kissin, MW, Danks, JA, Hayman, JA, Moseley, JM, Henderson, MA, Bennett, RC, Martin, TJ (1990). Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer. *Cancer Res* **50**: 7710-6.

Southby, J, O'Keeffe, LM, Martin, TJ, Gillespie, MT (1995). Alternative promoter usage and mRNA splicing pathways for parathyroid hormone-related protein in normal tissues and tumours. *Br J Cancer* **72**: 702-7.

Stiller, CA, Craft, AW, Corazziari, I (2001). Survival of children with bone sarcoma in Europe since 1978: results from the EURO CARE study. *Eur J Cancer* **37**: 760-6.

Suzuki, T, Hoshi, N, Watanabe, K, Kasukawa, R, 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.

Tapp, E (1966). Beryllium induced sarcomas of the rabbit tibia. *Br J Cancer* **20**: 778-83.

Tentori, L, Portarena, I, Graziani, G (2002). Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res* **45**: 73-85.

Thomas, DM, Carty, SA, Piscopo, DM, Lee, JS, Wang, WF, Forrester, WC, Hinds, PW (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell* **8**: 303-16.

Thomas, G, Moffatt, P, Salois, P, Gaumont, MH, Gingras, R, Godin, E, Miao, D, Goltzman, D, Lanctot, C (2003). Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem* **278**: 50563-71.

Thompson, WD, Shiach, KJ, Fraser, RA, McIntosh, LC, Simpson, JG (1987). Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol* **151**: 323-32.

Tinke, PT, Lembo, TM, Evans, GR, Cundiff, JH, Gray, KN, Price, RE (1998). Postirradiation sarcomas in Sprague-Dawley rats. *Radiat Res* **149**: 401-4.

Tokunaga, T, Oshika, Y, Abe, Y, Ozeki, Y, Sadahiro, S, Kijima, H, Tsuchida, T, Yamazaki, H, Ueyama, Y, Tamaoki, N, Nakamura, M (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* **77**: 998-1002.

Uchida, K, Morita, T, Sato, T, Ogura, T, Yamashita, R, Noguchi, S, Suzuki, H, Nyunoya, H, Miwa, M, Sugimura, T (1987). Nucleotide sequence of a full-length cDNA for human fibroblast poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 617-22.

Unni, KK, Dahlin, DC (1984). Grading of bone tumors. *Semin Diagn Pathol* **1**: 165-72.

Uy, HL, Guise, TA, De La Mata, J, Taylor, SD, Story, BM, Dallas, MR, Boyce, BF, Mundy, GR, Roodman, GD (1995). Effects of parathyroid hormone (PTH)-related protein and PTH on osteoclasts and osteoclast precursors in vivo. *Endocrinology* **136**: 3207-12.

Varley, JM, McGown, G, Thorncroft, M, Santibanez-Koref, MF, Kelsey, AM, Tricker, KJ, Evans, DG, Birch, JM (1997). Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* **57**: 3245-52.

Vaux, DL, Cory, S, Adams, JM (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-2.

Vedi, S, Purdie, DW, Ballard, P, Bord, S, Cooper, AC, Compston, JE (1999). Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long-term, high-dose estrogen therapy. *Osteoporos Int* **10**: 52-8.

Venuti, A, Salani, D, Manni, V, Poggiali, F, Bagnato, A (2000). Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *Faseb J* **14**: 2277-83.

Wafa, H, Grimer, RJ (2006). Surgical options and outcomes in bone sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**: 239-48.

Wang, LL (2005). Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J* **11**: 294-305.

Ward, Y, Wang, W, Woodhouse, E, Linnoila, I, Liotta, L, Kelly, K (2001). Signal pathways which promote invasion and metastasis: critical and distinct contributions of extracellular signal-regulated kinase and Ral-specific guanine exchange factor pathways. *Mol Cell Biol* **21**: 5958-69.

Weinfeld, MS, Dudley, HR, Jr. (1962). Osteogenic sarcoma. A follow-up study of the ninety-four cases observed at the Massachusetts General Hospital from 1920 to 1960. *J Bone Joint Surg Am* **44-A**: 269-76.

Winkler, K, Beron, G, Delling, G, Heise, U, Kabisch, H, Purfurst, C, Berger, J, Ritter, J, Jurgens, H, Gerein, V, et al. (1988). Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized cooperative trial (COSS-82) with salvage chemotherapy based on histological tumor response. *J Clin Oncol* **6**: 329-37.

Woods, CG (1998). DNA repair disorders. *Arch Dis Child* **78**: 178-84.

Wu-Wong, JR, Chiou, WJ, Dickinson, R, Opgenorth, TJ (1997). Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J* **328** (Pt 3): 733-7.

Wu, JX, Carpenter, PM, Gresens, C, Keh, R, Niman, H, Morris, JW, Mercola, D (1990). The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene* **5**: 989-1000.

Wulfing, P, Diallo, R, Kersting, C, Wulfing, C, Poremba, C, Greb, RR, Bocker, W, Kiesel, L (2004). Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep* **11**: 791-6.

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 Commun Chem Pathol Pharmacol* **74**: 363-9.

Yanagisawa, M, Kurihara, H, Kimura, S, Goto, K, Masaki, T (1988). A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl* **6**: S188-91.

Yu, SW, Wang, H, Poitras, MF, Coombs, C, Bowers, WJ, Federoff, HJ, Poirier, GG, Dawson, TM, Dawson, VL (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**: 259-63.

Yu, Y, Khan, J, Khanna, C, Helman, L, Meltzer, PS, Merlino, G (2004). Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* **10**: 175-81.

Zamzami, N, Kroemer, G (2005). p53 in apoptosis control: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 685-7.

Zhang, J, Dawson, VL, Dawson, TM, Snyder, SH (1994). Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* **263**: 687-9.

ANNEXES

Contribution des auteurs à l'article

J'ai effectué les expériences reliées à la technique d'invasion cellulaire en plus d'avoir réalisé la figure 7. J'ai également collaboré aux expériences reliées aux figures 1b, 2d et 2e de cet article. De plus, j'ai participé à la révision de cet article suite aux commentaires du comité de pair de la revue *Clinical Science*.

Mélanie Felx a effectué les autres expériences de cet article en plus d'avoir rédigé la première version de l'article. La version a été révisé et corrigé par mon directeur de maîtrise, Dr Florina Moldovan. J'ai également participé à la correction de l'article.

Dr Marc Isler, chirurgien orthopédique, a recruté les patients et a collecté les tissus humains ainsi que les données cliniques. Il a également contribué à l'écriture de l'article.

Dr Josée Doyon, pathologiste, a fourni les informations reliées aux tumeurs, soit le grade histologique ainsi que les informations relatives au patient tel que l'âge et le site primaire de la tumeur.

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

Dr Florina Moldovan a établi les bases de ce projet de recherche, soit les objectifs et les hypothèses en plus d'avoir élaboré le projet qui a mené à ce papier. Son laboratoire a fourni tous les éléments nécessaires à la réalisation du projet qui a mené à cet article. Elle a également obtenu des fonds de recherche attribué par l'Association Canadienne d'Orthopédie (Prix Carroll A. Laurin).

Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF- κ B in human osteosarcoma

Mélanie FELX*, Marie-Claude GUYOT*, Marc ISLER†, Robert E. TURCOTTE‡, Josée DOYON†, Abdel-Majid KHATIB§, Séverine LECLERC*, Alain MOREAU*|| and Florina MOLDOVAN*||

*Research Centre of the CHU Sainte-Justine Hospital, Montreal, QC, Canada, †Maisonneuve-Rosemont Hospital, University of Montréal, Montreal, QC, Canada, ‡McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada, §Laboratoire de Pharmacologie Expérimentale et Clinique, INSERM U 716, Institut de Génétique Moléculaire, Paris, France, and ||Faculty of Dentistry, University of Montréal, Montreal, QC, Canada

A B S T R A C T

In the present study, we have investigated the effect of (i) ET-1 (endothelin-1) and its precursor, big ET-1, on MMP (matrix metalloproteinase)-2 and MMP-9 synthesis and activity in osteosarcoma tissue, and (ii) ET-1 receptor antagonists on cell invasion. Using Western blotting, zymography, RT-PCR (reverse transcription-PCR), immunohistochemistry, immunofluorescence and Northern blotting, we have shown that ET-1 and ET-1 receptors (ET_A and ET_B) were expressed in these cells. Additionally, we have demonstrated that ET-1 markedly induced the synthesis and activity of MMP-2, which was significantly increased when compared with MMP-9. Furthermore, inhibition of NF- κ B (nuclear factor 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 and because inhibition of ET_A receptor is beneficial for reducing both basal and ET-1-induced osteosarcoma cell invasion, targeting this receptor could be an attractive therapeutic alternative for the successful treatment of osteosarcoma.

INTRODUCTION

Osteosarcoma is the most frequent primary bone malignancy and the third most common type of cancer among youngsters [1]; 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 multidrug chemotherapy and surgery. There has been little progress over the last 20 years in survival rates for osteosarcoma. The cure rate is approx. 65 % for patients with localized diseases. When presenting with metastases at the time of diagnosis, survival is 25 % [1,2].

Osteosarcoma invasion involves the infiltration of neighbouring tissues surrounding the tumour as a consequence of abnormal cellular proliferation and, for the

Key words: endothelin-1 (ET-1), ET_A, gelatinase, nuclear factor κ B (NF- κ B), matrix metalloproteinase (MMP), osteosarcoma.

Abbreviations: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix; ET-1, endothelin-1; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP, matrix metalloproteinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; PDTC, pyrrolidine carboxithioic acid; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases.

Correspondence: Dr Florina Moldovan, at Research Center Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada

[Information retirée / information withdrawn]

Table 1 Clinical characteristics of the primary cell cultures derived from human osteosarcoma tissues obtained intra-operatively

NE, not evaluated. Grade 4/4 corresponds to the undifferentiated osteosarcoma classification determined using the Staging System of the American Joint Committee on Cancer; grade 1/3 corresponds to the chondrosarcoma histological type designation of the NCI (National Cancer Institute) System.

Number	Age (years)	Sex	Primary site	Histological subtype	Grade	Diagnosis
OS#1	6	Male	Left tibia	Osteosarcoma	4/4	Osteosarcoma
OS#2	14	Female	Right proximal tibia	Osteogenic osteosarcoma	4/4	Osteogenic osteosarcoma
OS#3	25	Female	Femur	NE	4/4	Osteosarcoma
OS#4	46	Male	Right pelvis	Chondrosarcoma	1/3	Chondrosarcoma on osteochondroma
OS#5	11	Female	Left proximal tibia	Osteosarcoma	NE	Osteochondromatose with tibial exostose
OS#6	14	Female	Right proximal tibia	Osteosarcoma	4/4	Osteosarcoma
OS#7	60	Male	Left proximal fibula	Chondrosarcoma	NE	Chondrosarcoma
OS#8	46	Male	Left vertebra L1	Chondrosarcoma	4/4	Chondrosarcoma

development of metastases, cancerous cells must degrade the components of the ECM (extracellular matrix). This crucial step in tumour progression involves MMP (matrix metalloproteinase) activity. Reich and Liotta, pioneers in this field of research, have described the concept by stating that the proteolytic degradation of the matrix barrier is critical for tumour cell invasion and metastasis to distant sites [3,4]. A significant role in 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 [5]. This is probably due to the fact that the inhibitors were not employed in the early stages of cancer to prevent its progression [5]. Also, the MMP inhibitors used only had effects on MMP activity, but did not inhibit MMP synthesis.

Among all of the MMPs, gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are recognized to be particularly involved in the degradation of ECM components, such as collagen type IV and V of cell basal membrane. In osteosarcoma tissue, both MMP-2 and MMP-9 are over-expressed in comparison with their expression in non-affected stromal tissue [5]. In the tumour micro-environment, the regulation of MMPs is crucial, and factors controlling this regulation appear to be even more important. According to previous studies [6], ET-1 (endothelin-1) is such a regulating factor.

ET-1 is a potent vasoconstrictor peptide, initially discovered in endothelial cells [6], 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, has been demonstrated previously [7-9]. Increasing evidence points to ET-1 as a relevant mediator in tumour progression in a variety of malignancies. High plasma levels of ET-1 were found among patients with various solid tumours [7-9], where ET-1 levels were higher

among patients with metastasis. In addition, *in vitro* synthesis of ET-1 has been observed in many cancer cell lines [10,11]. This phenomenon was also reflected *in vivo* where an increase in immunoreactivity for ET-1 was demonstrated in several types of cancer [6,12,13]. These findings suggest that the modulation of ET-1 is involved in the tumour process. It has also been shown that ET-1 acts as an MMP inducer [14], 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 the development of metastasis in high-grade osteosarcoma [6].

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

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

MG-63, Saos-2, MNNG/HOS and SJSA-1 (osteosarcoma cell lines) and SK-ES-1 (Ewing sarcoma cell line), purchased from the American Type Culture Collection, as well as eight primary cell cultures derived from human osteosarcoma tissues obtained intra-operatively (Table 1), were investigated in the present study. Tissues were collected with the consent of patients following approval by the Institutional Ethics Committee Board of Sainte-Justine Hospital, Montreal, Canada. Tissues were incubated in culture medium [DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS (fetal calf serum; Hyclone), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL)] at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air and primary

cells were derived. Cells were then plated in tissue-culture flasks (25 cm²) and cultured until confluence was reached. At 24 h before cell stimulation, cells were incubated in serum-free culture medium and then incubated with ET-1 (10 nmol/l), big ET-1 (10 nmol/l), IL-1 β (interleukin-1 β ; 200 pg/ml; all from Sigma-Aldrich) and PDTC (pyrrolidine carbodithioic acid; Calbiochem EDM Biosciences) from 0–10 μ mol/l in DMEM containing 2.5% (v/v) FCS for various lengths of time [24 h for RT-PCR (reverse transcription-PCR), Northern blotting and Western blotting, and 5 min, 30 min and 4 h for NF- κ B (nuclear factor κ B) determination].

RNA extraction

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Gibco BRL), as described previously [15], and processed according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was quantified by the RiboGreen method [16].

RT-PCR

For RT-PCR, 1 μ g of total RNA was used and reverse transcription and PCR were carried out as described by Lange et al. [17]. The ET-1 primers used were: forward primer, 5'-GTCAACACTCCCGACCACGTT-3'; and reverse primer, 5'-CTGGTTGTCTTAGGTGTTCC-TC-3' (yielding amplified products of 304 bp). The GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) primers used were: forward primer, 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3'; reverse primer, 5'-GCTTGACAAAGTGGTTCGTTGAG-3' (yielding amplified products of 315 bp). PCR was carried out as for the ET-1 PCR. The ET_A primers used were: forward primer, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; and reverse primer 5'-TCAACATCTCACAAGTCATGAG-3' (yielding amplified products of 383 bp). The ET_B receptor primers used were forward primer, 5'-TTGGAGCTGAGATGTGTAAGC-3'; and reverse primer, 5'-CAGTGAAGCCATGTTGATACC-3' (yielding amplified products of 450 bp).

Western blotting

MG-63 cells were lysed in 0.2 ml of boiling 0.5% SDS. The protein concentration of the lysate was determined with the Bradford dye assay (Bio-Rad Laboratories). For Western blotting, the supernatant or 10 μ g of lysate protein was electrophoresed on an SDS discontinuous gradient polyacrylamide gel (10%, w/v) and transferred electrophoretically on to a nitrocellulose membrane (Hybond C extra; Amersham Biosciences). The membranes were immersed overnight in the Super Block Blocking buffer (Pierce) and were then rinsed and incubated for 24 h at 4°C with antibodies specifically recognizing: (i) MMP-2; (ii) TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases)-1; (iii) TIMP-2 (all at a dilution

of 0.1 μ g/ml; all from Oncogene Research Products) and (iv) p65 subunit of NF- κ B (0.2 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology). Following incubation with the primary antibody, membranes were carefully washed and re-incubated for 1 h at room temperature with a secondary antibody. Anti-(mouse IgG)-horseradish peroxidase conjugate (1:40000 dilution) was used for the detection of the MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2, and anti-(rabbit IgG)-horseradish peroxidase conjugate (1:40000 dilution) was used for the detection of the p65 subunit of NF- κ B. After careful washing, detection was performed using the Super Signal Ultra Western blotting chemiluminescence system (Pierce).

Northern blotting

After RNA extraction, 5 μ g of total RNA was resolved on 1.2% (w/v) formaldehyde/agarose gel and transferred electrophoretically on to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Biosciences) in 10 mmol/l sodium acetate buffer (pH 7.8) containing 20 mmol/l Tris/HCl and 0.5 mM EDTA overnight at 4°C. RNA was cross-linked to the membrane by exposure to UV light. After pre-hybridization 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'-deoxyUTP (DIG-11 UTP; Roche Diagnostic) according to the manufacturer's specifications. Detection was carried out by chemiluminescence with CDP substrate (Roche Diagnostic) and revealed by exposure to Kodak X-AR5 film (Eastman Kodak). After the first hybridization, the membrane was stripped and re-hybridized with a digoxigenin-labelled probe specific to GAPDH RNA, which served as a housekeeping gene. The autoradiographs were scanned with the Chemi-Imager 4000 imaging system (Alpha Innotech).

Gelatin zymography

Gelatinase activity was assayed by zymography analysis as described by Xu et al. [18]. Briefly, culture medium was separated by SDS/PAGE on a 10% (w/v) gel containing 1 mg/ml gelatin. The gel was washed twice in 2.5% (w/v) Triton X-100 solution and was incubated overnight at 37°C in developing buffer [50 mmol/l Tris/HCl (pH 7.4), 10 mmol/l CaCl₂, 5 mmol/l ZnCl₂ and 0.05% Brij-35], stained with 0.5% Coomassie Blue and then destained in a 40% (v/v) methanol/10% (v/v) acetic acid solution.

Immunohistochemistry

Briefly, specimens were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) of paraffin-embedded specimens were de-paraffinized in toluene and hydrated in a degraded series of ethanol. The tissue sections were incubated with primary antibody [monoclonal anti-(ET-1) antibody (5 μ g/ml; Research Diagnostic), anti-ET_A and -ET_B antibodies (8 μ g/ml;

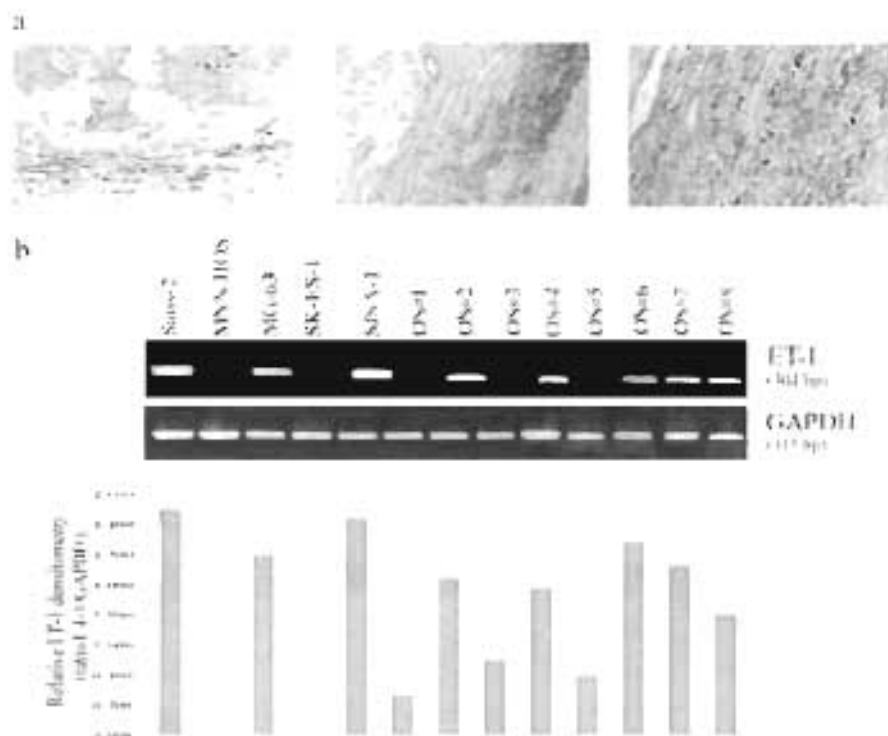


Figure 1 ET-1 protein and gene expression in osteosarcoma cell lines and primary cell cultures derived from osteosarcoma tissue

(a) Immunohistochemical detection of ET-1 in osteosarcoma tissue. Representative samples of osteosarcoma specimens ($n=6$) stained with a specific anti-ET-1 antibody ($5 \mu\text{g/ml}$ dilution) are shown. The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. The slides were counterstained with eosin. Intense immunoreactivity in the osteoblasts was observed, but no staining on the ECM. Magnification (from left to right), $\times 100$, $\times 50$ and $\times 200$. (b) RT-PCR for ET-1 gene expression in bone tumour cells. Cells were cultured for 24 h at 37°C in DMEM/2.5% (v/v) FCS. PCR products for ET-1 (104 bp) and GAPDH (115 bp) were visualized by ethidium bromide.

Sigma-Aldrich) and anti-(MMP-2) and anti-(MMP-9) antibodies ($2 \mu\text{g/ml}$; Oncogene Research Products)] and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The colour was developed by DAB (diaminobenzidine; Dako Diagnostics) containing H_2O_2 , and the slides were counterstained with eosin (Difco Diagnostics). 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 (Nalgel Nunc) and were then treated with 10 nmol/l ET-1 (Sigma-Aldrich), 10 nmol/l big ET-1 (Sigma-Aldrich) or 200 pg/ml T1-1 β (Sigma-Aldrich) at 37°C for 24 h in DMEM/2.5% (v/v) FCS. Cells were fixed in a solution of methanol/acetic acid (1:1, v/v) for 10 min. The fixed cells were incubated with a rabbit polyclonal antibody against the p65 subunit of NF- κB ($2 \mu\text{g/ml}$; Santa Cruz Biotechnology) 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. Cells were washed, mounted

with cover slips using ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Molecular Probes) and were analysed using a confocal microscope. Positive staining was revealed by Alexa fluorophore 488 for green cytoplasm staining and DAPI for blue nuclear staining.

Cell invasion

The invasion of osteosarcoma cells expressing both ET_A and ET_B receptors (MG-63) and those expressing only the ET_A receptor (MNG-108) was evaluated. Invasion was quantified by *in vitro* cell transmigration after 16 h using the Cell Invasion Assay Kit (Chemicon Temecula). Cells were incubated without or with selective antagonists of ET_A receptor ($1 \mu\text{mol/l}$ BQ123), ET_B receptor ($1 \mu\text{mol/l}$ BQ788), both ET_A and ET_B antagonists ($1 \mu\text{mol/l}$ BQ123 + $1 \mu\text{mol/l}$ BQ788) and with the specific inhibitor of NF- κB activity ($1 \mu\text{mol/l}$ PDTC). In this experiment, cells were not exposed to exogenous ET-1 in order to determine the autocrine effects of this peptide (endogenous ET-1 invasive properties). In another set of experiments, cells were exposed to exogenous ET-1 (10 nmol/l) without or with the

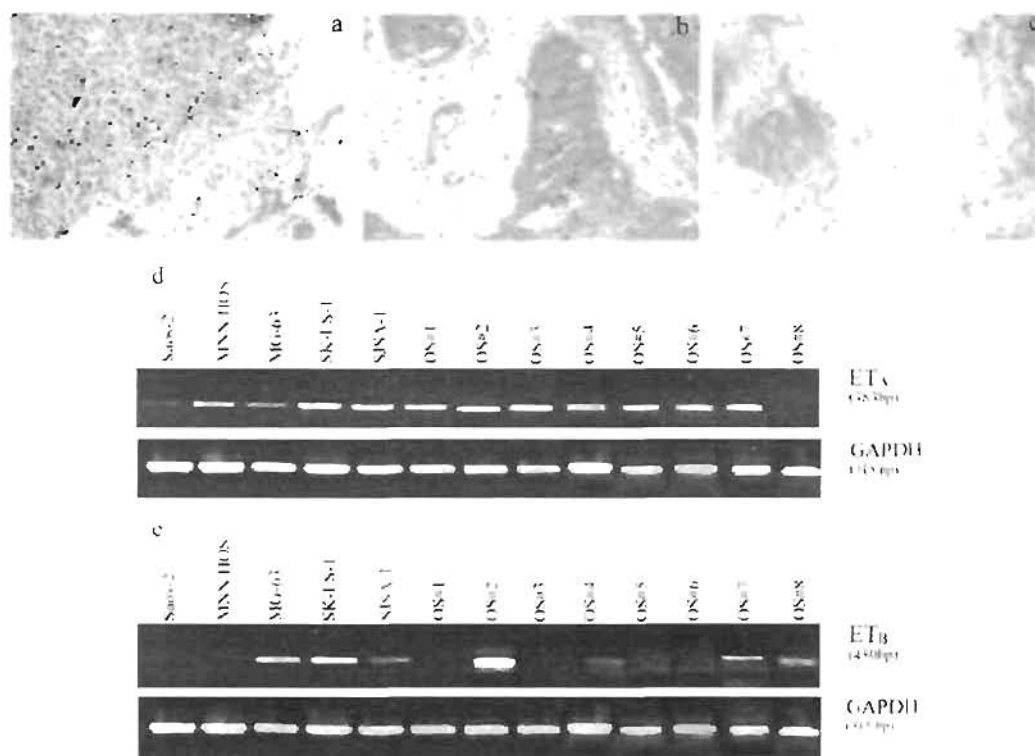


Figure 2 ET_A and ET_B expression in bone cancer tissue and osteosarcoma cells

Immunohistochemical detection of (a) ET_A and (b) ET_B in osteosarcoma tissue. (c) Negative control. Representative samples of osteosarcoma specimens ($n = 4$) stained with specific anti-(ET_A) and -(ET_B) antibodies (8 $\mu\text{g/ml}$ dilution) are shown. The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. Slides were counterstained with eosin. The percentage of positive cells was $49 \pm 10.57\%$ for ET_A and $11.5 \pm 7.3\%$ for ET_B, indicating a significant ($P < 0.005$) predominance of ET_A immunodetection compared with ET_B. Original magnification, $\times 200$. RT-PCR for (d) ET_A and (e) ET_B gene expression in bone tumour cells. The cells were cultured for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in DMEM/2.5% (v/v) FCS. PCR products for ET_A (383 bp), ET_B (450 bp) and GAPDH (315 bp) were visualized by ethidium bromide.

ET_A antagonist (1 $\mu\text{mol/l}$ BQ123), and invasive cells were quantified. Invasive cells (migrating through the polycarbonate membrane) were incubated with Cell Stain solution, and then subsequently extracted and detected on a standard microplate reader (at 560 nm).

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 osteosarcoma tissues. In osteosarcoma tissues, ET-1 protein was localized by immunohistochemistry (Figure 1a). All of the tissues investigated ($n = 4$) had specific immunoreactivity. Positive staining was observed preferentially in matrix-localized cells with an osteoblastic phenotype. In osteosarcoma cells, using

RT-PCR, specific mRNA coding for ET-1 was found in all cell lines investigated, except MNNG/HOS and SK-ES-1 (Figure 1b, lanes 1–5), as well as in cells derived from biopsy tissue (Figure 1b, lanes 6–13). Immunolocalization of ET-1 receptors (ET_A and ET_B) is shown in Figure 2(a–c). In osteosarcoma tissues, $49 \pm 10.57\%$ of the cells were positive for ET_A, whereas only $11.5 \pm 7.3\%$ of the cells were positive 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 (Figure 2d) was found in all of the cells investigated (except for OS#8). However, as shown in Figure 2(c) (lanes 3–5), specific mRNA coding for ET_B was detected only in MG-63, SK-ES-1 and SJSA-1 cells.

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 analysed 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

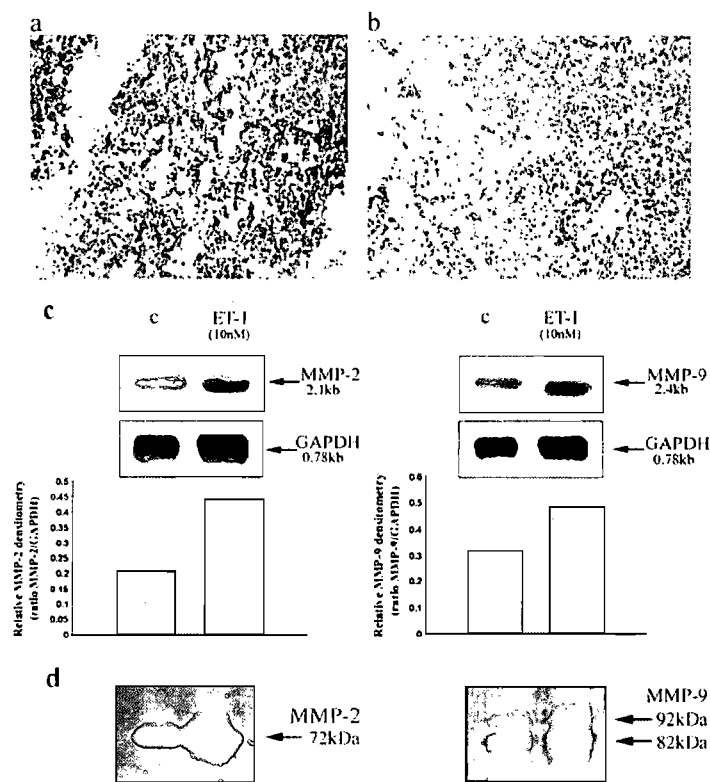


Figure 3 Gelatinase expression and activity in bone cancer tissue

Immunohistochemical detection of (a) MMP-2 and (b) MMP-9 in osteosarcoma tissue. Representative samples of osteosarcoma specimens ($n = 4$) stained with specific anti-(MMP-2) and -(MMP-9) antibodies ($2 \mu\text{g/ml}$ dilution) are shown. The DAB substrate used for the staining is represented by the brown colour. The slides were counterstained with haematoxylin. MMP-2 ($81 \pm 18.7\%$ of cells were positive) was highly expressed compared with MMP-9, which was detected in only $3.67 \pm 1.53\%$ of cells ($P < 0.05$). Original magnification, $\times 200$. (c and d) Effect of ET-1 on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression and activation in the osteosarcoma cell line. Representative Northern blots of MMP-2, MMP-9 and GAPDH mRNA in osteosarcoma (MG-63) cells are shown. Cells were cultured for 24 h at 37°C in DMEM/2.5% (v/v) FCS in the absence or presence of ET-1 (10 nmol/l). Total RNA ($5 \mu\text{g/lane}$) extracted from untreated cells (c) or treated cells was analysed with specific MMP-2 and MMP-9 probes by Northern blotting. The membrane was also hybridized with a GAPDH probe as a control for RNA loading. (d) Gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was detected in medium from osteosarcoma cells (MG-63) cultured for 24 h at 37°C in DMEM/2.5% (v/v) FCS in the absence (control) or presence of ET-1 (10 nmol/l) by SDS/PAGE gelatin zymography.

osteosarcoma tissue is shown in Figures 3(a) and 3(b). By immunohistochemistry, $81 \pm 18.7\%$ of cells were positive for MMP-2, whereas only $3.67 \pm 1.53\%$ of cells were positive for MMP-9 ($P < 0.05$). mRNA transcripts for MMP-2 and MMP-9 (Figure 3c), as well as for gelatinase activity (Figure 3d), were detected in both stimulated and non-stimulated osteosarcoma cells. In Figure 3(c), ET-1-induced expression levels of MMP-2 and MMP-9 were similar, as determined by Northern blotting. By zymography, ET-1 acted as an inducer of both MMP-2 and MMP-9 (Figure 3d). 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 addition, enzymatic activity corresponding to MMP-2 was increased when compared with 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 the case of tissue turnover, such as tumour invasion [19].

NF- κ B inhibition down-regulates ET-1-induced MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in osteosarcoma cells

NF- κ B is a ubiquitous transcription factor that regulates MMP gene activation [20]. Therefore the effect of NF- κ B inhibition by PDTC on the expression of MMP-2 was investigated. Figure 4(a) shows that ET-1-induced MMP2 expression was inhibited in a dose-dependent manner by treatment of cells with PDTC. Furthermore, the expression of TIMP-1 (Figure 4b) and TIMP-2 (Figure 4c), which was also induced by ET-1, was inhibited by PDTC in a similar manner to that observed for MMP-2. PDTC also diminished the enzymatic activity of ET-1-induced MMP-2 and MMP-9, as determined by gelatin zymography (Figure 4d).

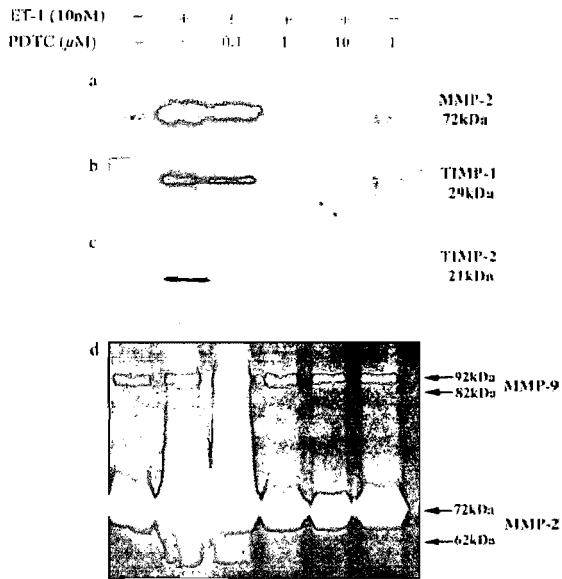


Figure 4 Effect of PDTC on MMP-2 (a), TIMP-1 (b) and TIMP-2 (c) expression and gelatinase activation (d) in an osteosarcoma cell line

MG-63 cells were treated with doses of PDTC (from 0–10 μM) for 30 min and then ET-1 (10 nmol/l) was added. Cells were cultured for 24 h at 37 °C in DMEM/2.5% (v/v) FCS and the conditioned medium was assayed by Western immunoblotting using specific antibodies [anti-(MMP-2), -(TIMP-1) and -(TIMP-2) antibodies; all at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ dilution]. Induction of MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 by ET-1 was observed, which was inhibited with increasing doses of PDTC (a–c). (d) Enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 was identified by gelatin zymography using conditioned medium from MG-63 cells. A similar pattern of inhibition of MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 protein expression was observed with gelatinase enzymatic activity.

ET-1 up-regulates NF- κ B (p65 subunit) and causes NF- κ B translocation to the nucleus in osteosarcoma cells

To assess the effect of ET-1 on the expression of the p65 subunit of NF- κ B, osteosarcoma cells (MG-63) were treated with ET-1. Using a specific antibody against the p65 subunit of NF- κ B, protein expression was determined by Western blotting. As shown in Figure 5, exposing MG-63 cells to ET-1 (10 nmol/l) and its precursor big ET-1 (10 nmol/l) induced protein expression of the p65 subunit of NF- κ B. In other experiments, osteosarcoma cells (MG-63) were treated with ET-1 (10 nmol/l), big ET-1 (10 nmol/l) or IL-1 β (200 pg/ml) for 24 h in basal medium. Figure 6 shows that ET-1, big ET-1 and IL-1 β (used as a positive control) induced the translocation of the p65 subunit of NF- κ B into the nucleus. In control cells, the majority of p65 staining resided in the cytoplasm (Figure 6a). Nuclear accumulation of p65 was observed in the treated cells (Figures 6b, 6c and 6f), suggesting a role of ET-1 and its precursor in p65 activation.

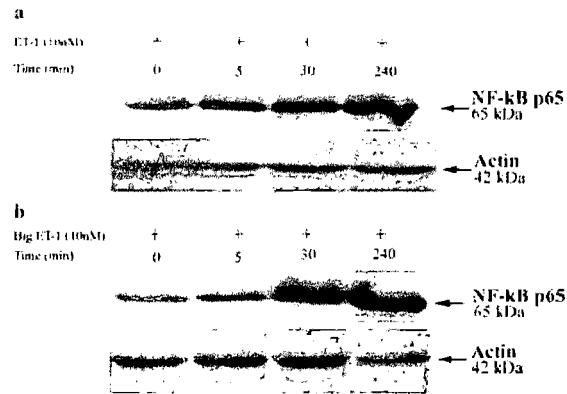


Figure 5 Effect of ET-1 and big ET-1 on the expression of the p65 subunit of NF- κ B in an osteosarcoma cell line

Osteosarcoma cells (MG-63) were treated with (a) ET-1 (10 nmol/l) or (b) big ET-1 (10 nmol/l) for 0, 5 min, 30 min or 4 h and cultured at 37 °C in DMEM/2.5% (v/v) FCS. Cell lysates were extracted using boiling 0.5% SDS and were analysed by Western immunoblotting using a specific antibody against the p65 of subunit NF- κ B (0.2 $\mu\text{g/ml}$ dilution).

ET_A and NF- κ B inhibition reduces osteosarcoma cell invasion

To assess the direct effect of endogenous ET-1 on cellular invasion, selective antagonists of two ET-1 receptors (ET_A and ET_B) and of NF- κ B were used. Selective antagonist of ET_A receptor alone significantly reduced ($P < 0.05$) cellular invasion (Figure 7a). In contrast, the ET_B antagonist did not significantly modulate cellular invasion. In combination, ET_A and ET_B antagonists did not demonstrate additional or synergistic effects on osteosarcoma cell invasion (Figure 7a). As shown in Figure 7(b), exposure of osteosarcoma cells to exogenous ET-1 (10 nmol/l) increased the level of invasive cells which was significantly decreased in the presence of 1 $\mu\text{mol/l}$ ET_A antagonist BQ123. Similar results were obtained for cells expressing both ET_A and ET_B receptors (MG63 cells) and those expressing only ET_A receptors (MNNG/HOS).

DISCUSSION

The present study shows that ET-1 has a stimulatory 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. Our present study also demonstrates that targeting the ET_A receptor is beneficial in abolishing osteosarcoma cell invasion.

ET-1 may have various roles in the tumour process such as: (i) facilitating growth of cancerous cells

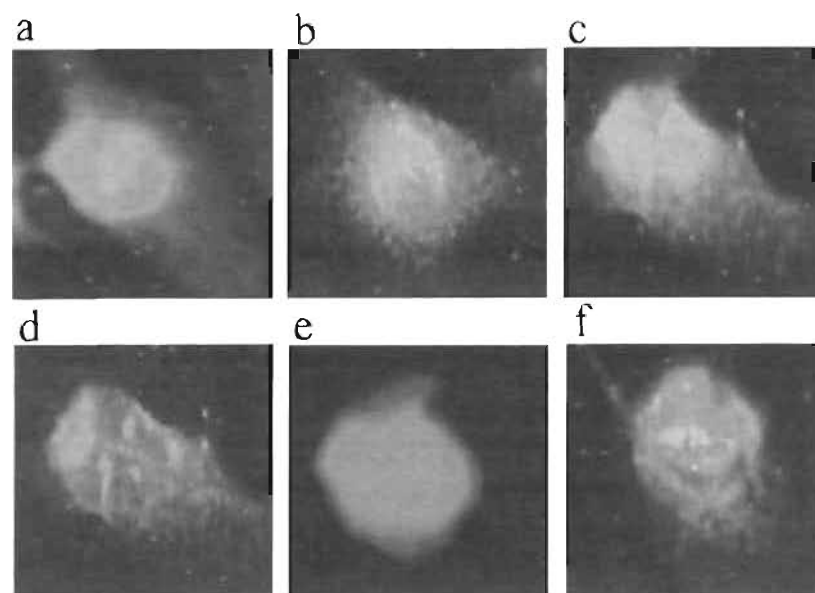


Figure 6 Effect of ET-1, big ET-1 and IL-1 β on cellular localization of the p65 subunit of NF- κ B in osteosarcoma cells

HG-63 cells were plated in covered glass chamber slides and treated with IL-1 β , ET-1 or big ET-1 for 24 h. After stimulation, immunoreactivity of the p65 subunit of NF- κ B in cells was determined by immunofluorescence. Positive immunoreactivity was revealed by Alexa fluor probe 488 (green staining). The blue fluorescence represents DAPI nuclear staining of double-stranded DNA. (a–c) Merged images of the immunofluorescence of the p65 subunit of NF- κ B and DAPI nuclear counterstaining in (a) control cells (cells cultured in medium without ET-1 or big ET-1), (b) IL-1 β (10 nmol/l)-treated cells and (c) ET-1 (10 nmol/l)-treated cells. (d–f) Big ET-1 (10 nmol/l)-treated cells with immunofluorescent staining of the p65 subunit of NF- κ B alone (d), with DAPI nuclear staining alone (e) and with both the immunofluorescence of the p65 subunit of NF- κ B and DAPI nuclear staining (f).

(mitogenesis effect); (ii) protecting cancerous cells from apoptosis; (iii) promoting angiogenesis; and (iv) supporting tumour progression and metastasis [6]. Rosano et al. [14] have shown that ET-1 induces the secretion and activation of various MMPs, such as MMP-2, -3, -9, -7, -13 and MT1-MMP, in ovarian carcinoma cells. 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. [6] have also shown that ET-1 inhibits the secretion of TIMP-1 and TIMP-2, thus modifying the MMP/TIMP ratio prevailing under physiological conditions. The regulation of MMPs by TIMP is a significant factor controlling ECM catabolism, and modifications of this regulation are responsible for several pathological states, particularly cancer [19]. However, Rosano et al. [14] did not observe an induction of TIMP by ET-1, whereas, in the present study, it was found that in osteosarcoma cells ET-1 acted as an inducer of both TIMP-1 and TIMP-2. This can be explained by the fact that TIMP may play a dual role: they 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 [21]. Indeed, TIMP-1 forms a preferential complex with proMMP-9, and TIMP-2 forms a preferential complex with proMMP-2 [21–23]. 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 $_{1-2}$. This allows us to propose a dual inhibition in order to diminish the invasiveness of osteosarcomas of ET-1 on one hand and of the MMPs on the other.

Originally, MMPs were considered to be important almost exclusively in tumour invasion and metastasis; however, recent studies have shown [24] that MMPs play a crucial role in generating growth-promoting molecules and signalling factors. Among these, the transcription factor NF- κ B could play a critical role. The action of ET-1, which leads to a significant increase in MMPs, could be connected to the activation of the NF- κ B. NF- κ B is a ubiquitous transcriptional 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 (Figures 5 and 6). It has been shown previously [25] that NF- κ B up-regulates MMP-9 and down-regulates TIMP-1. NF- κ B is also important in the regulation of many genes involved in matrix degradation. Among these, MMPs play a central role in matrix degradation. In addition, the present study shows

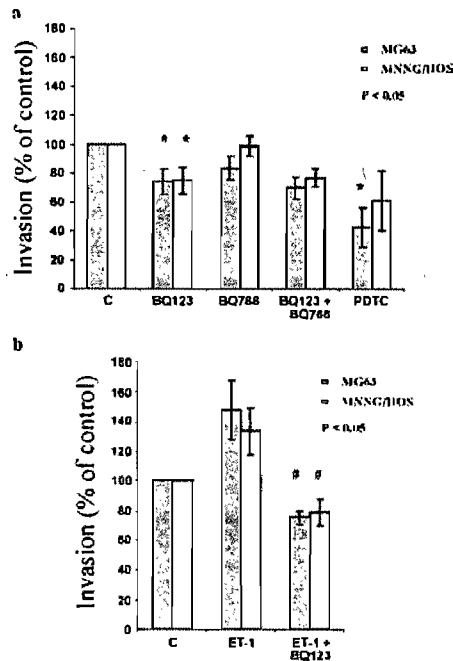


Figure 7 Effect of ET_A and ET_B receptor antagonists and inhibition of $NF-\kappa B$ on osteosarcoma cell invasion

(a) Cell invasion was measured in untreated cells (C) or cells treated with selective antagonists of the ET_A receptor (1 $\mu\text{mol/l}$ BQ123), ET_B receptor (1 $\mu\text{mol/l}$ BQ788), a combination of the two antagonists (1 $\mu\text{mol/l}$ BQ123 + 1 $\mu\text{mol/l}$ BQ788) and with the specific inhibitor of $NF-\kappa B$ (1 $\mu\text{mol/l}$ PDTC). (b) Effect of the ET_A receptor antagonist BQ123 (1 $\mu\text{mol/l}$) was determined in cells exposed to exogenous ET-1 (10 nmol/l). Invasion was quantified by *in vitro* cell transmigration using the Cell Invasion Assay Kit (Chemicon) after 16 h of cell culture. Data are means \pm S.D. of results from three experiments. * $P < 0.05$ compared with control; # $P < 0.05$ compared with ET-1-treated cells.

that the blockade of $NF-\kappa B$ by PDTC inhibits MMP-2 expression. These results correlate with the observations of Meyer et al. [26], 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 $NF-\kappa B$, which is also induced by ET-1 and its immediate precursor.

Finally, our present study provides new evidence for the ET-1 receptor as a potential therapeutic target in the treatment of osteosarcoma. In osteosarcoma cells, the ET_A receptor is the principal receptor involved in their invasive activity. The results obtained by measuring *in vitro* cell invasion using selective antagonists for each receptor subtype (ET_A and ET_B) alone clearly demonstrate that ET_B does not influence the invasive behaviour of osteosarcoma cells. Interestingly, we observed that inhibition of both ET_A and ET_B does not have a synergistic or additive effect on osteosarcoma cell invasion. An explanation for this observation could be due to ET_A and ET_B receptor dimerization, which is a phenomenon well known in the family of G-protein-

coupled receptors to which ET_A and ET_B belong. This interpretation is supported by an interesting study by Harada et al. [27] on the functional binding capability of ET-1 to ET_A and ET_B receptor subtypes. Harada et al. [27] concluded that the ET_B receptor does not independently recognize ET-1 without the aid of the ET_A receptor, thus drawing attention to the crucial role of the ET_A receptor in the biological activity of ET-1. In light of this, our present results demonstrate that exposure of osteosarcoma cells to exogenous ET-1 results in increased invasive capacity of these cells, which is diminished when the ET_A receptor is blocked.

In conclusion, the present study has demonstrated MMP-2 and MMP-9 induction by ET-1 in osteosarcoma cells and human osteosarcoma tissues and has shown a critical role for $NF-\kappa B$ transcription factor in this activity. We also established that ET-1, as well as the two ET-1-specific receptors, is expressed *ex vivo* in human osteosarcoma tissues and that the ET_A receptor is involved in the invasive ability in osteosarcoma cells. ET-1 receptors and MMPs have been detected previously in rat and canine osteosarcoma tissues [28,29], but our present study is the first one to demonstrate their presence in human osteosarcoma. 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. As the ET_A receptor controls invasion and the ET_B receptor has a recycling role, the ET_A receptor would be a significant target. Indeed, there is evidence demonstrating the antitumoral activity of ET-1 receptor antagonists in combination with other tumour inhibitors [30]. 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, Mentor, a Canadian Institutes of Health Research programme. F.M. is the recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Carroll A. Laurin Award 2004. We thank Fazool Shipkolye and Heather Yampolsky for their technical assistance.

REFERENCES

- 1 Wittig, J. C., Bickels, J., Priebat, D. et al. (2002) Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* 65, 1123–1132

- 2 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
- 3 Ossowski, L. and Reich, E. (1983) Changes in malignant phenotype of a human carcinoma conditioned by growth environment. *Cell* **33**, 323–333
- 4 Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. and Shafiq, S. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature (London)* **284**, 67–68
- 5 Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174
- 6 Bagnato, A., Salani, D., Di Castro, 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
- 7 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
- 8 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
- 9 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
- 10 Kusuhara, M., Yamaguchi, K., Nagasaki, K. et al. (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **50**, 3257–3261
- 11 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
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 Jones, L. J., Yuc, 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
- 17 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
- 18 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
- 19 Chantrain, C. and DeClerck, Y. A. (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Médecine/Sci.* **18**, 565–575
- 20 Tsuruda, T., Costello-Boerrigter, L. C. and Burnett, Jr, J. C. (2004) Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail. Rev.* **9**, 53–61
- 21 Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. and Petitfrere, E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 187–198
- 22 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
- 23 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
- 24 Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev.* **2**, 161–174
- 25 Andela, V. B., Gordon, A. H., Zotalis, G. et al. (2003) NF- κ B: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **415** (Suppl.), S75–S85
- 26 Meyer, M., Schreck, R. and Baueerle, P. A. (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005–2015
- 27 Harada, N., Himeno, A., Shigematsu, K., Sumikawa, K. and Niwa, M. (2002) Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ET_A-ET_B receptor heterodimer. *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**, 207–226
- 28 Nambi, P., Wu, H. L., Lipshutz, D. and 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**, 266–271
- 29 Loukopoulos, P., O'Brien, T., Ghodousi, M., Mungall, B. A. and Robinson, W. F. (2004) Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Res. Vet. Sci.* **77**, 131–141
- 30 Bagnato, A. and Natali, P. G. (2004) Targeting endothelin axis in cancer. *Cancer Treat. Res.* **119**, 293–314

Received 16 September 2005/9 January 2006; accepted 17 January 2006
 Published as Immediate Publication 17 January 2006, doi:10.1042/CS20050286